

**FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

Autoridades

Decano
Prof. Dr. Juan Ángel BASUALDO FARJAT

Vicedecana
Prof. Méd. María Alicia MARINI

Secretaria General
Prof. Dra. Adriana MOISO

Directora de Género y Salud
Méd. Gisela Paola LEIVA

Secretario de Asuntos Académicos
Prof. Dr. Mario Pedro SAN MAURO

Director Ejecutivo del Departamento de PostGrado
Prof. Dr. Vicente Roque PRIMERANO

Secretaria de Ciencia y Técnica
Prof. Dra. María Virginia CROCE

Director de la Escuela Universitaria de Recursos
Humanos del Equipo de Salud
Mg. Méd. Nery Orlando FURES

Secretario de Extensión Universitaria
Méd. Joaquín Ignacio CARA

Directora Ejecutiva del Hospital Universitario
Integrado
Méd. Liliana Elizabeth FISHKEL

Secretario en Redes en Salud
Méd. Sebastián Nicolás MURUA

Secretario del Hospital Universitario Integrado
Méd. Norberto Omar BAUMGARTNER

Secretaria Docente Asistencial
Prof. Méd. Mónica Esther FERRERAS

Secretario de Supervisión Administrativa
Lic. Mario ALMANZA

Jefe del Departamento de la Práctica Final
Obligatoria
Prof. Méd. Silvana BABOLIN

Secretaria Administrativa
Sra. Elsa Lidia ANTONINI

Secretario de Asuntos Estudiantiles
Méd. Gonzalo Lucas MARTINEZ WALTER

Dedicatoria

A mis amores, Víctor y Nacho

A mis padres, por siempre en mi corazón

Ítaca

*Cuando emprendas tu viaje a Ítaca
pide que el camino sea largo,
lleno de aventuras, lleno de experiencias.*

*Ten siempre a Ítaca en tu mente.
Llegar allí es tu destino.
Mas no apresures nunca el viaje.
Mejor que dure muchos años
y atracar, viejo ya, en la isla,
enriquecido de cuanto ganaste en el camino
sin aguardar a que Ítaca te enriquezca.*

*Ítaca te brindó tan hermoso viaje.
Sin ella no habrías emprendido el camino.
Pero no tiene ya nada que darte.
Aunque la halles pobre, Ítaca no te ha engañado.
Así, sabio como te has vuelto, con tanta experiencia,
entenderás ya, qué significan las Ítacas.*

Constantino Cavafis

Agradecimientos

Al Dr. Juan Basualdo, porque confió en mí y me enseñó a buscar la excelencia en la investigación, a tener un pensamiento crítico y a crear las oportunidades para alcanzar el logro académico.

A mi amiga y mentora, la Dra. Mónica Sparo, por su apoyo incondicional, su generosidad y su pasión contagiosa por el conocimiento. Hemos trabajado intensamente por este proyecto de tesis, hemos discutido y nos hemos puesto de acuerdo, en persona y a la distancia, en el auto, en el avión, en la vereda, en la cátedra, a la espera de la combi, por teléfono, en La Plata, en Buenos Aires, en Tandil, en Estados Unidos y por supuesto, en nuestras largas reuniones por Skype. ¡¡Lo logramos!!

A Sabina Lissarrague por su valiosa asistencia en la recolección y envío de las muestras fecales para el estudio.

Al Hospital de Niños Debilio Blanco Villegas y a su Directora, la Dra. Marta Brea por confiar en este proyecto de investigación.

A Evangelina Bertucci, por su colaboración desinteresada en el diseño de los mapas de esta tesis. Hemos aprendido juntas, compartiendo largas horas de trabajo con la compañía infaltable del mate y algo dulce.

A Silvia Grenóvero por su contribución inestimable en el análisis estadístico de los resultados y por su generosidad en nuestras reuniones semanales por Skype.

Agradezco profundamente al Hospital de Niños Sor María Ludovica, en especial a los bioquímicos Cecilia Vescina y Sebastián Oderiz, por aceptarme en el Laboratorio de Microbiología, por brindarme sus conocimientos y su confianza para trabajar en equipo. A las bioquímicas Gabriela y Marisa de la Sala de Microbiología, por su alegre compañía y sus cafecitos de media mañana. Al personal técnico de los sectores Coprocultivo, Biología Molecular y Esterilización, especialmente a Analía, Patricia y Estelita, por su desinteresada colaboración.

A la Universidad Nacional de La Plata y la Facultad de Ciencias Médicas por la calidad humana y académica de sus trabajadores docentes y no docentes. En particular, a mis compañeras de trabajo en la Cátedra de Microbiología, por su compañía y apoyo durante estos años.

A la Fundación Alberto J. Roemmers por el subsidio otorgado para la realización de esta tesis.

A mi familia y a mis amigos de la vida, de viajes y de lectura, que me acompañaron y me dieron aliento en este solitario camino.

A mi hijo Nacho, que me alentó y me acompañó en este increíble desafío personal.

A mi compañero de vida, Víctor, porque confió plenamente en mí, cubrió mis ausencias y me cuidó en los momentos difíciles. Sin su apoyo, nada hubiera sido posible.

Diciembre 2018

Subsidios y publicaciones

Subsidio “Alberto J Roemmers” (2016-2018)

Patógenos intestinales en la población con diarrea persistente. Estudio epidemiológico prospectivo de consultas ambulatorias en un hospital pediátrico de la provincia de Buenos Aires.

Publicaciones

Molina NB, Lissarrague S, Bertucci E, Sparo M, Vila Roza V, Córdoba A, Basualdo Farjat J. Agentes etiológicos de diarrea en población pediátrica ambulatoria de Tandil, Argentina. Jornadas de Investigación. 2018.

Molina NB, Oderiz S, Bertucci E, Vescina C, Vila Roza V, Córdoba A, Basualdo Farjat J, Sparo M. Detección molecular de *Escherichia coli* diarreigénica en niños con diarrea. VIII Congreso SADEBAC. 2018.

Molina NB, Lissarrague S, Bertucci E, Sparo M, Basualdo Farjat J. Diarrea por Rotavirus en la era postvacunal: estudio prospectivo en un hospital pediátrico de la provincia de Buenos Aires, Argentina. VIII Congreso SADEBAC. 2018.

Molina NB. Patotipos de *Escherichia coli* diarreigénica en la población pediátrica con diarrea. Ateneo Nacional interhospitalario organizado por el Hospital de Niños Garrahan. 2018

Índice general

SECCIÓN	TÍTULO	PÁGINA
	Resumen	12
	Abstract	18
1	Introducción	24
1.1	Clasificación de las diarreas	26
1.2	Características generales de la diarrea persistente	28
1.3	Aspectos clínicos de los cuadros diarreicos	30
1.4	Aspectos patogénicos de la diarrea infecciosa	36
1.5	Diagnóstico etiológico de las infecciones entéricas	43
1.6	Aspectos espaciales y temporales de las enfermedades diarreicas	47
1.7	Objetivos e Hipótesis	57
2	Materiales y métodos	58
2.1	Área y período de estudio	58
2.1.1	Área de estudio	58
2.1.2	Período de estudio	59
2.2	Aspectos metodológicos del estudio	60
2.2.1	Tipo de estudio y diseño	60
2.2.2	Población. Unidad de análisis. Criterios de inclusión y exclusión	60
2.2.2.1	Población objetivo	60
2.2.2.2	Población accesible	60
2.2.2.3	Selección de la muestra poblacional	60
2.2.2.4	Unidad de Análisis	60
2.2.2.5	Criterios de inclusión	60
2.2.2.6	Criterios de exclusión	61
2.2.3	Fuentes de información, instrumentos y métodos de recolección de datos	61
2.2.3.1	Documentación	61
2.2.3.2	Mediciones biológicas	61
2.2.3.3	Técnicas e instrumentos de laboratorio	61
2.3	Operacionalización de las variables	62

2.3.1	Definición de la variable en estudio	62
2.3.2	Definiciones operacionales de las variables	62
2.3.3	VARIABLES DE CONTROL	62
2.4	Métodos técnicos y operativos	64
2.4.1	Instrumentos de recolección de datos	64
2.4.1.1	Equipamiento e instrumental de laboratorio	64
2.4.1.2	Programas informáticos	64
2.5	Aspectos técnicos y operativos.	65
2.5.1	Recolección de información de los pacientes con diarrea	65
2.5.2	Métodos técnicos y operativos para el estudio macroscópico y microscópico de las heces	65
2.5.2.1	Diagrama del estudio	65
2.5.2.2	Técnicas y aspectos operativos	66
2.5.2.2.1	Aspecto macroscópico: forma y consistencia de las heces.	66
2.5.2.2.2	Aspecto microscópico: presencia fecal de leucocitos y hematíes.	66
2.5.3	Métodos técnicos y operativos para la detección de agentes bacterianos productores de diarrea.	67
2.5.3.1	Diagramas del estudio	67
2.5.3.2	Técnicas y aspectos operativos	68
2.5.3.2.1	Aislamiento bacteriano	68
2.5.3.2.2	Identificación bacteriana	68
2.5.3.2.3	Serotipificación	70
2.5.3.2.4	Susceptibilidad a los agentes antimicrobianos	70
2.5.3.2.4.1	Microdilución en caldo	70
2.5.3.2.4.2	Antibiograma por difusión	71
2.5.4	Métodos técnicos y operativos. Determinación de patotipos de <i>Escherichia coli</i> diarreigénico	71
2.5.4.1	Diagramas del estudio	71
2.5.4.2	Técnicas y aspectos operativos	73
2.5.4.2.1	Cultivo bacteriano primario	73
2.5.4.2.2	Extracción de ADN	74
2.5.4.2.2.1	Extracción de ADN de confluencia bacteriana	74
2.5.4.2.2.2	Extracción de ADN de colonias bacterianas aisladas	74

2.5.4.2.3	Amplificación de ADN bacteriano mediante PCR	75
2.5.4.2.3.1	PCR múltiple 1 (mPCR1)	77
2.5.4.2.3.2	PCR múltiple 2 (mPCR2)	78
2.5.4.2.3.3	Detección de los productos de amplificación	80
2.5.4.2.3.4	Conservación de las cepas bacterianas	80
2.5.4.2.3.4.1	Conservación de cepas en ultra frío	80
2.5.4.2.3.4.2	Conservación de cepas en frío	80
2.5.5	Métodos técnicos y operativos. Detección de antígenos virales	81
2.5.5.1	Diagrama de estudio	81
2.5.5.2	Técnicas y aspectos operativos. Detección de antígenos virales.	81
2.5.6	Métodos técnicos y operativos. Detección de parásitos intestinales	82
2.5.6.1	Diagrama de estudio de los protozoos y helmintos intestinales	82
2.5.6.2	Técnicas y aspectos operativos para la detección de los parásitos	83
2.5.6.2.1	Detección de elementos parasitarios	83
2.5.6.2.1.1	Concentración por flotación	83
2.5.6.2.1.2	Concentración por sedimentación	84
2.5.6.2.1.3	Coloraciones permanentes.	84
2.5.6.2.1.3.1	Coloración: Ziehl Neelsen modificado	85
2.5.6.2.1.3.2	Coloración Safranina-Azul de Metileno	85
2.5.6.2.1.3.3	Coloración Tricrómica de Ryan	85
2.5.6.2.1.3.4	Coloración Quick Hot Gram-cromotrópica	85
2.5.6.2.2	Detección de larvas parasitarias	85
2.6	Organización y validación de la información	86
2.7	Diseño y armado de los mapas digitales	87
2.7.1	Mapas de los casos de diarrea	87
2.7.2	Mapas de calor de los casos de diarrea	88
2.8	Técnicas de carga y análisis estadístico de los resultados	88
2.8.1	Instrumentos para la carga y análisis de los datos	88
2.8.2	Técnicas estadísticas de análisis de los datos	88
3	Resultados	90
3.1.1	Perfil demográfico de los niños con diarrea	90
3.1.2	Perfil clínico de los niños con diarrea	91

3.2	Estudio macroscópico y microscópico de las heces	95
3.2.1	Aspecto macroscópico: forma y consistencia de las heces	95
3.2.2	Aspecto microscópico: presencia de leucocitos y hematíes fecales	96
3.2.3	Patógenos bacterianos	97
3.2.3.1	Caracterización fenotípica de bacterias patógenas	97
3.2.3.2	Perfiles de resistencia bacteriana a los antimicrobianos de utilización clínica	99
3.2.3.4	Caracterización genotípica de <i>Escherichia coli</i> diarreigénico	99
3.2.3.4.1	Cultivo y extracción de ADN	99
3.2.3.4.2	Amplificación de genes de virulencia de cepas control de <i>E. coli</i>	102
3.2.3.4.3	Amplificación de genes de virulencia de aislamientos clínicos de <i>E. coli</i> diarreigénico	103
3.2.3.4.4	Detección de los patotipos diarreigénicos de <i>E. coli</i> mediante tamizaje molecular	105
3.2.3.4.5	Detección de los patotipos diarreigénicos de <i>E. coli</i> mediante PCR confirmatoria.	106
3.2.3.4.6	Caracterización de los aislamientos de <i>E. coli</i> diarreigénicos	107
3.2.3.5	Patógenos virales	112
3.2.3.6	Patógenos parasitarios	113
3.3	Frecuencias de infección en niños con diarrea	113
3.3.1	Frecuencia de infección según agente etiológico de diarrea	113
3.3.2	Frecuencia de infección según edad de los niños con diarrea	116
3.3.3	Frecuencia de infección según duración temporal de la diarrea	119
3.4	Aspectos espaciales y temporales de las diarreas	122
3.4.1	Distribución geográfica de los niños con diarrea	122
3.4.2	Distribución geográfica de los niños con diarrea según el agente etiológico	124
3.4.3	Estacionalidad de los agentes etiológicos de diarrea infecciosa	130
3.4.3.1	Estacionalidad de la diarrea infecciosa según tipo de patógeno	130
3.4.3.2	Distribución geográfica y estacional de los niños con diarrea según agente etiológico	131
3.4.3.2.1	Período: primavera-verano	131
3.4.3.2.2	Período: otoño-invierno	131
3.5	Diarrea persistente	134

3.5.1	Perfil epidemiológico de la población con diarrea persistente	134
3.5.2	Distribución geográfica de los niños con diarrea persistente	135
3.5.3	Estacionalidad de los cuadros de diarrea persistente	137
4	Discusión	138
5	Conclusiones	185
6	Bibliografía	187
7	Anexo I: Escala de Bristol	238
	Anexo II: Preparación de buffers para biología molecular	239
	Anexo III: Coloraciones permanentes para el estudio parasitario	240
	Anexo IV: Datos climáticos y topográficos de la región en estudio	241
	Lista de Tablas	242
	Lista de Figuras	243
	Glosario	247

Resumen

Las enfermedades diarreicas son una causa relevante de morbilidad y mortalidad infantil y constituyen un problema de salud pública sustancial en la población pediátrica de los países en desarrollo. Recientemente, las Guías de Práctica Clínica de la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas han recomendado la categorización de los cuadros diarreicos según su duración temporal. Las categorías incluidas en dicha guía son diarrea aguda que comprende los cuadros diarreicos cuya duración sea menor a 7 días; diarrea prolongada, que contiene los cuadros que perduran entre 7 y 13 días; diarrea persistente, que abarca los episodios cuya duración temporal se extiende entre 14 y 30 días; y diarrea crónica, cuya duración supera los 30 días.

La diarrea aguda es una patología frecuente y de alto impacto en la niñez, especialmente en la población menor de 5 años. Sin embargo, diversos autores han indicado que una proporción de los casos agudos se continua en el tiempo y produce eventos de mayor duración. Dichos cuadros diarreicos son de especial interés en pediatría por las complicaciones a largo plazo, especialmente en la infancia. La evidencia señala que los episodios frecuentes de diarreas de larga duración pueden comprometer el estado nutricional y han sido relacionados con trastornos del crecimiento, carencias nutricionales, menor desarrollo cognitivo, deficiencias de micronutrientes, anemia y mayor susceptibilidad a las infecciones.

En Argentina, se notifican alrededor de un millón de casos de diarrea por año. Los reportes oficiales han informado que el patógeno más frecuente en el país fue *Shigella* spp., sin embargo, el perfil epidemiológico de las diarreas no permanece estático y suele presentar diferencias según la región estudiada. Más aún, en el país, solamente se notifican los eventos agudos de diarrea, situación que dificulta la obtención de información sobre episodios diarreicos que se continúan en el tiempo. Por lo tanto, el objetivo general del presente trabajo de tesis fue caracterizar la diarrea persistente de tipo infeccioso en la población infantil que concurre al Hospital de Niños Debilio Blanco Villegas de Tandil durante el período 2016-2017.

El primer objetivo de esta investigación se enfocó en la caracterización del perfil demográfico y clínico de la población con diarrea. El grupo de estudio quedó conformado por 227 niños menores de 15 años, hallándose la mayor proporción de casos (50%) en la población lactante menor de 2 años. Las infecciones gastrointestinales engloban diversos signos y síntomas que acompañan a la diarrea. La presencia de vómitos fue el parámetro clínico más registrado, observándose en cuatro de cada diez niños con un cuadro diarreico, mientras que la deshidratación solamente fue registrada en 15% de los casos.

La duración temporal del cuadro de diarrea fue variable entre 3 y 21 días. En particular, la diarrea aguda (DAG, duración menor de 7 días) representó el 79% de los casos. La diarrea prolongada (DPO, 7 a 13 días) ocupó el segundo lugar en orden de frecuencia, alcanzando un valor de 14 % en los niños estudiados. La diarrea persistente (DPE, 14 a 30 días) fue observada en el 7% de los niños con diarrea. En particular, los niños con DPO y DPE representaron el 21% de los casos, sin embargo, contribuyeron con el 45% de los días totales con diarrea.

Los dos objetivos siguientes estuvieron orientados a la identificación de los patógenos entéricos y a la estimación de la frecuencia de infección según el agente etiológico, el grupo etario y la duración temporal del cuadro diarreico. En esta investigación, la presencia de patógenos fecales fue observada en 46% de los casos y mostró una asociación significativa con la edad del niño, señalando una mayor frecuencia de infección entérica a menor edad. Asimismo, los agentes etiológicos bacterianos fueron prevalentes en los niños de todos los grupos etarios, independientemente de la duración del cuadro diarreico. Las bacterias patógenas halladas fueron *Escherichia coli* diarreigénica, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei* y *Salmonella entérica*. La presencia de leucocitos y/o hematíes no presentó asociaciones significativas con la presencia de patógenos entéricos ni con la duración temporal del cuadro diarreico.

La aplicación de métodos moleculares constituye una herramienta valiosa en el estudio de las diarreas en pediatría. Este estudio constituye el primer reporte sobre los factores de virulencia de aislamientos diarreigénicos *de E. coli* en la población pediátrica de Tandil. En esta investigación, se detectaron cuatro patotipos diarreigénicos: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC). El patotipo prevalente fue EPEC, seguido de EAEC. Los patotipos ETEC y STEC se detectaron en menor proporción, mientras que EIEC no fue hallado en este estudio.

La frecuencia de infección con EPEC fue cercana a 27%. La mayoría de los casos (91%) fue hallada en niños menores de 5 años, siendo más frecuente en los lactantes que en los niños preescolares. Asimismo, EPEC fue prevalente en los niños con diarrea, independientemente de la duración temporal del cuadro. La infección con EAEC fue hallada en 5% de los niños con diarrea y ocupó el segundo lugar en frecuencia detrás de EPEC. Todos los casos pertenecieron a niños menores de 5 años y se distribuyeron en proporciones similares entre lactantes y niños preescolares. Además, este patotipo fue hallado en niños con cuadros agudos, prolongados y persistentes.

Los niños estudiados presentaron una frecuencia de infección con ETEC cercana a 3%. Dichos aislamientos mostraron un predominio de ETEC-LT (83%, toxina termolábil) y una menor proporción de ETEC-ST (17%, toxina termoestable). La toxina ST presentó la variante STp y no se hallaron aislamientos productores de ambas toxinas en forma conjunta. La mitad de los niños con infección por ETEC fueron lactantes. La mayoría de los casos de diarrea fueron cuadros agudos, hallándose casos prolongados en menor proporción.

El patotipo STEC ha sido reconocido como agente causal de diarrea sanguinolenta y de Síndrome Urémico Hemolítico (SHU). En la presente investigación, la frecuencia de infección pediátrica con STEC fue cercana a 1%. El serotipo prevalente fue O157:H7 (67%), seguido del serotipo O145:H28 (33%).

Este serotipo (no-O157) solamente pudo ser hallado debido a la aplicación de métodos moleculares ya que las técnicas habituales de diagnóstico fenotípico e inmunológico son incapaces de detectar dichos serotipos. Los tres niños infectados con STEC fueron menores de 5 años. Los dos casos infectados por cepas STEC O157 presentaron cuadros clínicos de SHU, mientras que el niño infectado con la cepa no-O157 desarrolló una diarrea sanguinolenta de curso prolongado.

Los aislamientos de STEC presentaron los genes de virulencia: toxina Shiga (*stx2*), intimina (*eae*) y enterohemolisina (*ehxA*). Ante la sospecha de un brote, las cepas STEC fueron enviadas al Servicio de Fisiopatogenia del ANLIS-Malbrán, donde se analizaron dos aislamientos entéricos de STEC O157:H7 recuperados al mismo tiempo en áreas geográficas distanciadas, una proveniente de un niño de Tandil y otra detectada en un niño de la provincia de Santa Fe. Ambas cepas STEC presentaron los mismos factores de virulencia y el mismo patrón PFGE.

La frecuencia de infección por *Shigella* spp. fue cercana a 5%. Las especies halladas fueron *S. flexneri* (90%) y *S. sonnei* (10%). Ocho de los diez aislamientos de *Shigella* spp. presentaron resistencia a uno o varios antimicrobianos (ATM). La resistencia bacteriana a los betalactámicos alcanzó 70% de los aislamientos, mientras que dicho fenómeno fue relativamente menor (10%) para fluoroquinolonas e inhibidores de vía de los folatos. Esta bacteria fue hallada en niños de todos los grupos etarios, sin embargo, el 70% de los aislamientos correspondió a niños menores de 5 años. El patógeno estuvo presente en cuadros diarreicos agudos y prolongados.

La frecuencia de infección intestinal por *S. enterica* fue cercana a 3%. Esta bacteria fue hallada en lactantes mayores y preescolares con similar proporción en ambos grupos. No se observaron infecciones por dicho patógeno en niños de mayor edad. La salmonelosis intestinal aguda representó 83% de los casos, mientras que un niño de edad preescolar presentó un cuadro de diarrea por *S. enterica* cuya duración fue prolongada.

La frecuencia de infección intestinal por Rotavirus fue menor a 4% y la infección entérica con Adenovirus no fue detectada. La mayor tasa de rotavirus estuvo asociada a niños en edad preescolar, mientras que la infección estuvo ausente en niños menores de 1 año. La infección aguda por Rotavirus representó 88% de los casos, mientras que un lactante presentó un cuadro diarreico prolongado.

En esta investigación, la frecuencia de infección global por los protozoos *Cryptosporidium* spp., *Blastocystis* spp. y *G. intestinalis* fue menor a 6% y no se hallaron helmintos intestinales en los niños con diarrea. La mayoría de las infecciones fueron observadas en niños menores de 5 años. Los protozoos fueron hallados en niños con diarrea independientemente de la duración temporal del cuadro.

El cuarto objetivo estuvo enfocado al estudio de la distribución geográfica y la estacionalidad de los casos de diarrea infecciosa. Los niños con cuadros diarreicos presentaron un patrón espacial en conglomerados (*clusters*), con un predominio en el eje norte-noreste-noroeste, una región urbana periférica con diversos barrios informales, escasa o ausente infraestructura de servicios y dificultades en el acceso a la atención primaria de la salud, las escuelas y el transporte público de pasajeros.

Los agentes etiológicos de diarrea infecciosa mostraron perfiles temporales diferentes durante el período de estudio. El primer perfil estacional estuvo constituido por cuatro bacterias, EPEC, ETEC, EAEC y *S. enterica*, que se observaron en cuadros diarreicos durante todo el año. Por el contrario, el resto de los patógenos mostró un perfil estacional diverso. En particular, las diarreas infecciosas causadas por *Shigella* spp. y STEC fueron halladas en las estaciones más cálidas. Las infecciones por Rotavirus presentaron un perfil estacional restringido a la época primaveral, mostrando un corrimiento del pico de estacionalidad respecto a la era prevacunal (época invernal). Por último, las

infecciones entéricas por *Cryptosporidium* spp. y *Blastocystis* spp. fueron detectados en las estaciones más cálidas, mientras que *G. intestinalis* fue identificada en invierno y primavera. La aplicación de un enfoque espacial y temporal en las diarreas pediátricas permitió la detección de áreas con alta densidad de episodios y el conocimiento de la distribución geográfica de las poblaciones vulnerables a los patógenos entéricos en la ciudad de Tandil.

El quinto objetivo estuvo relacionado con la descripción del perfil epidemiológico, la distribución geográfica y la estacionalidad de la población con diarrea persistente. En esta investigación, la frecuencia de cuadros diarreicos persistentes representó el 7% de todos los episodios. Los niños menores de 5 años constituyeron el grupo etario más afectado (80%), siendo más frecuente en los lactantes que en los niños preescolares. La mayoría de los casos de diarrea persistente (70%) fue atendido por guardia médica del hospital de Tandil y el 31% requirió hospitalización a causa del cuadro entérico.

La frecuencia de infección entérica en dichos casos fue 43,8% y los agentes infecciosos fueron EPEC, EAEC y *Blastocystis* spp. Desde una perspectiva geoespacial, los niños tandilenses con diarrea persistente exhibieron un patrón geográfico disperso, en forma de casos de diarrea aislados y sin evidencia de áreas de alta densidad de casos (*hotspots*). Con respecto a la estacionalidad, la mayor frecuencia de casos de DPE se observó durante la estación cálida y fue coincidente con el incremento de casos totales de diarrea.

Esta investigación constituye el primer estudio sobre la etiología infecciosa de la diarrea persistente en Argentina. En este trabajo se demuestra la presencia de dicho cuadro clínico en la población pediátrica con diarrea y la existencia de EPEC, EAEC y *Blastocystis* spp., como patógenos entéricos relacionados con los cuadros diarreicos persistentes.

Abstract

Diarrheal diseases are a relevant cause of infant morbidity and mortality and constitute a substantial public health problem in the pediatric population of developing countries. Recently, the Clinical Practice Guidelines of the American Society of Infectious Diseases have recommended the categorization of diarrheal diseases according to their temporal duration. The categories included in this guideline are acute diarrhea that includes diarrheic diarrhea whose duration is less than 7 days; prolonged diarrhea, which contains the pictures that last between 7 and 13 days; persistent diarrhea, which includes episodes whose duration extends between 14 and 30 days; and chronic diarrhea, whose duration exceeds 30 days.

Acute diarrhea is a frequent and high impact pathology in childhood, especially in the population under 5 years. However, several authors have indicated that a proportion of acute cases continues over time and produces longer duration events. These diarrheic diseases are of special interest in pediatrics, due to long-term complications, especially in childhood. The evidence indicates that frequent episodes of long-term diarrhea can compromise nutritional status and have been related to growth disorders, nutritional deficiencies, reduced cognitive development, micronutrient deficiencies, anemia and increased susceptibility to infections.

In Argentina, about one million cases of diarrhea are reported per year. The official reports have reported that the most frequent pathogen in the country was *Shigella* spp., However, the epidemiological profile of the diarrheas does not remain static and usually differs according to the region studied. Moreover, in the country, only acute diarrhea events are reported, a situation that makes it difficult to obtain information about diarrheal episodes that continue over time. Therefore, the general objective of this thesis work was to characterize the persistent diarrhea of infectious type in the pediatric population that attends the Debilio Blanco Villegas de Tandil Children's Hospital during the 2016-2017 period.

The first objective of this research focused on the characterization of the demographic and clinical profile of the population with diarrhea. The study group consisted of 227 children under 15 years of age, with the highest proportion of cases (50%) were children under 2 years of age. Gastrointestinal infections include various signs and symptoms that accompany diarrhea. The presence of vomiting was the most registered clinical parameter, being observed in four out of ten children with a diarrheic picture, while dehydration was only registered in 15% of the cases.

The duration of the diarrhea episode was variable between 3 and 21 days. In particular, acute diarrhea (DAG, duration less than 7 days) accounted for 79% of cases. Prolonged diarrhea (DPO, 7 to 13 days) ranked second in order of frequency, reaching a value of 14% in the children studied. Persistent diarrhea (DPE, 14 to 30 days) was observed in 7% of children with diarrhea. In particular, children with DPO and DPE accounted for 21% of the cases, however, they contributed with 45% of the total days with diarrhea.

The following two objectives were aimed at the identification of enteric pathogens and the estimation of the frequency of infection according to the etiological agent, the age group and the duration of the diarrheic episode. In this investigation, the presence of fecal pathogens was observed in 46% of the cases and showed a significant association with the age of the child, indicating a higher frequency of enteric infection at a younger age. Likewise, bacterial etiological agents were prevalent in children of all age groups, regardless of the duration of diarrhea. The pathogenic bacteria found were diarrheogenic *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei* and *Salmonella enterica*. The presence of leukocytes and/or red blood cells did not show significant associations with the presence of enteric pathogens or with the duration of diarrhea.

The application of molecular methods is a valuable tool in the study of diarrhea in pediatrics. This study is the first report on the virulence factors of

diarrheic isolates of *E. coli* in the pediatric population of Tandil. In this investigation, four diarrhenetic pathotypes were detected: enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC) and Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC). The prevalent pathotype was EPEC, followed by EAEC. The ETEC and STEC pathotypes were detected in a smaller proportion, while EIEC was not found in this study.

The frequency of infection with EPEC was close to 27%. Most cases (91%) found in children under 5 years of age, being more frequent in infants than in preschool children. Likewise, EPEC was prevalent in children with diarrhea, regardless of the temporal duration of the symptoms.

Infection with EAEC was found in 5% of children with diarrhea and ranked second in frequency behind EPEC. All cases belonged to children under 5 years of age and were distributed in similar proportions among infants and preschool children. In addition, this patotype was found in children with acute, prolonged and persistent symptoms.

The children studied had a frequency of infection with ETEC close to 3%. These isolates showed a predominance of ETEC-LT (83%, heat-labile toxin) and a lower proportion of ETEC-ST (17%, thermostable toxin). The ST toxin showed the STp variant and there were no detected isolates producing both toxins. Half of the children with ETEC infection were infants. Most cases of diarrhea were acute cases, with prolonged cases in a lesser proportion.

The STEC pathotype has been recognized as a causative agent of bloody diarrhea and Hemolytic Uremic Syndrome (HUS). In the present investigation, the frequency of pediatric infection with STEC was close to 1%. The prevalent serotype was O157:H7 (67%), followed by serotype O145:H28 (33%). This serotype (non-O157) could only be found due to the application of molecular methods since the usual techniques of phenotypic and immunological diagnosis are unable to detect these serotypes. The three children infected with STEC were

under 5 years old. The two cases infected with STEC O157 strains presented clinical symptoms of HUS, while the child infected with the non-O157 strain developed prolonged bloody diarrhea.

The isolates of STEC presented the virulence genes: Shiga toxin (stx2), intimina (eae) and enterohemolysin (ehxA). Upon suspicion of an outbreak, the STEC strains were sent to the Fisiopathogenesis Service of ANLIS-Malbrán, where two enteric isolates of STEC O157: H7 recovered at the same time in remote geographical areas were analyzed, one from a child from Tandil and another from detected in a child from the province of Santa Fe. Both STEC strains presented the same virulence factors and the same PFGE pattern.

The frequency of infection by *Shigella* spp. It was close to 5%. The species found were *S. flexneri* (90%) and *S. sonnei* (10%). Eight of the ten isolates of *Shigella* spp. showed resistance to one or several antimicrobials (ATM). Bacterial resistance to beta-lactams reached 70% of the isolates, whereas this phenomenon was relatively minor (10%) for fluoroquinolones and folate pathway inhibitors. This bacterium was found in children of all age groups, however, 70% of the isolations corresponded to children under 5 years. The pathogen was present in acute and prolonged diarrhea.

The frequency of intestinal infection by *S. enterica* was close to 3%. This bacterium was found in older infants and preschool children with a similar proportion in both groups. No infections were observed by this pathogen in older children. Acute intestinal salmonellosis accounted for 83% of the cases, while a preschool child presented diarrhea due to *S. enterica* whose duration was prolonged.

The frequency of intestinal infection with Rotavirus was less than 4% and enteric infection with Adenovirus was not detected. The highest Rotavirus infection rate was associated with preschool children, while the infection was

absent in children under 1 year of age. Acute Rotavirus infection accounted for 88% of the cases, while one infant presented with a prolonged diarrhea.

In this investigation, the frequency of global infection by the protozoa *Cryptosporidium* spp., *Blastocystis* spp. and *G. intestinalis* was less than 6% and intestinal helminths were not found in children with diarrhea. Most infections were observed in children under 5 years of age. Protozoa were found in children with diarrhea regardless of the temporal duration of the symptoms.

The fourth objective was focused on the study of the geographical distribution and seasonality of cases of infectious diarrhea. Children with diarrheic symptoms presented a spatial pattern in clusters, with a predominance in the north-northeast-northwest axis, a peripheral urban region with various informal neighborhoods, scarce or absent service infrastructure and difficulties in accessing care primary health, schools and public passenger transport.

The etiological agents of infectious diarrhea showed different temporal profiles during the study period. The first seasonal profile consisted of four bacteria, EPEC, ETEC, EAEC and *S. enterica*, which were observed in diarrheic pictures throughout the year. On the contrary, the rest of the pathogens showed a diverse seasonal profile. In particular, infectious diarrhea caused by *Shigella* spp. and STEC were found in the warmer seasons. Rotavirus infections presented a seasonal profile restricted to the spring period, showing a shift of seasonality peak with respect to the prevacunal era (winter season). Finally, enteric infections by *Cryptosporidium* spp. and *Blastocystis* spp. were detected in the warmer seasons, while *G. intestinalis* was identified in winter and spring. The application of a spatial and temporal approach in pediatric diarrhea allowed the detection of areas with high density of episodes and knowledge of the geographical distribution of populations vulnerable to enteric pathogens in the city of Tandil.

The fifth objective was related to the description of the epidemiological profile, geographical distribution and seasonality of the pediatric population with

persistent diarrhea. In this research, the frequency of persistent diarrheal diseases accounted for 7% of all episodes. Children younger than 5 years were the most affected age group (80%), being more frequent in infants than in preschool children. Most cases of persistent diarrhea (70%) were attended by a medical emergency service at the Tandil hospital and 31% required hospitalization because of the enteric symptoms.

The frequency of enteric infection in these cases was 43.8% and the infectious agents were EPEC, EAEC and *Blastocystis* spp. From a geospatial perspective, Tandilian children with persistent diarrhea exhibited a dispersed geographic pattern, in the form of isolated cases of diarrhea and without evidence of areas of high case density (*hotspots*). About seasonality, the highest frequency of DPE cases was observed during the warm season and coincided with the increase in total cases of diarrhea.

This research constitutes the first study on the infectious etiology of persistent diarrhea in Argentina. This study demonstrates the presence of this clinical picture in the pediatric population with diarrhea and the existence of EPEC, EAEC and *Blastocystis* spp., as enteric pathogens related to persistent diarrheal diseases.

1. Introducción

La diarrea ha sido definida como la alteración del movimiento intestinal normal, caracterizado como un incremento en el contenido de agua, volumen o frecuencia de las deposiciones, con una frecuencia de tres o más veces en 24 horas (OMS 1988).

La diarrea ocupa un puesto destacado entre las enfermedades infecciosas ya que provoca cerca de 4 mil millones de casos al año y constituye la segunda causa de muerte en los niños menores de 5 años. Las diarreas producen alrededor de 3,6% de los años de vida ajustados en función de la discapacidad (AVAD) debidos a enfermedades. Los niños malnutridos o inmunodeprimidos presentan mayor riesgo de enfermedades diarreicas potencialmente mortales. (Kosek *et al.*, 2003; Kosek *et al.*, 2003; Bryce *et al.*, 2005; Guerrant *et al.*, 2008; Guerrant *et al.*, 2008; Walker *et al.*, 2010; Xiao *et al.*, 2016). (figura 1.1).

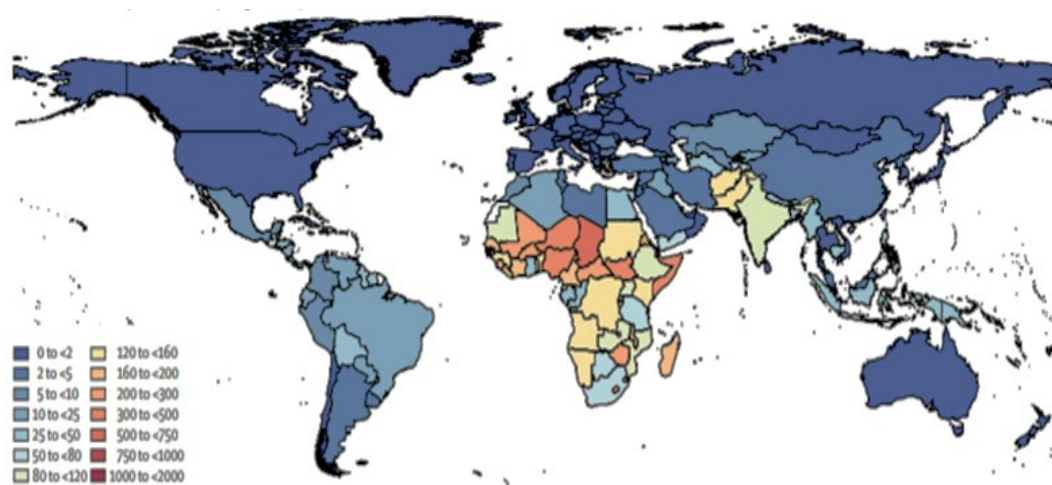


Figura 1.1: tasa de mortalidad por enfermedades diarreicas en niños menores de 5 años (año 2015), extraído de GBD Diarrhoeal Diseases Collaborators 2015.

Las enfermedades diarreicas son una causa relevante de morbilidad y mortalidad infantil y constituyen un problema de salud pública sustancial en la población pediátrica de los países en desarrollo (Moore *et al.*, 2010; Shrivastava

et al., 2017; Mokomane *et al.*, 2018). Las enfermedades diarreicas se encuentran entre las cinco causas de muerte de todas las edades en 17 países de Latinoamérica y región del Caribe, constituyen la primera causa de muerte en cinco y la segunda en cuatro de ellos. Se estima que la enfermedad diarreica aguda constituye entre el 60 y el 80% del motivo de consultas pediátricas en los servicios de salud de dicha región (MSAL 2012).

En Argentina, se notifican alrededor de 1 millón de casos de diarrea por año, hallándose variaciones según la región del país (figura 1.2).

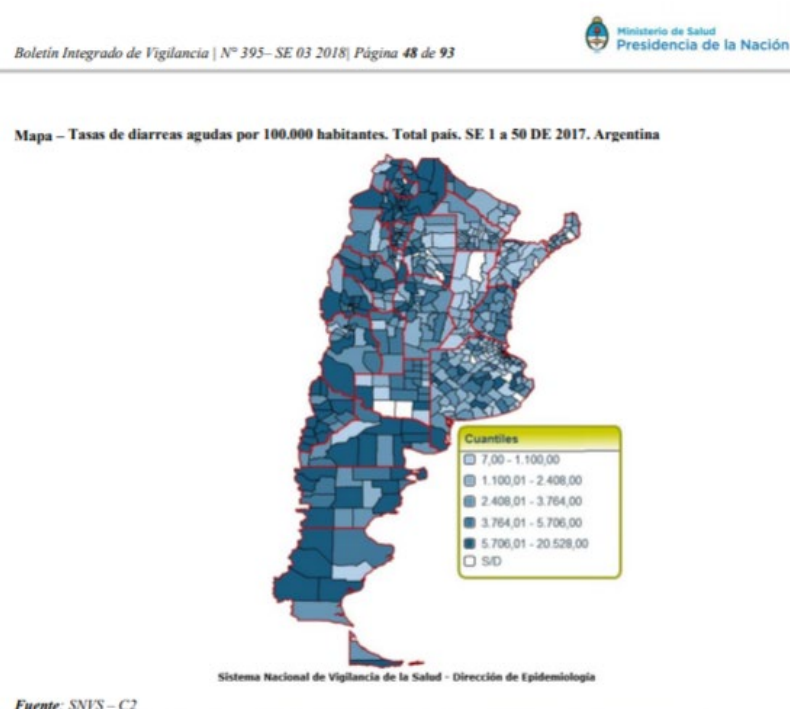


Figura 1.2: tasa de diarreas agudas por 100.000 habitantes. Argentina. Boletín integrado de vigilancia N°395, 2018.

La enfermedad infecciosa intestinal afecta principalmente a la población menor de 5 años. Este cuadro genera entre 7% y 14% de todas las internaciones en la primera infancia y cerca del 40% de hospitalizaciones en los niños menores de un año (MSAL 2012; Degiuseppe *et al.*, 2017).

La situación epidemiológica de las diarreas no es estática. Los agentes etiológicos pueden presentar variaciones relacionadas con factores

demográficos, ambientales, geográficos, estacionales, climáticos o de comportamiento, por lo tanto, la vigilancia epidemiológica constituye una herramienta de gran utilidad para conocer la situación actual, detectar cambios geográficos y temporales, observar las tendencias y obtener datos para marcar una línea de base para estudios futuros.

1.1-Clasificación de las diarreas

Las enfermedades diarreicas han sido clasificadas bajo distintos criterios. A efectos prácticos y desde una perspectiva clínica, las diarreas pueden clasificarse en tres entidades: diarrea aguda, diarrea disintérica y diarrea persistente. Esta clasificación se basa en las características de presentación del cuadro diarreico. La primera categoría comprende la diarrea aguda tipo acuosa. Este cuadro presenta una evolución autolimitada, con heces voluminosas sin presencia de sangre visible y cuyas manifestaciones clínicas incluyen diarrea líquida, vómitos frecuentes, ligero dolor abdominal y riesgo moderado de deshidratación. Por el contrario, la diarrea disintérica se describe como un cuadro diarreico sanguinolento, con escaso volumen de heces que pueden incluir la presencia de hemáties, leucocitos y moco fecal. Las manifestaciones clínicas incluyen diarrea, vómitos, dolor abdominal, tenesmo y riesgo de deshidratación. Estos episodios exigen un control médico más estrecho porque puede derivar en cuadros de mayor gravedad como el Síndrome Urémico Hemolítico (SHU), bacteriemias o infecciones extraintestinales. Por último, la tercera categoría comprende la diarrea persistente que corresponde al cuadro diarreico de origen multifactorial, cuya duración excede dos semanas (Kosek *et al.*, 2003; MSAL 2011).

Recientemente, las Guías de Práctica Clínica sobre diarreas, publicadas en 2017 por la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas (IDSA), han recomendado la categorización de los cuadros diarreicos según su duración temporal (figura 1.3). La primera categoría incluida en dicha guía es la diarrea aguda (DAG) que comprende los cuadros diarreicos cuya duración sea menor a 7

días. La segunda categoría es la diarrea prolongada (DPO) que incluye los cuadros que perduren entre 7 y 13 días; y la tercera, es la diarrea persistente (DPE), que abarca los episodios cuya duración temporal se extiende entre 14 y 30 días (Shane *et al.*, 2017).

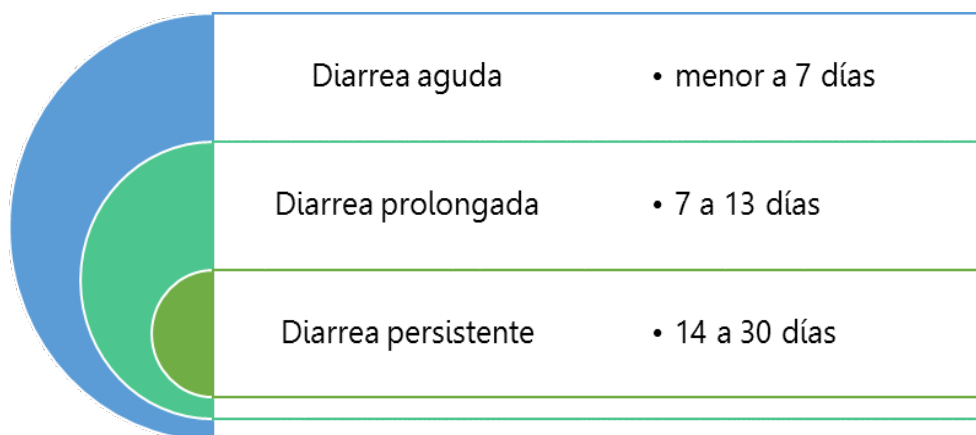


Figura 1.3: clasificación de las diarreas según su duración temporal. Fuente: elaboración personal.

La DAG es una patología frecuente y de alto impacto en la niñez, especialmente la población menor de 5 años. Dos extensos estudios han planteado la carencia de información sobre diarreas en niños de mayor edad. El primero de ellos fue una revisión sistemática sobre población con diarrea de varios países en desarrollo. Dicho estudio reportó que la mayoría de los trabajos sobre el tema fueron realizados en niños menores de 5 años, acentuando la escasa presencia de publicaciones en el grupo etario entre 5 y 15 años (Lamberti *et al.*, 2012). De igual modo, el Estudio Multicéntrico Entérico Global (GEMS) destacó la exigua información sobre duración y etiología de la diarrea en niños mayores de 5 años de países en desarrollo (Levine *et al.*, 2012).

Diversos autores han reportado la preponderancia de la DAG en la población pediátrica, respecto a los cuadros de mayor duración (Moore *et al.*, 2010; González Corona *et al.*, 2017; Islam *et al.*, 2018). Sin embargo, la continuidad

del cuadro clínico se produce en una proporción variable de los casos agudos (Fraser *et al.*, 1998; Bhan *et al.*, 1989; Fagundes-Neto *et al.*, 2000). A fin de evaluar la evidencia disponible sobre el tema, Bhutta (2006) recolectó la información epidemiológica sobre las diarreas cuya duración fue mayor a una semana. Esta revisión incluyó varios estudios en el ámbito extrahospitalario y señaló la escasez de resultados recientes sobre dichos cuadros, principalmente en pacientes inmunocompetentes.

El primer estudio sobre DPO como entidad clínica independiente fue realizado en Brasil, cuyos autores reportaron 12% en la población infantil (Moore *et al.*, 2010). Estudios posteriores en países en desarrollo reportaron la prolongación de los síntomas gastrointestinales hasta en 15% de los casos de diarrea (Lamberti *et al.*, 2012). Sin embargo, otros autores han indicado valores superiores a 20% de DPO. Por ejemplo, Fraser *et al.* (1998) realizaron un relevamiento sobre dicho cuadro en niños israelíes menores de dos años, hallando valores cercanos a 25%. De modo similar, dos estudios realizados en India y Kenia reportaron los valores de DPO más elevados, con frecuencias de 43% y 55% de los casos (Bhan *et al.*, 1989; Schilling 2010).

1.2-Características generales de la diarrea persistente

La persistencia de los síntomas puede observarse entre 3% y 20% de los cuadros diarreicos (OMS 1988; Andrade *et al.*, 2000; Moore *et al.*, 2011). Al respecto, siete estudios realizados en niños de Bangladesh, Brasil, Perú, India, Kenia, Etiopía y Zimbawe reportaron valores cercanos a 10% de cuadros persistentes en pediatría (Ketema *et al.*, 1997; Lima *et al.*, 2000; Bhutta 2006; Moore *et al.*, 2010; Schilling 2010; Islam *et al.*, 2018). Por el contrario, otros investigadores señalaron frecuencias mayores de DPE que alcanzaron el 28% de los casos de diarrea en Israel y Brasil (Fraser *et al.*, 1998; Fagundes-Neto *et al.*, 2000; Moore *et al.*, 2011; Lamberti *et al.*, 2012).

Los episodios frecuentes de DPE pueden comprometer el estado nutricional y se relacionan con trastornos del crecimiento, carencias nutricionales, menor desarrollo cognitivo, anemia y mayor susceptibilidad a las infecciones (Bhan *et al.*, 1989; Schorling *et al.*, 1990; Lima *et al.*, 1992; Black *et al.*, 1993; Ahmed *et al.*, 2001; Ochoa *et al.*, 2004; Pawloski *et al.*, 2009; Moore *et al.*, 2010; Bartelt *et al.*, 2013; Durairaj *et al.*, 2017).

La patogenia de la DPE es compleja y no está totalmente esclarecida (Bhutta 2006; Guerrant *et al.*, 2008). La evidencia sugiere el rol de múltiples infecciones secuenciales, así como también, la infección entérica prolongada por un único patógeno. Ambos fenómenos podrían predisponer a infecciones entéricas secundarias, perpetuar el daño a la mucosa y conducir a una deficiencia de la función digestiva y absorbente (Ochoa *et al.*, 2004; Abba *et al.*, 2009; Pawlovski *et al.*, 2009).

Los cuadros persistentes han sido asociados con numerosos patógenos entéricos (Fang *et al.*, 1995, Fagundes-Neto *et al.*, 2000). Entre ellos se han mencionado *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *S. enterica* no tifoidea (SNT), *Campylobacter* spp., *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium* spp., *Cyclospora cayentanensis*, *Blastocystis* spp., *Enterocytozoon bieneusi*, *Strongyloides stercoralis* y diversos virus entéricos (Newman *et al.*, 1994; Sang *et al.*, 1997; Lima *et al.*, 2000; Bhutta 2006; Mor *et al.*, 2009; Pawlowski *et al.*, 2009; Abba *et al.*, 2009; Kermani *et al.*, 2010; de Andrade *et al.*, 2011; Becker *et al.*, 2013). Asimismo, en forma independiente al origen de la diarrea, existen diversos patógenos que pueden perpetuar el daño a la mucosa entérica y extender la duración del cuadro intestinal. Los protozoos *Cryptosporidium* spp., *G. intestinalis* y *E. histolytica* y la bacteria EAEC han sido reconocidos como patógenos asociados a mayor riesgo de diarrea persistente, malnutrición y deficiencias de crecimiento (Macfarlane *et al.*, 1987; Sallon *et al.*, 1988; Sarabia-Arce *et al.*, 1990; García *et al.*, 1991; Newman *et al.*, 2001; Tumwine *et al.*, 2003; Guerrant *et al.*, 2008; Mondal *et al.*, 2009; Haque *et al.*, 2009).

Numerosas investigaciones han demostrado que dichos cuadros diarreicos comprenden una fracción menor de todos los episodios, sin embargo, pueden representar hasta el 50% de todos los días con diarrea en la población infantil (Schorling *et al.*, 1990; Han *et al.*, 1995; Lima *et al.*, 2000; Bhutta 2006; Moore *et al.*, 2010; Fagundes-Neto *et al.*, 2013). Asimismo, estudios longitudinales demostraron que la presencia de un cuadro de DPO en la infancia incrementa el riesgo de sufrir DPE y constituye un factor de riesgo de nuevos episodios diarreicos a mayor edad (Lima *et al.*, 2000). De igual modo, Moore *et al.* (2010) concluyeron que la presencia de cuadros diarreicos prolongados sextuplica el riesgo de presentar una DPE. Sumado a ello, un estudio de cohorte pediátrica demostró que el primer episodio de DPE fue precedido por múltiples episodios agudos que incrementaron el riesgo de un cuadro diarreico persistente (Ochoa *et al.*, 2004).

Los cuadros diarreicos prolongados y persistentes son de especial interés en pediatría por las complicaciones a largo plazo, especialmente en niños menores de 5 años. Sin embargo, en Argentina, no se cuenta con registros oficiales que informen de la frecuencia de patógenos en la población infantil que cursan cuadros prolongados y persistentes de diarrea.

1.3-Aspectos clínicos de los cuadros diarreicos

Las infecciones gastrointestinales engloban una amplia variedad de complejos sintomáticos y de agentes infecciosos. En la población pediátrica con diarrea, la exploración física es fundamental e implica la valoración general del niño observando la presencia de manifestaciones clínicas como náuseas, vómitos, deshidratación, dolor abdominal, fiebre, pujo y tenesmo (Mandell 2014; Shane *et al.*, 2017). La presentación clínica del cuadro no es patognomónica de la etiología infecciosa, sin embargo, dicha evaluación permitirá definir si el paciente deberá

ser referido a un nivel de mayor complejidad o ser atendido en forma ambulatoria (MSAL 2011).

La evaluación inicial del niño con diarrea debe enfocarse en el estado de hidratación corporal (O’Ryan *et al.*, 2005; Shane *et al.*, 2017). Diversos estudios han señalado que deshidratación en cuadros diarreicos se halla relacionada con el tipo de agente etiológico, la edad del niño, la estacionalidad, los vómitos incoercibles o la capacidad de recuperar las pérdidas de líquido, entre otros (Brandt *et al.*, 2015, Shane *et al.*, 2017). La frecuencia de deshidratación difiere ampliamente en la población con cuadros diarreicos. Al respecto, seis estudios basados en consultas hospitalarias de niños con diarrea registraron frecuencias entre 1% y 56% de los casos (Youssef *et al.*, 2000; Alam *et al.*, 2001; Anvikar *et al.*, 2008; De *et al.*, 2016; Chung *et al.*, 2017; Islam *et al.*, 2018). Asimismo, una extensa revisión sistemática sobre diarreas en población de países en desarrollo reportó valores entre 7% y 81% de los casos (Lamberti *et al.*, 2012).

Diversos estudios han señalado que la frecuencia de emesis en los cuadros diarreicos es variable. Un estudio de cohorte en niños con diarrea, realizado en India por Bhan *et al.* (1989) halló una frecuencia de vómitos en 10% de los casos. Sin embargo, otros investigadores reportaron valores superiores. Una revisión sobre casos de diarrea atendidos en hospitales de 60 países reportó la presencia de este síntoma hasta el 58% de los niños enfermedades diarreicas (Lamberti *et al.*, 2012). Las mayores frecuencias de vómitos fueron reportadas en dos estudios, con valores que alcanzaron el 84% de la población con diarrea (Dutta *et al.*, 2013; Chung *et al.*, 2017).

La mayoría de los niños que experimentan gastroenteritis reciben tratamiento de forma ambulatoria. La decisión de hospitalizar a pacientes con dicho cuadro debe considerar los factores de riesgo que predisponen a resultados desfavorables, como prematurez, gravedad del cuadro, sospecha de sepsis, edad de la madre o diversos factores socioeconómicos y culturales que

impidan el control evolutivo del cuadro digestivo (Kosek *et al.*, 2003; Granado-Villar *et al.*, 2012; Lamberti *et al.*, 2012).

Varios estudios recopilaron información sobre el tema revelando que la frecuencia de hospitalización por diarrea varió entre 1% y 45% según el agente causal, la edad poblacional y la región geográfica (Effler *et al.*, 2000; Moe *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2009; Lanata *et al.*, 2013; Levine *et al.*, 2013; García-Roig *et al.*, 2013; Derby *et al.*, 2014). En Argentina la mayor carga de enfermedad por diarrea se produce en los niños menores de 5 años. Por ejemplo, en el período 2005-2013, se registraron alrededor de $2,5 \times 10^6$ de egresos de hospitales públicos de los cuales, el 9% fueron niños con enfermedad infecciosa intestinal. Esta frecuencia mostró resultados variables según la región del país, alcanzando el 14% de las altas hospitalarias por diarrea en niños del noroeste argentino. Asimismo, en términos de distribución por grupo etario, el 36% de las hospitalizaciones registradas en hospitales argentinos se debió a la población lactante con diarrea (Degiuseppe *et al.*, 2017).

Diversos patógenos bacterianos han sido relacionados con cuadros de diarrea en el mundo. Entre ellos se han mencionado *Shigella* spp., *S. enterica* (no tifoidea, SNT), *E. coli* diarraigénica (DEC), *Campylobacter* spp., *Aeromonas* spp., *Yersinia* spp. y *Vibrio cholerae* (Murray 2007; Konemann 2008; Mandell 2014). La evidencia reciente ha señalado que *E. coli* diarraigénica constituye un grupo de patotipos diferentes que incluyen *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) y *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC) (Rodríguez-Angeles *et al.*, 2002; Croxen *et al.*, 2013; Hebbelstrup Jensen *et al.*, 2014; Farfan *et al.*, 2016). A su vez, STEC contiene un subgrupo bacteriano designado como *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) que presenta tres características distintivas: enteroadherencia, producción de toxina Shiga y la pertenencia a los serotipos prioritarios: O26:H11, O45:H2, O103:H2, O111:H8, O121:H19, O145:H28 y O157:H7. (Delannoy *et al.*, 2013). La presentación clínica habitual de los patógenos bacterianos más frecuentes se muestra en la tabla 1.1.

Respecto de la presentación clínica de la infección por STEC, diversos autores han demostrado que las cepas O157 y no-O157 presentan diferencias en cuanto a severidad y duración del cuadro (Rivas *et al.*, 2006). Un estudio prospectivo basado en niños con diarrea demostró que la duración media del cuadro fue estadísticamente significativa fue mayor en niños infectados por cepas no-O157 (Klein *et al.*, 2002). De igual modo, un extenso relevamiento hospitalario sobre 28.000 casos de diarrea reportó que los casos infectados con STEC O157 presentaron diferencias significativas en frecuencia de diarrea sanguinolenta, hospitalización y SHU en comparación con los casos de diarrea infectados con STEC no-O157 (Hedican *et al.*, 2009).

Las infecciones virales entéricas son una causa frecuente de diarrea infantil. El espectro clínico de la enfermedad por Rotavirus es amplio y abarca desde una diarrea leve transitoria hasta una gastroenteritis severa con deshidratación y desequilibrio electrolítico. En los casos típicos, la enfermedad se manifiesta de forma abrupta, con fiebre y vómitos seguidos de diarrea explosiva y acuosa, sin sangre ni leucocitos. Los pacientes desnutridos, trasplantados o con inmunodeficiencias congénitas, pueden experimentar gastroenteritis severa y prolongada (Murray 2007; Bellido Blasco 2007).

De igual modo, los Adenovirus entéricos constituyen una causa de gastroenteritis viral aguda. La diarrea se presenta con fiebre y vómitos, pero no suele producir deshidratación. A diferencia de Rotavirus, el cuadro suele presentar una duración más prolongada (Mandell 2014; Bernaola *et al.*, 2013; Bellido Blasco 2007)

Tabla 1.1: Principales patógenos bacterianos y características clínicas de la infección entérica	
Patógeno	Presentación clínica
<i>Shigella</i> spp.	Diarrea disentérica con fiebre, náuseas, vómitos, tenesmo y dolor abdominal. El cuadro puede presentar complicaciones como perforación intestinal, megacolon tóxico y Síndrome Urémico Hemolítico (SHU).
<i>Salmonella enterica</i> (no tifoidea, SNT)	Diarrea con náuseas, fiebre y vómitos. La deshidratación severa puede presentarse en lactantes, ancianos e inmunocomprometidos. La bacteria puede producir diarrea prolongada o cuadros diseminados. La localización extraintestinal puede presentarse en el aparato cardiovascular (endocarditis), en el sistema osteoarticular (osteomielitis, artritis séptica), en el sistema nervioso central (meningoencefalitis) y en otros sitios (tracto genitourinario, hígado).
<i>E. coli</i> enteropatógena (EPEC)	Diarrea acuosa o mucosa, con vómitos, fiebre y deshidratación. La evolución puede ser aguda o persistente y producir pérdida de peso, malnutrición y deterioro del desarrollo pondoestatural.
<i>E. coli</i> enterotoxigénica (ETEC)	Diarrea acuosa, con vómitos y cólicos abdominales. El cuadro varía desde portador asintomático hasta enfermedad severa tipo cólera.
<i>E. coli</i> enteroagregativa (EAEC)	Diarrea acuosa o disentérica, de evolución aguda o persistente, con náuseas, anorexia, febrícula y tenesmo.
<i>E. coli</i> enteroinvasiva (EIEC)	Diarrea acuosa o disentérica, caracterizada por fuertes calambres abdominales, fiebre y tenesmo.
<i>E. coli</i> productora de toxina Shiga (STEC)	Diarrea sanguinolenta, colitis hemorrágica y SHU. El cuadro clínico inicia como diarrea, con vómitos, dolor abdominal y fiebre, que puede evolucionar a diarrea sanguinolenta. En 10% de los niños menores de 10 años puede desarrollar SHU, un trastorno grave que se caracteriza por insuficiencia renal aguda, trombocitopenia y anemia hemolítica microangiopática.
<i>Campylobacter</i> spp.	Diarrea acuosa o sanguinolenta, con vómitos, dolor abdominal, fiebre y tenesmo. La infección puede ser aguda o persistente y presentar complicaciones como bacteriemia o pancreatitis y se ha postulado su asociación con el Síndrome de Guillain-Barré.
<i>Aeromonas</i> spp.	Diarrea acuosa, disentérica o coleriforme, con vómitos y fiebre. La evolución puede ser aguda o prolongada. La infección puede diseminar produciendo sepsis, peritonitis, meningitis, neumonía o endocarditis.
<i>Vibrio cholerae</i>	Diarrea aguda con deposiciones profusas. La deshidratación progresa rápidamente. Las complicaciones de las formas graves comprenden hipoglucemia, shock hipovolémico, fallo renal agudo y muerte.
<i>Yersinia</i> spp.	La enterocolitis es la forma clínica más habitual y se caracteriza por diarrea con fiebre y dolor abdominal. La evolución puede ser aguda o persistente. La eliminación fecal varía entre 2 semanas y 3 meses. Otras presentaciones incluyen ileitis, adenitis mesentérica y sepsis. Las complicaciones autoinmunes frecuentes son artritis reactiva y glomerulonefritis proliferativa.
Rodríguez-Ángeles <i>et al.</i> , 2002; Murray 2007; Hebbelstrup Jensen <i>et al.</i> , 2014; Mandell 2014; Lopardo <i>et al.</i> , 2016; Farfan <i>et al.</i> , 2016	

La trascendencia clínica de las parasitosis intestinales presenta gran variabilidad y puede estar relacionada con diversos factores como el tipo de parásito involucrado, el grado de infección entérica, la edad, el estado inmune o nutricional del hospedador (Ochoa *et al.*, 2004; Mukhopadhyay *et al.*, 2007; Pawlowski *et al.*, 2009). Las parasitosis intestinales pueden producirse por la ingestión de quistes/ooquistes de protozoos, huevos de helmintos o por la penetración de larvas por vía transcutánea. Cada parásito realiza un recorrido específico en el hospedador, afectando diversos órganos y sistemas (Abba *et al.*, 2009). Particularmente, esta investigación se ha enfocado en los protozoos y helmintos que infectan con mayor frecuencia a la población pediátrica y que tienen una repercusión directa en el aparato digestivo. La presentación clínica típica de los parásitos entéricos más frecuentes se muestra en la tabla 1.2.

Tabla 1.2: Principales patógenos parasitarios y características clínicas de la infección entérica	
Patógeno	Presentación clínica
<i>Giardia intestinalis</i>	Diarrea aguda líquida con moco, fétida y esteatorreica, acompañada de dolor abdominal. La infección intestinal persistente se asocia con anemia, malabsorción y deterioro del desarrollo pondoestatural.
<i>Cryptosporidium</i> spp.	La infección intestinal cursa con diarrea acuosa, con dolor abdominal, fiebre, vómitos, deshidratación y pérdida de peso. La persistencia del cuadro es más frecuente en población con signos de inmunosupresión.
<i>Entamoeba histolytica</i>	La colitis amebiana disintérica presenta diarrea disintérica con dolor abdominal y tenesmo. En pacientes desnutridos o inmunodeprimidos puede evolucionar a cuadros fulminantes con perforación intestinal.
<i>Blastocystis</i> spp.	El significado clínico de la infección por <i>Blastocystis</i> aún es materia de debate. La infección se puede asociar a diarrea, dolor abdominal, vómitos, flatulencia, proctosigmoiditis hemorrágica y urticaria crónica.
<i>Ascaris lumbricoides</i>	El cuadro puede incluir dolor abdominal, vómitos y diarrea ocasional. Los síntomas intestinales dependen del grado de parasitación.
<i>Trichuris trichiura</i>	La clínica es variable, infección asintomática, diarrea intermitente con dolor abdominal o diarrea disintérica con riesgo de prolapso rectal. Los síntomas intestinales dependen del grado de parasitación.
Uncinarias	El cuadro puede presentarse con dolor epigástrico, náuseas, pirosis y diarrea ocasional. Los síntomas intestinales dependen del grado de parasitación.
<i>Strongyloides stercoralis</i>	Las manifestaciones digestivas incluyen dolor epigástrico, vómitos, anorexia, diarrea intermitente. La intensidad de la sintomatología está en relación con el grado de parasitosis y el estado inmune.
Cestodes	La sintomatología es inespecífica y puede incluir meteorismo, náuseas, dolor abdominal y diarrea ocasional.
Stenzel <i>et al.</i> , 1996; Kuo <i>et al.</i> , 2008; Stensvold <i>et al.</i> , 2011; Stensvold <i>et al.</i> , 2013; Alfellani <i>et al.</i> , 2013; Mandell 2014, Socías <i>et al.</i> , 2014.	

1.4-Aspectos patogénicos de la diarrea infecciosa

Las infecciones gastrointestinales comprenden una amplia variedad de complejos sintomáticos y de agentes infecciosos (Sherris 2010; Mandell 2014). Los mecanismos patogénicos que ocasionan un cuadro diarreico infeccioso son diversos y están relacionados con los agentes causales que la producen (Riverón Corteguera *et al.*, 1999). En general, los cuadros diarreicos infecciosos se generan por diversos mecanismos que pueden actuar en forma independiente o sinérgica. Entre ellos se mencionan la adherencia intestinal, la producción de enterotoxinas y citotoxinas, o la invasión y destrucción celular, entre otros.

La adherencia como mecanismo patogénico ha sido descrita en varios agentes etiológicos de diarrea como EPEC, ETEC, EAEC y STEC (figura 1.4). La característica histopatológica típica de EPEC implica la adherencia íntima de la bacteria a la superficie apical del enterocito, con la consiguiente formación de los pedestales celulares. Dicho fenómeno está dirigido por una isla de patogenicidad, conocida como el locus de borramiento de los enterocitos (LEE), que codifica para la intimina (*eae*) y numerosas proteínas reguladoras y efectoras (Deng *et al.*, 2004; Farfán *et al.*, 2016). Dichos cambios estructurales deforman la vellosidad, disminuyen la superficie de absorción y contribuyen al cuadro diarreico (Rodríguez-Ángeles *et al.*, 2002, Murray 2010; Farfán *et al.*, 2016).

El patógeno ETEC se adhiere a los enterocitos mediante factores de colonización denominados CFA, estructuras proteicas que intervienen en la adherencia bacteriana a los receptores (fibronectina, glicoesfingolípidos y glicoproteínas) de las células epiteliales lo que permite la colonización del intestino delgado y la liberación de toxinas (Riverón Corteguera 1999; Croxen *et al.*, 2013).

El mecanismo patogénico mediado por adherencia al epitelio intestinal también puede ser realizado por varios protozoos (figura 1.5). Por ejemplo, *G. intestinalis* posee el disco suctor, una estructura única, que le permite adherirse al epitelio intestinal. Dicho proceso incrementa la apoptosis celular, la ruptura de

las uniones estrechas entre los enterocitos, aumenta la permeabilidad transepitelial y contribuye al cuadro de diarrea (Cotton *et al.*, 2011; Molina y Basualdo 2013). Asimismo, la patogenia de la amebiasis por *E. histolytica* está basada en la adherencia, citólisis dependiente del contacto y fagocitosis celular (Guerrant *et al.*, 1981; Petri *et al.*, 1989; Mandell 2014).

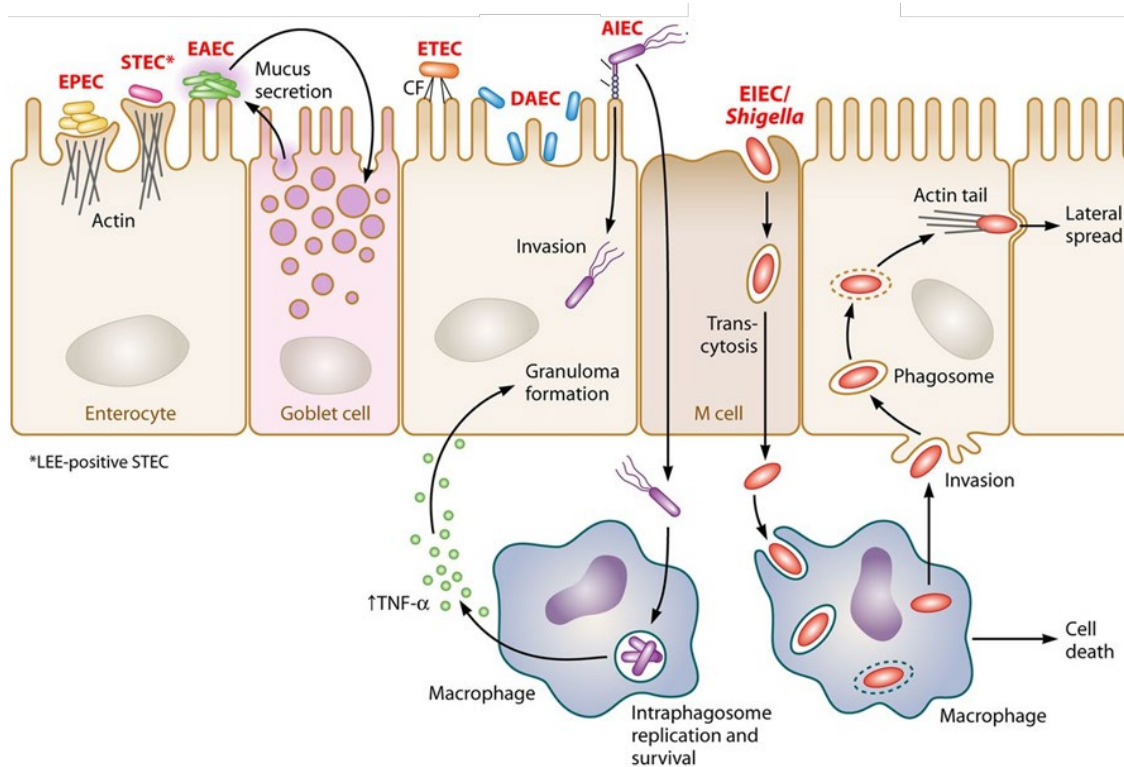


Figura 1.4: mecanismos de adherencia y lesión intestinal de *Escherichia coli* diarreigénica. *E. coli* enteropatógena (EPEC) y *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC) mediante la formación de pedestales, *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) mediante factores de colonización y *E. coli* enteroagregativa (EAEC) mediante agregación y formación de biofilm. *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) y *Shigella* spp. producen diarrea por mecanismos invasivos (extraído de Croxen *et al.*, 2013)

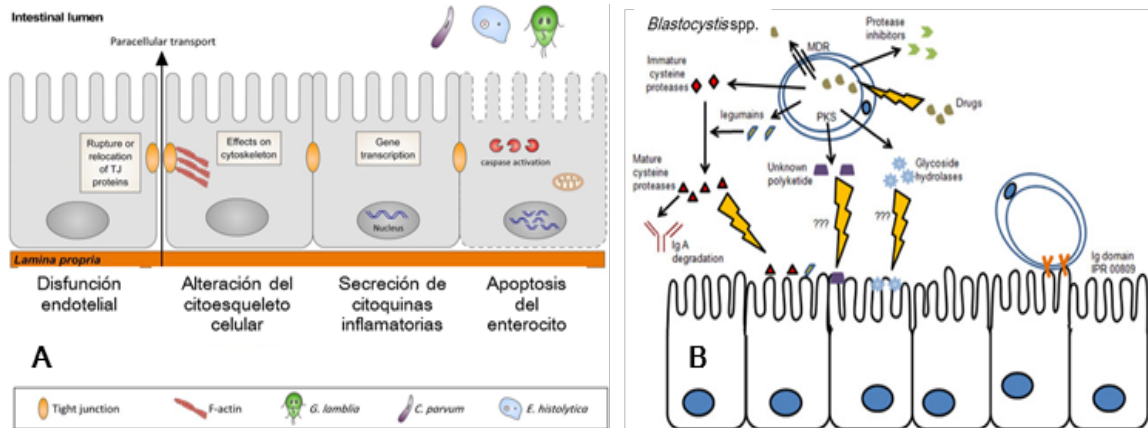


Figura 1.5: mecanismos de adherencia y lesión intestinal. A: *G. intestinalis*, *Cryptosporidium* spp. y *E. histolytica*. B: *Blastocystis* spp. Estos protozoos son capaces de producir disfunción endotelial, alteración del citoesqueleto, secreción de citoquinas inflamatorias y apoptosis de los enterocitos. (extraído de Denoed *et al.*, 2011; Di Genova *et al.*, 2016, Del Coco *et al.*, 2017)

Las enterotoxinas poseen un efecto directo sobre la mucosa produciendo la secreción neta de agua y electrolitos. Los patógenos entéricos productores de enterotoxinas incluyen *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *Shigella* spp., *S. enterica* y *V. cholerae* (Riverón Corteguera *et al.*, 1999; Rodríguez-Angeles *et al.*, 2002; Sherris 2010; Croxen *et al.*, 2013).

Por ejemplo, ETEC sintetiza dos clases de enterotoxinas: toxina termolábil (LT) y toxina termoestable (ST) (figura 1.6). La LT posee una función y estructura semejante a la toxina del cólera, mientras que la ST es un pequeño péptido que presenta dos variedades (Stp y Sth). Ambas toxinas (LT y ST) producen un incremento de la secreción de cloruro y una disminución de la absorción de sodio, eventos que conducen a una diarrea secretoria (Söderblom *et al.*, 2005; Murray 2007; Sherris 2010; Croxen *et al.*, 2013; Mandell 2014).

Asimismo, el patotipo EAEC produce diversas toxinas. Entre ellas, se mencionan la enterotoxina termoestable 1 (EAST1), una proteína que induce diarrea de manera similar a la ST de ETEC, la toxina Pic, una enterotoxina con actividad mucinolítica y de aglutinina y la toxina ShET1, una toxina con estructura AB₅, cuyo mecanismo podría involucrar la señalización a través del óxido nítrico (Nataro *et al.*, 1992; Czczulin *et al.*, 1997; Nataro *et al.*, 1998; Bernier *et al.*, 2002; Rodríguez-Ángeles *et al.*, 2002; Farfán *et al.*, 2016).

Por el contrario, las citotoxinas producen la destrucción de la mucosa intestinal. La toxina Shiga (Stx) es una citotoxina producida por *S. dysenteriae* que inhibe la síntesis proteica del enterocito y participa en la destrucción de la mucosa colónica (figura 1.6). *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC) produce citotoxinas de estructura AB₅ denominadas toxinas Shiga (Stx1, Stx2, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f, Stx2g, y Stx2h) (Rodríguez-Ángeles *et al.*, 2002; Rivas *et al.*, 2006; Murray 2010; Croxen *et al.*, 2013).

Otras citotoxinas productoras de diarrea inflamatoria son la toxina codificada por plásmidos (PET) de EAEC, la enterotoxina citotóxica (Act) de *Aeromonas spp.*, las toxinas de *Clostridiodes difficile* y la toxina de *Vibrio parahaemolyticus*. En años recientes se ha descrito otros factores de virulencia como la citolisina A (ClyA) involucrada en la formación de poros, inducción de apoptosis en los macrófagos y actividad hemolítica (Söderblom *et al.*, 2005; Croxen *et al.*, 2013). Además de los efectos directos sobre la integridad de la mucosa, la ruptura de las uniones estrechas y del citoesqueleto, las citotoxinas pueden desencadenar una cascada de inflamación en el epitelio intestinal, que contribuye a las manifestaciones clínicas de la infección (Riverón Corteguera *et al.*, 1999; Croxen *et al.*, 2013; Mandell 2014).

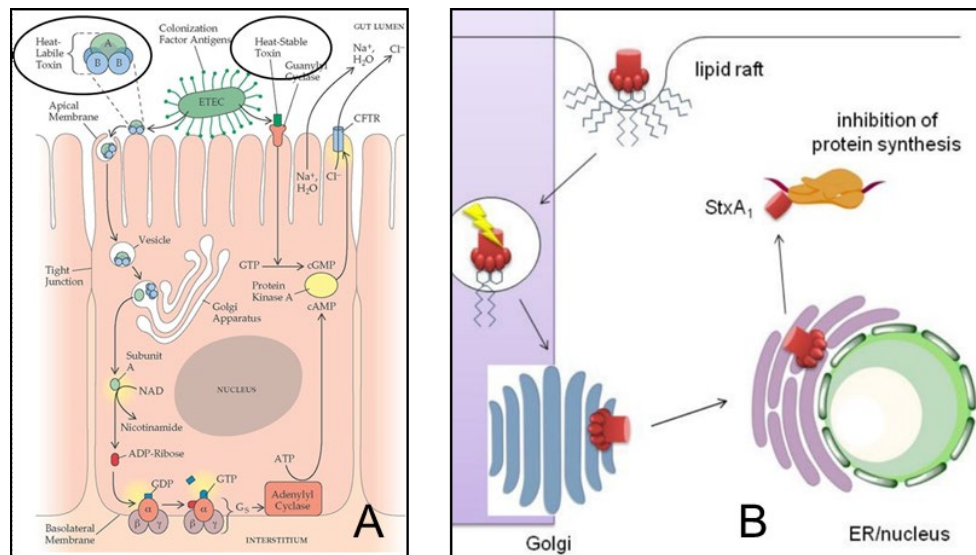


Figura 1.6: A: mecanismo de acción de las toxinas LT y ST de ETEC (secreción de agua y electrolitos). B: mecanismo de acción de la toxina Shiga de STEC y *S. dysenteriae* (inhibición de síntesis proteica) (extraído de Rodríguez *et al.*, 2002; Croxen *et al.*, 2013)

Otro mecanismo patogénico de diarrea es el invasivo. Como consecuencia de la invasión de los enterocitos, las bacterias provocan una respuesta inflamatoria importante asociada a la destrucción de la mucosa intestinal (Sherris 2010; Mandel 2014; Lopardo *et al.*, 2016). Por ejemplo, EIEC tiene la capacidad de invadir el epitelio del intestino grueso, lisis la vacuola citoplasmática y liberarse al citoplasma celular (figura 1.4). Los genes para la invasión y la diseminación están codificados en el plásmido Ipa (antígeno plasmídico de invasión) (Croxen *et al.*, 2013; Farfán *et al.*, 2016). Estudios genómicos han indicado que varios genes de la familia ipaH están localizados en dicho plásmido y en el cromosoma bacteriano. La función biológica de dichos genes no se halla completamente dilucidada, sin embargo, se ha postulado actúa en forma sinérgica con otros factores de virulencia para modular las respuestas inflamatorias del hospedador (Ashida *et al.*, 2007). Asimismo, la lesión por daño directo de la célula epitelial tiene lugar en las infecciones por *G. intestinalis*, *Cryptosporidium* spp., *C. cayetanensis* y Microsporidios (Mukhopadhyay *et al.*, 2007; Molina y Basualdo 2013; Mandell 2014).

La destrucción selectiva de las células absortivas de la mucosa, sin afectar las células secretoras es un mecanismo de patogenia utilizado por Rotavirus y Norovirus. Ambos virus infectan las células del extremo de las vellosidades, modifican el equilibrio de absorción y reducen las enzimas digestivas del borde en cepillo (Davidson *et al.*, 1979, Pawloski *et al.*, 2009; Sherris 2010; Mandell 2014).

La infección por rotavirus afecta principalmente a los enterocitos maduros en la superficie de las vellosidades intestinales. Los estudios histológicos revelan atrofia de las microvellosidades, disminución de la relación vellosidad/cripta e infiltración de células mononucleares en la lámina propia. La destrucción de las células afectadas reduce la digestión y absorción de nutrientes, lo que provoca diarrea secretoria con pérdida de líquidos y electrolitos por vía intestinal (figura 1.7) (Bellido Blasco 2007; Murray 2007).

Existe escasa información acerca de los mecanismos fisiopatológicos involucrados en las infecciones por adenovirus entéricos. Estudios *in vitro* han reportado que dichos virus infectaban células epiteliales con microvellosidades, concentrándose a nivel de estas y produciendo una alteración en el ribete en cepillo. La actividad tóxica de la pentona puede producir la inhibición del transporte celular del ARNm y de la síntesis proteica celular, el cambio morfológico de la célula y las lesiones tisulares típicas de la infección (Murray 2007; Mandell 2014)

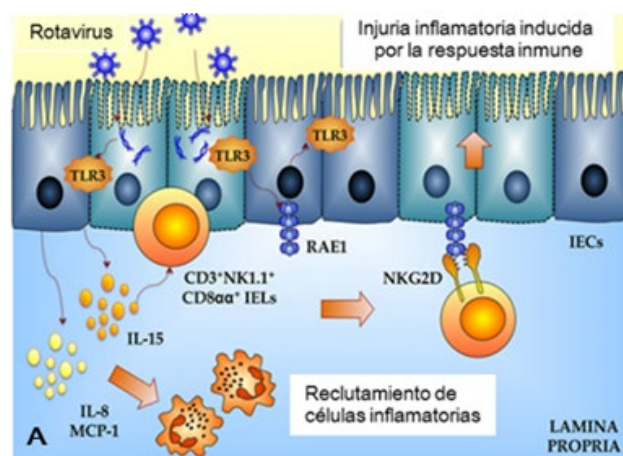


Figura 1.7: mecanismo de injuria inflamatoria causada por Rotavirus (extraído de Villena *et al.*, 2016)

Dicho mecanismo también suele estar presente en otras infecciones del intestino delgado que se asocian con el aplanamiento del extremo de las vellosidades o con la destrucción de microvellosidades, como las infecciones por EPEC, *G. intestinalis*, *Cryptosporidium* spp. y *S. stercoralis* (Murray 2007; Pawlovski *et al.*, 2009; Molina y Basualdo 2013; Mandell 2014).

Numerosos patógenos entéricos provocan una intensa respuesta inmunológica por parte del hospedador, que puede exacerbar o mitigar el cuadro diarreico. La invasión por *Shigella* spp., *S. enterica* y *E. histolytica* causan la liberación de un amplio número de citoquinas proinflamatorias (Jung *et al.*, 1995; Riverón Corteguera *et al.*, 1999; Sherris 2010; Lopardo *et al.*, 2016). Más aún, se ha demostrado que la infección entérica por los patógenos EAEC, EPEC, EIEC, *C. difficile*, *G. intestinalis*, *Cryptosporidium* spp., *Blastocystis* spp. y *E. histolytica* causa un incremento de interleuquina 8 (IL-8) (Hashmey *et al.*, 1997; Molina y Basualdo 2013; Dey *et al.*, 2014; Del Cocco *et al.*, 2017). Esta sustancia provoca una acumulación de neutrófilos en la lámina propia que pueden lesionar el tejido del hospedador directamente o estimular la secreción de cloruros a la luz intestinal. Incluso otros patógenos no invasores y no toxigénicos como *Cryptosporidium* spp. pueden estimular la secreción de prostaglandinas que provocan una diarrea secretora en pacientes infectados (Guarino *et al.*, 1994; Mandell 2014).

En las infecciones por helmintos, la patología intestinal se caracteriza por alteraciones en la mucosa con atrofia de las vellosidades, disminución de la profundidad de las criptas, hiperplasia de células caliciformes y eosinofilia (Lagundoye *et al.*, 1972; Stephenson *et al.*, 1983; Maizels *et al.*, 2003; Artis *et al.*, 2008). Sin embargo, la vasta mayoría de los nematodos y platelmintos intestinales presentan infecciones asintomáticas o con síntomas leves. Esta diferencia sustancial con los patógenos entéricos bacterianos, virales y protozoarios se basa en varios aspectos de la interacción entre el hospedador y el parásito como, por ejemplo, la estrecha relación entre la presentación clínica y la carga parasitaria (Hashmey *et al.*, 1997; Maizels *et al.*, 2003). En general, las infecciones por helmintos de intensidad leve se asocian con escasa signosintomatología (Urbani

et al., 2001; Craig *et al.*, 2007). De igual modo, la presencia de síntomas solamente es observada en cuadros de hiperinfección con *S. stercoralis* (Hashmey *et al.*, 1997). Más aún, otros autores han señalado la mayor vida media del helminto, las dimensiones de los organismos, la multiplicidad de sus antígenos y la cronicidad de la infección. Asimismo, diversas investigaciones recientes han demostrado la capacidad parasitaria para inducir un estado de inmunomodulación en el hospedador, que conlleva una disminución de las manifestaciones clínicas de la infección entérica (Else *et al.*, 1994; Finkelman *et al.*, 1997; Helmbly *et al.*, 2001; Maizels *et al.*, 2003; Jackson *et al.*, 2004; Anthony *et al.*, 2007; Artis *et al.*, 2008; Nutman *et al.*, 2015).

1.5-Diagnóstico etiológico de las infecciones entéricas

En las últimas décadas se han concretado numerosos avances en el conocimiento de los agentes etiológicos bacterianos, virales y parasitarios capaces de causar enfermedad gastrointestinal. Con el desarrollo de nuevas herramientas diagnósticas se ha obtenido información esencial para el conocimiento de la etiología, la patogenia y la epidemiología de las infecciones gastrointestinales (Konemann 2008; Lopardo *et al.*, 2016).

La utilidad del diagnóstico etiológico de las diarreas infecciosas se centra en dos perspectivas relevantes: el enfoque clínico, para la atención y el seguimiento de los pacientes, en particular frente a los casos que requieren tratamiento antimicrobiano; y el enfoque de salud pública, orientado al control de brotes, la vigilancia epidemiológica y los estudios sobre vacunas (Longstreth *et al.*, 2006). En ambos casos, el diagnóstico de certeza se obtiene mediante diversos estudios de laboratorio que incluyen la observación macroscópica de las heces (forma, consistencia); la observación microscópica en fresco (presencia fecal de leucocitos, hematíes), las coloraciones permanentes (Tinciones de Giemsa, Azul de Metileno, Ziehl Neelsen, Tricrómica, Gram Cromotrópica); el cultivo de materia fecal (bacterias enteropatógenas, larvas de helmintos); las

técnicas inmunológicas (identificación de serotipos bacterianos, detección de antígenos virales) y la amplificación de ácidos nucleicos del patógeno mediante métodos moleculares (detección del patógeno, identificación de factores de virulencia) (Murray 2007; Konemann 2008; Mandell 2014; Lopardo *et al.*, 2016).

El estudio de bacterias patógenas en un cuadro diarreico comienza con la detección de leucocitos y hemáties fecales. Esta práctica clínica suele utilizarse como método de rutina para el diagnóstico presuntivo de diarrea invasiva. Sin embargo, diversos autores han cuestionado la validez de esta premisa indicando la baja sensibilidad de la prueba y la dependencia del resultado con la demora en el procesamiento de la muestra (Mel 2000; Khan *et al.*, 2006; Carreazo *et al.*, 2011).

El rendimiento del cultivo bacteriano en la población con diarrea ha presentado resultados variables entre 8% y 82%. Valores inferiores a 30% de positividad fueron observados en países desarrollados como Canadá, Estados Unidos y Noruega, mientras que los porcentajes más elevados se reportaron en Grecia, Taiwán, México y Kenia (Afset *et al.*, 2003; Klein *et al.*, 2006; Slinger *et al.*, 2017, Schilling *et al.*, 2017). En países de Latinoamérica como Cuba, Perú y Venezuela la frecuencia de aislamiento de patógenos por cultivo varió entre 33% y 65% (Flores-Abuxapqui *et al.*, 1994; González Corona *et al.*, 2002; Carreazo *et al.*, 2011; Michelli *et al.*, 2016).

En Argentina, los reportes oficiales del Ministerio de Salud indicaron un rendimiento de cultivo en diarreas bacterianas variable entre 20% y 60%. Los patógenos detectados con mayor frecuencia en población con diarrea fueron *Shigella* spp., EPEC y *S. enterica* (MSAL 2012). Sin embargo, la frecuencia de positividad del coprocultivo puede presentar diferencias según la edad de los casos. Un extenso trabajo sobre niños de Kenia, enrolados en el Estudio Multicéntrico Entérico Global (GEMS), demostró que la edad del niño con diarrea tenía una asociación muy significativa con la presencia de patógenos entéricos (Schilling *et al.*, 2017). Además, diversos estudios etiológicos en niños menores

de 5 años con diarrea reportaron una frecuencia de aislamiento bacteriano entre 33% y 82%, mientras que dicho valor fue inferior a 17% cuando se incluyó la población de mayor edad (Maltezou *et al.*, 2001; González Corona *et al.*, 2002; Giugno y Oderiz 2010; Carreazo *et al.*, 2011; Slinger *et al.*, 2017).

La serotipificación constituye un importante complemento de la identificación bioquímica y desde el punto de vista epidemiológico permite determinar la prevalencia de una serovariedad bacteriana en distintas zonas geográficas, como así también es de gran utilidad para el estudio de brotes. Estos métodos son utilizados habitualmente con bacterias enteropatógenas como *E. coli*, *Shigella* spp. o *S. enterica*. En el caso de *E. coli* se han identificado más de 700 serotipos, sin embargo, se ha señalado una pobre relación entre el serotipo bacteriano y la patogenia de la enfermedad intestinal, excepto para STEC (Murray 2007; Croxen *et al.*, 2013; Lopardo *et al.*, 2016).

El diagnóstico molecular tiene un papel emergente en los laboratorios de diagnóstico microbiológico. Estas técnicas han demostrado consistentemente una elevada sensibilidad en comparación con los métodos tradicionales y constituyen una herramienta de gran valor, tanto en el diagnóstico de las infecciones gastrointestinales, como en la detección de nuevos patotipos emergentes de *E. coli*. El extenso brote de *E. coli* O104:H4 en Alemania puso de manifiesto la importancia de las cepas EAEC capaces de producir toxina Shiga. La caracterización genética de estos aislamientos permitió identificar factores de virulencia de dos patotipos (EAEC y STEC), sugiriendo que la cepa O104:H4 asociada con el brote alemán de 2011 se denomine *E. coli* hemorrágica enteroagregativa (EAHEC) (Bielaszewska *et al.*, 2011; Brzuszkiewicz *et al.*, 2011; Frank *et al.*, 2011; Steyert *et al.*, 2012).

En la práctica clínica, los métodos fenotípicos y serológicos permiten la detección de EPEC y *E. coli* O157, mientras que los otros patotipos requieren la amplificación génica de factores de virulencia para su detección en la población con diarrea (Konemann 2008; Croxen *et al.*, 2013; Lopardo *et al.*, 2016). En

Argentina, los métodos moleculares no se utilizan para el diagnóstico de rutina de patógenos entéricos, por lo tanto, se desconocen las frecuencias de infección y la presentación clínica de los patotipos EAEC, ETEC y EIEC en niños con diarrea del país. La evidencia ha demostrado que la severidad de la enfermedad varía según el serotipo de STEC involucrado. Sin embargo, los STEC no-O157 no se pesquisan de manera rutinaria en los laboratorios de diagnóstico de Argentina, por lo tanto, el impacto clínico de los aislamientos de *E. coli* no-O157 en el país permanece indefinido.

Los métodos habituales de diagnóstico virológico se basan en la detección de antígenos virales mediante ensayos inmunológicos como ELISA, aglutinación o inmunocromatografía. Estos métodos han sido incorporados en los establecimientos de salud por su simplicidad y rapidez para el diagnóstico de gastroenteritis viral (Murray 2007; Konemann 2008).

La detección de parásitos entéricos habitualmente se realiza mediante la observación microscópica de las heces. Sumado a ello, las coloraciones permanentes como las tinciones de Ziehl-Neelsen, Kinyoun, Tricrómica o Gram Cromotrópica favorecen la detección de coccidios y microsporidios (Becker *et al.*, 2013). El diagnóstico de *S. stercoralis* presenta mayor complejidad porque requiere la aplicación de técnicas de concentración específicas con heces frescas. Entre ellas, se mencionan la técnica de Baermann, basada en el hidrotropismo parasitario y la técnica de cultivo en placa de agar (CPA) que presenta la mayor recuperación de larvas de dicho helminto (Becker *et al.*, 2013; Shane *et al.*, 2017).

En resumen, las infecciones gastrointestinales engloban una amplia variedad de complejos sintomáticos y de agentes infecciosos. Por ende, en los laboratorios de diagnóstico, la selección de los patógenos a investigar debe considerarse en base a una combinación de factores demográficos, clínicos, epidemiológicos y de infraestructura disponible, en coordinación con las autoridades de salud pública de la región.

1.6-Aspectos espaciales y temporales de las enfermedades diarreicas

Las enfermedades infecciosas pueden agruparse de acuerdo a criterios taxonómicos o clínicos. Estas clasificaciones son adecuadas desde el punto de vista del diagnóstico etiológico o del tratamiento antimicrobiano. Sin embargo, desde la perspectiva de la salud pública, y en particular, de la vigilancia epidemiológica, es necesario considerar los contextos demográficos, sociales, espaciales y temporales de la infección (Parkes *et al.*, 2003; Hunter *et al.*, 2005; Eisenberg *et al.*, 2007). Los elementos clave del medio ambiente como la temperatura, las precipitaciones, la humedad relativa, las inundaciones, el tipo de suelo, las condiciones ecológicas y geológicas, entre otros numerosos factores, pueden dar una visión global para identificar la distribución espacial y temporal del agente patógeno en la naturaleza y, por lo tanto, conocer el riesgo de la enfermedad en un determinado ambiente (Ostfeld *et al.*, 2005).

Los factores de riesgo más relevantes para el estudio de las enfermedades diarreicas son el saneamiento inadecuado, la falta de agua potable y la higiene deficiente (Fuller *et al.*, 2014). Diversos trabajos han reportado la relación entre las condiciones higiénico-sanitarias y la elevada frecuencia de diarrea. Estudios realizados en Brasil y Bangladesh reportaron que las personas que habitan en viviendas con baño o letrina tuvieron un comportamiento más higiénico que aquellos que no los tenían. Además, las condiciones insalubres de las letrinas, la falta de agua segura, los escasos hábitos de higiene y la presencia de residuos en el domicilio se asociaron significativamente con los episodios de diarrea aguda en los barrios marginales de India, Etiopía, Jordania, Bangladesh, Libia, Ruanda, Sudáfrica y Nigeria (von Schirnding *et al.*, 1991; Gupta *et al.*, 1998; Kumar *et al.*, 2011; Adane *et al.*, 2017; Shrivastava *et al.*, 2017; Mokomane *et al.*, 2018).

La ciudad de Tandil posee una superficie urbanizada irregular y presenta un crecimiento heterogéneo con las limitaciones que impone el relieve (Vapnarsky y Gorojovsky 1990; Velázquez *et al.*, 1998). En las últimas dos décadas, Tandil ha

crecido de forma continua y heterogénea, con un mayor crecimiento en los faldeos serranos. Los patrones territoriales parecen indicar un tipo de crecimiento horizontal disperso con una clara diferenciación espacial entre el norte y el sur de la ciudad (Lan 2011). La estructura de crecimiento poblacional de Tandil presenta similitudes con la de otras ciudades intermedias de Buenos Aires y sirve como modelo de estudio de las diarreas pediátricas en un área urbana del interior de la provincia.

Diversos autores han categorizado el espacio urbano de Tandil en regiones geográficas delimitadas según las dimensiones socioeconómica, habitacional y espacial (figura 1.8, 1.9 y 1.10). La región periférica de la ciudad estuvo conformada por un cinturón poblacional externo con alta exclusión territorial y diversos barrios populares (figura 1.11). La región central ocupó gran parte del casco urbano y la región sur estuvo constituida por la zona comercial y financiera de la ciudad (Linares *et al.*, 2007; Lan 2011; Fernández y Ramos 2013).

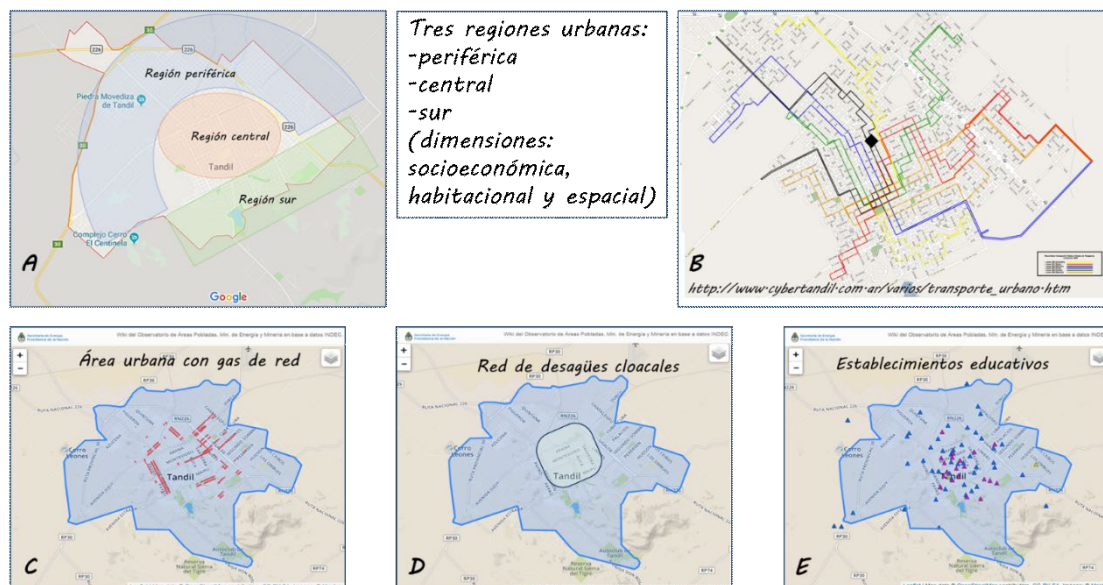


Figura 1.8: mapa de Tandil. A: regiones urbanas periférica, central y sur en base a dimensiones socioeconómica, habitacional y espacial. B: líneas de transporte urbano. C: área urbana con suministro de gas de red (rojo). D: área urbana central con red de desagües cloacales. E: establecimientos educativos de la ciudad. (Linares *et al.*, 2007; Banda Noriega y Díaz A, 2010; Lan 2011; Fernández y Ramos 2013).



Figura 1.9: fotografías de la región central y sur de Tandil.



Figura 1.10: fotografías de la región periférica de Tandil.

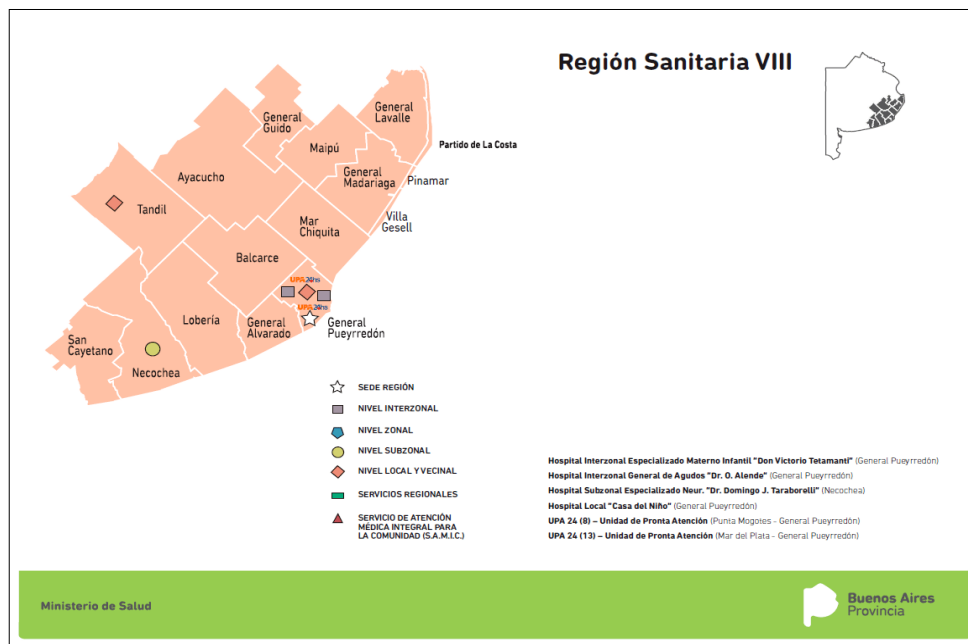


Figura 1.12: mapa de la región sanitaria VIII, Ministerio de Salud, provincia de Buenos Aires, Argentina.



Figura 1.13: fotografía del frente del Hospital de Niños Debilio Blanco Villegas de Tandil. Página Web del Hospital de Niños Debilio Blanco Villegas. http://hospitaldbv.hrsantamarina.org.ar/?page_id=1716

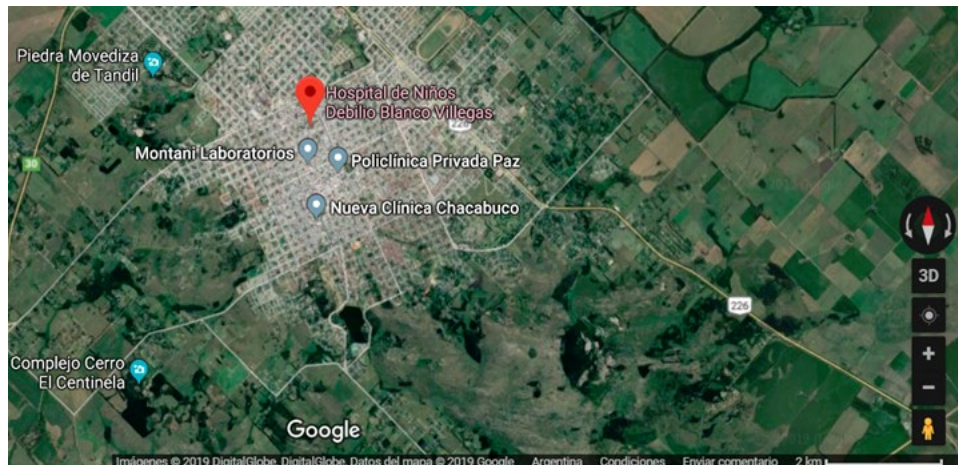


Figura 1.14: mapa de Tandil. Ubicación geográfica del Hospital de Niños Debilio Blanco Villegas.

Las infecciones gastrointestinales pueden ser adquiridas por la vía fecal-oral, mediante el consumo de agua o alimentos contaminados con desechos fecales o el contacto directo con personas o animales portadores de patógenos entéricos (Onozuka y Hashizume 2011; Ghazani *et al.*, 2018). Asimismo, el contacto con agua en actividades recreativas como factor de riesgo de infecciones bacterianas infantiles ha sido señalado por diversos autores (Denno *et al.*, 2009; Olds *et al.*, 2018).

En Ghana, Osei y Stein (2017) estudiaron los patrones geográficos y las áreas de alta densidad de diarreas durante cuatro años. Los autores informaron una asociación significativa entre la frecuencia de diarrea y la falta de urbanización, señalando una mayor presencia de dichos cuadros en áreas periurbanas con deficiencias en los servicios sanitarios. Asimismo, en Etiopía, Beyene *et al.* (2018) investigaron la distribución espacial de las diarreas. Los autores hallaron una asociación significativa de la diarrea en niños de tres áreas geográficas con la calidad del agua de consumo y el contacto con animales de granja.

La exposición a la contaminación fecal en áreas públicas, especialmente en entornos urbanos densos, puede contribuir significativamente al riesgo de infección entérica. Berendes *et al.* (2018) examinaron las asociaciones entre el saneamiento y la contaminación fecal en entornos públicos en cuatro barrios de bajos ingresos en Ghana. Los autores hallaron una mayor concentración de microorganismos fecales en áreas con escasa infraestructura sanitaria. Similares resultados fueron publicados por Fontoura *et al.*, (2018) en niños con diarrea de barrios marginales de Brasil.

La ciudad de Tandil se abastece de aguas subterráneas, ya que no dispone de recursos hídricos superficiales con características apropiadas para su explotación. Debido a la hidrogeografía de la región, la distribución de dicho recurso se divide en subsistemas con estaciones de bombeo que impulsan el agua a cotas más elevadas (Barranquero *et al.*, 2009). La escasa cobertura de la red cloacal en Tandil implica que una fracción importante de la población debe disponer la eliminación de sus efluentes domiciliarios sin ningún tipo de tratamiento (pozo absorbente). Esta situación se ve agravada en aquellas viviendas que carecen de agua potable de red, ya que las excretas pueden filtrar a las napas de agua y contaminar los acuíferos subterráneos. Los dos sectores de Tandil que carecen del servicio de agua de red y de cloacas incluyen los barrios periféricos que rodean el centro urbano y los barrios recientes con alto valor inmobiliario, ubicados en la región sur de la ciudad (figura 1.8) (Banda Noriega *et al.*, 2008). Las características sanitarias de Tandil presentan semejanzas con las de otras áreas urbanas y ofrecen un modelo de estudio epidemiológico de la perspectiva espacial de diarreas pediátricas en una ciudad intermedia de Buenos Aires.

Numerosos estudios han indicado que las enfermedades diarreicas están relacionadas con las variables climáticas como la temperatura, la humedad y las precipitaciones (Valcour *et al.*, 2002; Mathieu *et al.*, 2004; Kovatz *et al.*, 2004; Tam *et al.*, 2006; Fisman *et al.*, 2007; Naumova *et al.*, 2007; Chaikaew *et al.*, 2009; Onozuka *et al.*, 2011; Hall *et al.*, 2011a; Lal *et al.*, 2012; Pardhan-Ali *et al.*, 2012;

Alexander *et al.*, 2013; Kotloff *et al.*, 2013; Azage *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2015; Carlton *et al.*, 2016).

Un ejemplo reciente fue publicado en 2018 por Ghazani *et al.* que examinaron la relación entre las enfermedades gastrointestinales y las variables climáticas en Escocia, Australia, Japón, Suiza, Estados Unidos, Micronesia, Vietnam y China. Los autores hallaron un aumento de la incidencia de diarrea bacteriana con el incremento de la temperatura, mientras que la humedad relativa y las precipitaciones mostraron resultados variables frente a dicho cuadro.

Sin embargo, la asociación entre diarrea y clima puede verse afectada por diversos factores como el tipo de patógeno, las temperaturas ambientales máximas y mínimas, la radiación solar, la altitud, las precipitaciones y la latitud geográfica (Ozonuka y Hagihara 2015). El clima de Tandil pertenece a la categoría de templado oceánico, con veranos cálidos y sin estación seca, y corresponde a la categoría Cfb según el sistema Köppen-Geiger (Peel *et al.*, 2007). Este tipo de clima solamente se halla en el sudeste de la provincia de Buenos Aires (incluyendo la ciudad de Tandil) y en el sudoeste de la provincia de Santa Cruz (figura 1.15).

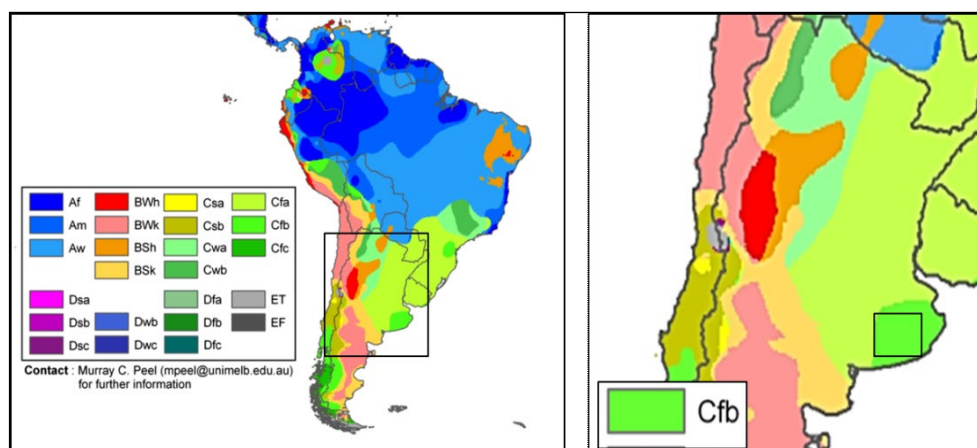


Figura 1.15: Mapas de la clasificación de climas según el sistema Köppen-Geiger (Peel *et al.*, 2007). **Izquierda:** Sudamérica. **Derecha:** detalle del clima Cfb de la región en estudio.

Los mapas se emplean desde hace siglos como herramienta gráfica que otorgan una visión de conjunto de uno o varios eventos relacionados. En las últimas décadas, la cantidad de datos espaciales que han sido almacenados en forma digital se ha incrementado exponencialmente debido al rápido desarrollo de nuevas tecnologías (Lemus *et al.*, 2008; Buzai *et al.*, 2012; Cromley y McLafferty 2012; De Elia *et al.*, 2014).

La representación gráfica de los eventos de salud puede realizarse de diversas formas. La forma más sencilla de graficar los casos individuales de una enfermedad como la diarrea infecciosa es mediante la utilización de puntos o símbolos con diferentes colores o formas. Sin embargo, estos mapas no permiten identificar en forma clara, las áreas geográficas con alta concentración de eventos (áreas calientes o *hotspots*) debido a la superposición de puntos entre casos muy cercanos (Eck *et al.*, 2005). Una estrategia de mapeo alternativa para la exploración de patrones geográficos en datos puntuales es la función de densidad llamada densidad Kernel. Dicha técnica ha sido ampliamente utilizada en la identificación de conglomerados (*clusters*) espaciales porque permite visualizar la intensidad y extensión de los eventos de salud en un área geográfica (Cromley y McLafferty 2012). Esta herramienta gráfica genera un mapa (mapa de calor, islas de calor) que muestra la densidad de eventos de salud, modelados como un campo continuo con áreas de casos positivos (picos) y áreas de casos negativos (valles) (Cromley y McLafferty 2012; De Elia *et al.*, 2014).

El análisis de la distribución de las enfermedades infecciosas y sus determinantes espaciotemporales son un aspecto fundamental para la Epidemiología y, por ende, para la Salud Pública (De Elia *et al.*, 2014). Al respecto, los Sistemas de Información Geográfica (SIG) son una herramienta de gran utilidad porque permiten la localización de eventos de salud en tiempo y espacio, el reconocimiento de los patrones de comportamiento o de factores de riesgo ambiental, la detección de áreas con alta densidad de eventos de salud, el

conocimiento de la distribución geográfica de poblaciones vulnerables a un grupo de patógenos, la evaluación del impacto de una intervención, la detección de áreas con dificultades de acceso a centros de salud, el conocimiento de la cobertura de vacunación en una región, entre otras (Loyola *et al.*, 2002; Paolino *et al.*, 2005; Rinaldi *et al.*, 2006; Lemus *et al.*, 2008; Cromley y McLafferty 2012; De Elia *et al.*, 2014).

La ciudad de Tandil presenta características particulares en cuanto al crecimiento demográfico, urbanización, infraestructura de servicios sanitarios, orografía y tipo de clima. Por lo tanto, los estudios espaciales y temporales de las enfermedades diarreicas, realizados en otras regiones de Argentina, no son comparables con los de esta región y ponen de manifiesto la necesidad de este tipo de estudios en la población pediátrica de Tandil.

Objetivos

Objetivo general

Caracterizar la diarrea persistente de tipo infeccioso en la población infantil que concurre al Hospital de Niños Debilio Blanco Villegas de Tandil durante el período 2016-2017.

Objetivos específicos

Objetivo 1) Caracterizar el perfil demográfico y clínico de la población con diarrea.

Objetivo 2) Identificar los patógenos bacterianos, virales y parasitarios presentes en las heces de los niños con diarrea.

Objetivo 3) Estimar la frecuencia de infección intestinal según agente etiológico, grupo etario y duración temporal del cuadro diarreico.

Objetivo 4) Caracterizar la distribución geográfica y la estacionalidad de los casos de diarrea infecciosa.

Objetivo 5) Describir el perfil epidemiológico, la distribución geográfica y la estacionalidad de la población con diarrea persistente.

Hipótesis

Los niños con diarrea persistente que se atienden en el Hospital Debilio Blanco Villegas de Tandil en forma ambulatoria presentan patógenos intestinales en sus heces.

2.-Materiales y métodos

2.1- Área y período de estudio

2.1.1- Área de estudio

La provincia de Buenos Aires es una de las veintitrés que componen la República Argentina. La población bonaerense ha superado los 15.600.000 de habitantes, de los cuales, 96% de la población reside en áreas urbanas (INDEC 2010). El Partido de Tandil se encuentra ubicado en la provincia de Buenos Aires. La ciudad de Tandil se halla ubicada en las coordenadas 37°19' S y 59°08' O y abarca una superficie urbanizada de forma irregular cercana a 50 Km². La población ha superado los 123.000 habitantes, de los cuales 22% corresponde a población pediátrica. La densidad poblacional es de 26 hab/Km² y presenta un índice de masculinidad de 94,5 (INDEC 2010) (figura 2.1)

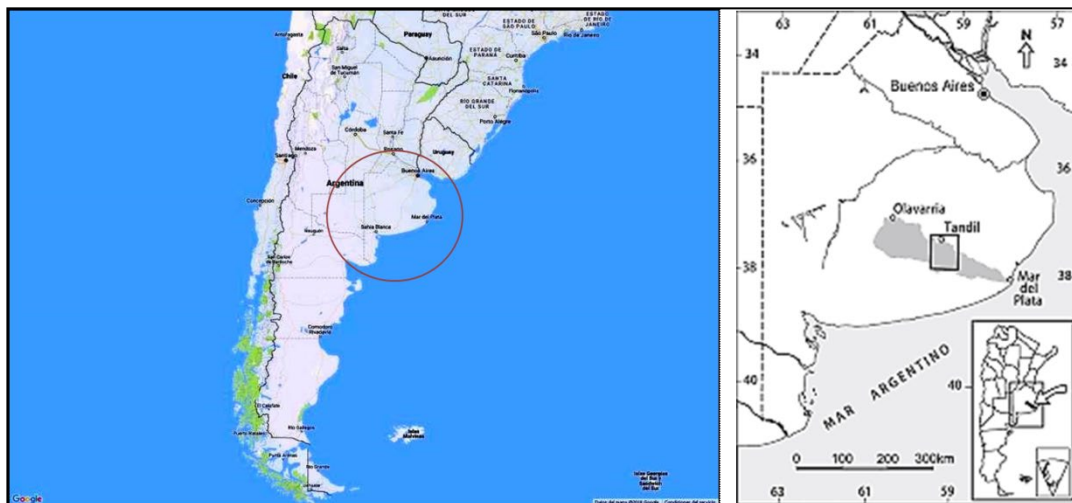


Figura 2.1: mapa de Argentina (izquierda) con detalle de la provincia de Buenos Aires y la localización geográfica de Tandil (derecha)

El clima de Tandil pertenece a la categoría de templado oceánico, con veranos cálidos y sin estación seca. (Peel *et al.*, 2007). La temperatura media anual es 14°C, con una humedad relativa de 77%, precipitaciones de 900 mm/año con

preponderancia estival y heliofanía media de 6,5 h/día (SMN). El casco urbano de Tandil está ubicado a una altitud cercana a 200 m (figura 2.2).

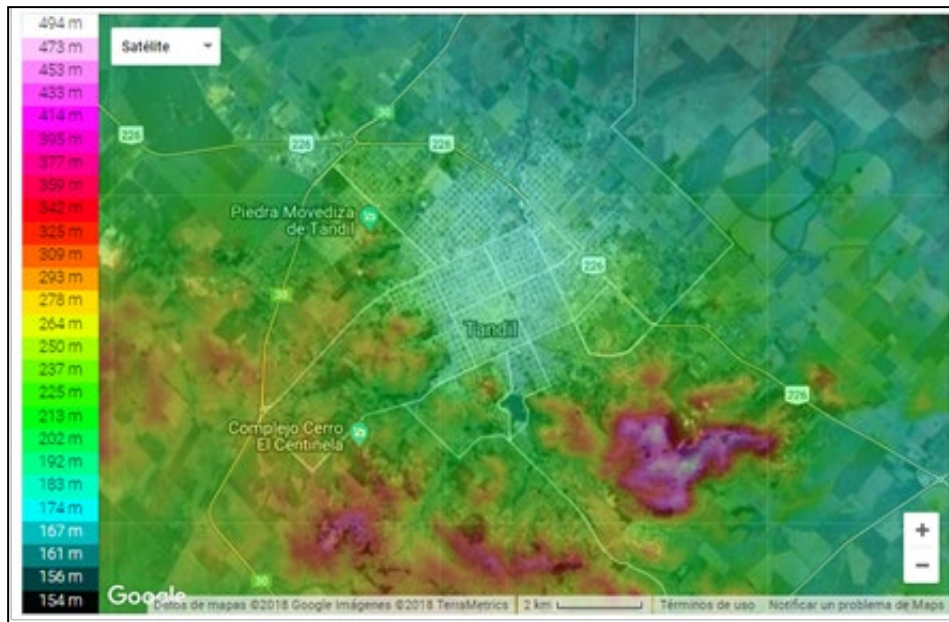


Figura 2.2: mapa de la ciudad de Tandil y sus alrededores. Detalle de la topografía del área de estudio. Disponible en <http://es-ar.topographic-map.com/places/Tandil-237810/>

El Hospital de Niños Dr. Debilio Blanco Villegas (HDBV, Establecimiento asistencial, código 79100769) se halla ubicado en la calle Alem 1300, Tandil (7000), provincia de Buenos Aires, Argentina. Este nosocomio cuenta con 52 camas divididas en 5 sectores (Lactantes, Primera y Segunda Infancia, UTIP, Guardia y Oncología) y 12 consultorios externos de pediatría/especialidad. Actualmente, cuenta con un sistema que incluye historia clínica informatizada que puede ser consultada y evolucionada desde los distintos puntos de atención.

2.1.2- Período de estudio:

El período de estudio de la variable estuvo comprendido entre octubre de 2016 y octubre de 2017.

2.2. Aspectos metodológicos del estudio

2.2.1- Tipo de estudio y diseño

El estudio se realizó con una estrategia cuantitativa, con la aplicación de un diseño observacional, descriptivo, prospectivo y de corte transversal.

2.2.2- Población. Unidad de análisis. Criterios de inclusión y exclusión.

2.2.2.1- Población objetivo

La población objetivo estuvo comprendida por los niños de ambos géneros con edades comprendidas entre 1 mes y 15 años, que residan en el partido de Tandil y zona de influencia, provincia de Buenos Aires, Argentina.

2.2.2.2- Población accesible

La población accesible estuvo comprendida por los niños de ambos géneros, con edades comprendidas entre 1 mes y 15 años, que presente un cuadro diarreico y que se atiendan en el Hospital de Niños Debilio Blanco Villegas de Tandil, provincia de Buenos Aires, Argentina, durante el período comprendido entre octubre de 2016 a octubre de 2017.

2.2.2.3- Selección de la muestra poblacional

La selección se realizó aplicando un procedimiento de colección por casos consecutivos de los niños que se atendieron en el Hospital durante el período del estudio.

2.2.2.4- Unidad de Análisis

La unidad de análisis fue la materia fecal del niño con diarrea.

2.2.2.5- Criterios de inclusión

Los niños con edades comprendidas entre 1 mes y 15 años, que presentaron un cuadro diarreico y que concurren a atenderse al Hospital de Niños Debilio Blanco Villegas de Tandil durante el período del estudio.

2.2.2.6- Criterios de exclusión

Los niños con enfermedad intestinal inflamatoria crónica, con enfermedades oncohematológicas, inmunosuprimidos, trasplantados, hospitalizados, con infecciones nosocomiales, con síndrome urémico hemolítico recurrente o con diarrea crónica (mayor a 30 días) fueron excluidos del estudio.

2.2.3- Fuentes de información, instrumentos y métodos de recolección de datos

2.2.3.1- Documentación

La documentación consiste en el registro de datos disponibles, obtenidos mediante consulta o interrogatorio a una persona sobre un asunto en particular. Fuentes documentales: historia clínica informatizada del hospital DBV, bases de datos institucionales (Servicio Meteorológico Nacional (SMN), Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INDEC), Ministerio de Salud de la Nación (MSAL) y bases de datos geográficas (Instituto Geográfico Nacional (IGN)).

2.2.3.2- Mediciones biológicas:

Las mediciones estarán constituidas por los análisis de laboratorio utilizados para la identificación de los agentes etiológicos productores de diarrea.

Fuente documental observacional estructurada: registro de variables biofisiológicas.

2.2.3.3- Técnicas e instrumentos de laboratorio

Todos los procedimientos de diagnóstico bacteriológico, virológico y parasitológico descritos en esta sección han sido validados y controlados previamente mediante controles de calidad interno y externo. Los instrumentos de laboratorio utilizados para la identificación de los patógenos cumplen los criterios de validez, confiabilidad y objetividad.

Operacionalización de las variables

2.3.1- Definición de la variable

La variable de estudio fue la **diarrea**, definida como la alteración del movimiento intestinal normal, caracterizado como un incremento en el contenido de agua, volumen o frecuencia de las deposiciones, con una frecuencia de tres o más veces en 24 horas (OMS 1988) (Tabla 2.1).

2.3.2- Definiciones operacionales:

Duración temporal de la diarrea: número de días de diarrea en el episodio actual. Los casos serán estratificados en diarrea aguda (período menor a 7 días), diarrea prolongada (de 7 a 13 días) y diarrea persistente (14 a 30 días) (Shane *et al.*, 2017).

Grupos etarios: Los niños serán categorizados en cinco grupos de edad: lactantes menores (1 a 12 meses), lactantes mayores (13 a 24 meses), preescolares (2 a 5 años), escolares (6 a 11 años) y adolescentes (mayores de 11 años) (Nelson 2013).

2.3.3- Variables de control

Edad: maduración continua y consecutiva del individuo desde el nacimiento hasta la adolescencia. La edad se calculará a partir de la fecha de nacimiento. Valor: años y meses de vida.

Género: condición biológica de varón o mujer. Valores: masculino o femenino.

Modalidad de atención médica: Consulta atendida por los profesionales médicos. Valores: servicio de emergencias (Guardia) o atención en consultorios externos.

Requerimiento de hospitalización: conducta terapéutica de tratamiento de la diarrea. Valores: tratamiento ambulatorio o internación hospitalaria.

Fecha del análisis: corresponde al día, mes y año de recolección de las heces. Datos necesarios para el estudio temporal del caso.

Localización geográfica: representación gráfica de la dirección postal. Datos necesarios para el estudio de la distribución geográfica (mapas).

Variable	Dimensiones		Indicadores		
Diarrea: alteración del movimiento intestinal normal, caracterizado como un incremento en el contenido de agua, volumen o frecuencia de las deposiciones, con una frecuencia de tres o más veces en 24 horas	Aspectos clínicos		Duración temporal de la diarrea		
			Manifestaciones clínicas: Presencia/ausencia de signos y síntomas		
	Características generales de las heces		Forma y consistencia	Escala de Bristol (ver Anexo I)	
			Presencia/Ausencia de leucocitos y/o hematíes	Categorías I a IV. (sección 2.5.2.2.2)	
	Etiología infecciosa de la diarrea	Agentes bacterianos: <i>Shigella</i> spp. <i>Salmonella enterica</i> <i>Aeromonas</i> spp. <i>Vibrio</i> spp.		Presencia/Ausencia de patógeno bacteriano	
				Susceptibilidad/Resistencia bacteriana a los antimicrobianos	
		Agentes bacterianos: <i>Escherichia coli</i> diarreigénica		Presencia/Ausencia de la bacteria y de sus genes de virulencia	
				Patotipos de <i>E. coli</i> diarreigénica	
		Agentes virales: Rotavirus Adenovirus		Presencia/Ausencia del patógeno viral	
	Agentes parasitarios: <i>Giardia intestinalis</i> <i>Cryptosporidium</i> spp. <i>Cyclospora cayetanensis</i> <i>Blastocystis</i> spp. Microsporidios <i>Ascaris lumbricoides</i> <i>Trichuris trichiura</i> Uncinarias <i>Strongyloides stercoralis</i> <i>Taenia</i> spp. <i>Hymenolepis</i> spp.		Presencia/Ausencia del patógeno parasitario		

2.4- Métodos técnicos y operativos

2.4.1- Instrumentos de recolección de datos

2.4.1.1- Equipamiento e instrumental de laboratorio

Los equipos de laboratorio utilizado en esta tesis fueron:

Tabla 2.2: Equipamiento e instrumental de laboratorio utilizado en la tesis	
Tipo de equipamiento	Marcas y modelos
Microscopio	Microscopio triocular: Leica®, modelo CME
Centrífugas	Macrocentrífuga: Gelec®, Modelo G142 Microcentrífuga: Eppendorf®, Modelo Minispin
Agitador	Vortex: DragonLab®, modelo MX-S.
Estufas	Estufa de cultivo (37°C): San-Jor®
Baño termostático	Baño seco: Labnet. AccuBlock®, Digital Dry Bath
Heladera y Freezer	Heladera con freezer (-20°C): Gafa® Freezer (-85°C): Nuair® Ultra low freezer
Sistema automatizado de tipificación y antibiograma	Vitek2 Compact. Biomerieux® Lector de turbidez: Densi-chek®
Flujo laminar	Cabina de seguridad biológica tipo 2
Termocicladores	Termociclador 1: T100. Bio-Rad® Termociclador 2: Verity. Applied Biosystems®
Electroforesis	Cuba electroforética y fuente de poder: Bio-Rad®
Detección y documentación de productos de amplificación	Transiluminador UV: Labnet® Cámara de fotos para geles: Canon®.

2.4.1.2- Programas informáticos

Software para documentación de geles: Lifescience Software from UVP Doc-It®LS, Image Acquisition Software.

Software para diseño de mapas: Quantum GIS (QGIS, versión 2.18.12).

Software estadístico: Infostat/L para Windows (versión libre actualizada, 11/3/2018)

2.5- Aspectos técnicos y operativos.

2.5.1- Recolección de información de los pacientes con diarrea

La información demográfica y clínica de los niños, la modalidad de atención ante en cuadro de diarrea y la conducta terapéutica se obtuvo a partir de las fuentes documentales disponibles (historias clínicas informatizadas del hospital y registros del Laboratorio de microbiología del HDBV) (tabla 2.3).

Tabla 2.3: información demográfica y clínica de los pacientes con diarrea	
Tipo de información	Datos recolectados
Datos demográficos del paciente	-Apellido y nombres -Género -Fecha de nacimiento -Dirección postal
Datos del cuadro clínico	-Número de días de diarrea del cuadro clínico actual. -Signos y síntomas: diarrea, vómitos, deshidratación y otros diversos síntomas generales descritos en la historia clínica.
Modalidad de atención	-Emergencias: guardia -Consultorios: atención en consultorios médicos
Conducta terapéutica	-Tratamiento de la diarrea en forma ambulatoria o con internación hospitalaria.

2.5.2- Métodos técnicos y operativos para el estudio macroscópico y microscópico de las heces

2.5.2.1- Diagrama del estudio

Las etapas de procesamiento de las heces para el estudio macroscópico y microscópico de las heces se indican en la figura 2.3

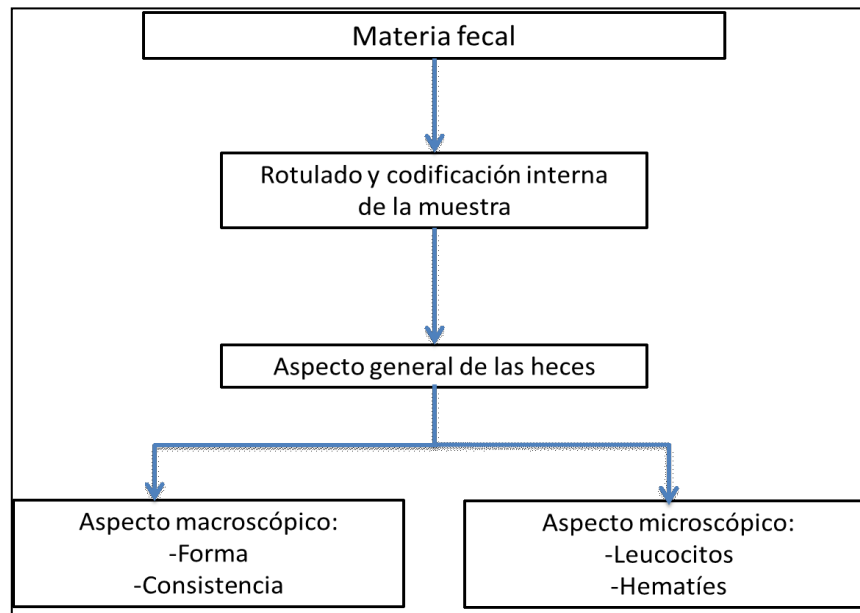


Figura 2.3: algoritmo de procesamiento de las muestras para el estudio macroscópico y microscópico de las heces. Fuente: elaboración propia.

2.5.2.2- Técnicas y aspectos operativos

2.5.2.2.1- Aspecto macroscópico: forma y consistencia de las heces.

Las muestras de materia fecal se recolectaron por emisión espontánea en un recipiente estéril de boca ancha y se conservaron a 4°C hasta su procesamiento. Las heces se clasificaron en forma visual según la Escala de Bristol (Blake *et al.*, 2016). Dicha escala categoriza las deposiciones en 7 tipos morfológicos: los tipos 1 y 2 indican heces duras con fragmentos separados, los tipos 3 y 4 son heces formes y consistentes, los tipos 5 y 6 corresponden a heces blandas con bordes poco definidos y el tipo 7 indica heces acuosas o líquidas (La Escala de Bristol se encuentra en Anexo I).

2.5.2.2.2- Aspecto microscópico: presencia fecal de leucocitos y hematíes.

Los hematíes y leucocitos se detectaron mediante la observación microscópica de las heces. Los resultados fueron agrupados en 4 categorías para su estudio (tabla 2.4)

Tabla 2.4: categorías de las heces según presencia de leucocitos y hematíes fecales

Categoría	Presencia de Leucocitos	Presencia de hematíes
I	NO	NO
II	NO	SI
III	SI	NO
IV	SI	SI

2.5.3- Métodos técnicos y operativos para la detección de agentes bacterianos productores de diarrea.

2.5.3.1- Diagramas del estudio

Las etapas de procesamiento de las heces para la detección de agentes bacterianos productores de diarrea mediante cultivo y serología se indican en la figura 2.4.

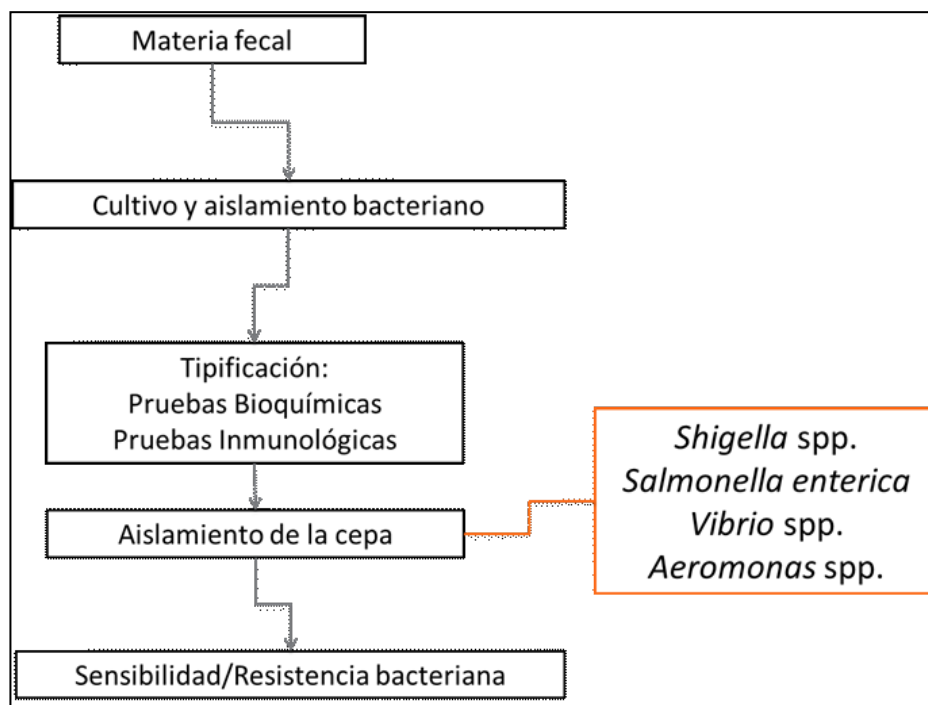


Figura 2.4: algoritmo de procesamiento de las muestras para la detección de agentes bacterianos productores de diarrea. Fuente: elaboración propia.

2.5.3.2- Técnicas y aspectos operativos

2.5.3.2.1- Aislamiento bacteriano

Las muestras fecales fueron cultivadas en diversos medios de cultivo: Agar *Salmonella-Shigella* (Agar SS), Agar Eosina Azul de Metileno (Agar EMB-Levine), Agar Sangre con ampicilina, Agar MacConkey (Agar MAC), Caldo Selenito, Agar Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa (Agar TCBS), Agua Peptonada Alcalina, Agar MacConkey con sorbitol (Agar SMAC) y Agar Cromogénico (Chrom-agar, O157). Los cultivos sembrados en medio sólido fueron incubados en aerobiosis a 37°C durante 24-48 horas. El tubo con Caldo Selenito sembrado fue incubado en aerobiosis a 37°C durante 18 horas y cultivado en Agar SS. El tubo con Agua Peptonada Alcalina sembrada fue incubado en aerobiosis a 37°C durante 8 horas y luego cultivado en Agar TCBS (Konemann 2008; Lopardo *et al.*, 2016).

2.5.3.2.2- Identificación bacteriana

Las bacterias enteropatógenas investigadas en esta tesis fueron *Escherichia coli* diarreigénicas, *Shigella* spp., *Salmonella enterica*, *Aeromonas* spp. y *Vibrio* spp. La caracterización fenotípica de cada aislamiento fue realizada según los algoritmos vigentes (Murray 2007, Konemann 2008; Lopardo *et al.*, 2016).

Cada aislamiento bacteriano fue tipificado en forma convencional, mediante pruebas bioquímicas estandarizadas (Konemann 2008) y en forma automatizada, mediante el sistema VITEK2 (Biomérieux, Francia). Este sistema utiliza reactivos colorimétricos incluidos dentro de tarjetas individuales. Cada tarjeta de identificación posee 64 pruebas que miden varias actividades metabólicas como acidificación, alcalinización, hidrólisis enzimáticas y desarrollo en presencia de sustancias inhibitoras.

A partir de un cultivo bacteriano puro en Agar Tripteina Soya (Agar ATS) se preparó la suspensión bacteriana ajustando la turbiedad a 0,50-0,63 unidades de la escala de McFarland con el densitómetro DensiChek™. Posteriormente se puso en contacto dicha suspensión con la tarjeta de reactivos, se colocó en el sistema VITEK2 para su incubación, lectura y tipificación mediante la interpretación de las reacciones metabólicas bacterianas (figura 2.5 y 2.6)

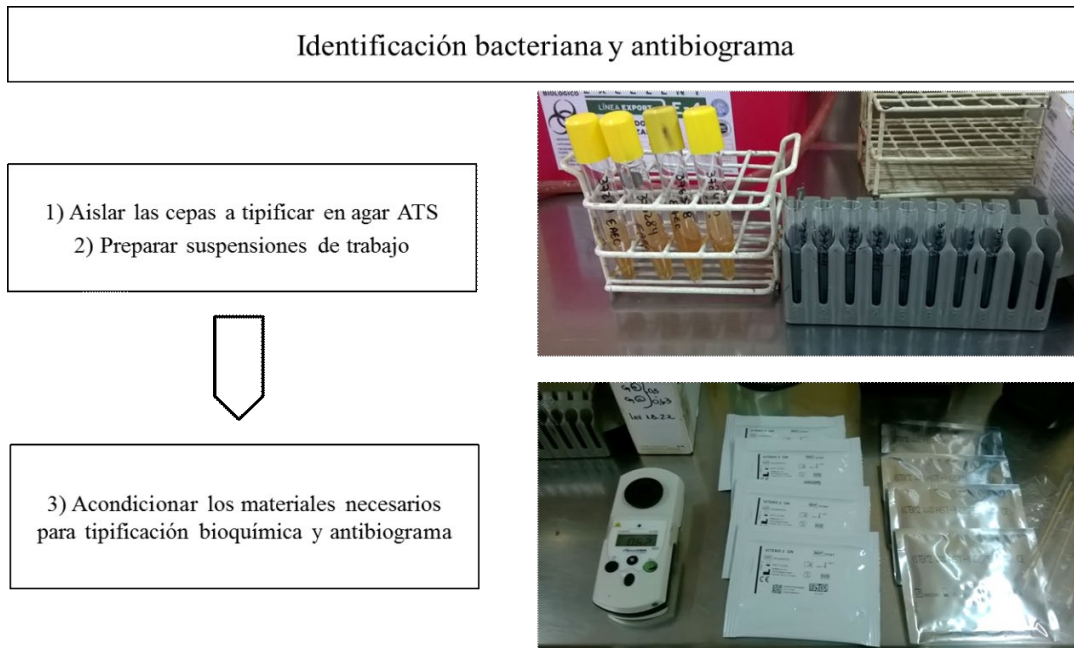


Figura 2.5: identificación bacteriana mediante métodos automatizados. Detalle de preparación de suspensiones bacterianas y acondicionamiento de materiales necesarios para el procedimiento. Fuente: elaboración propia

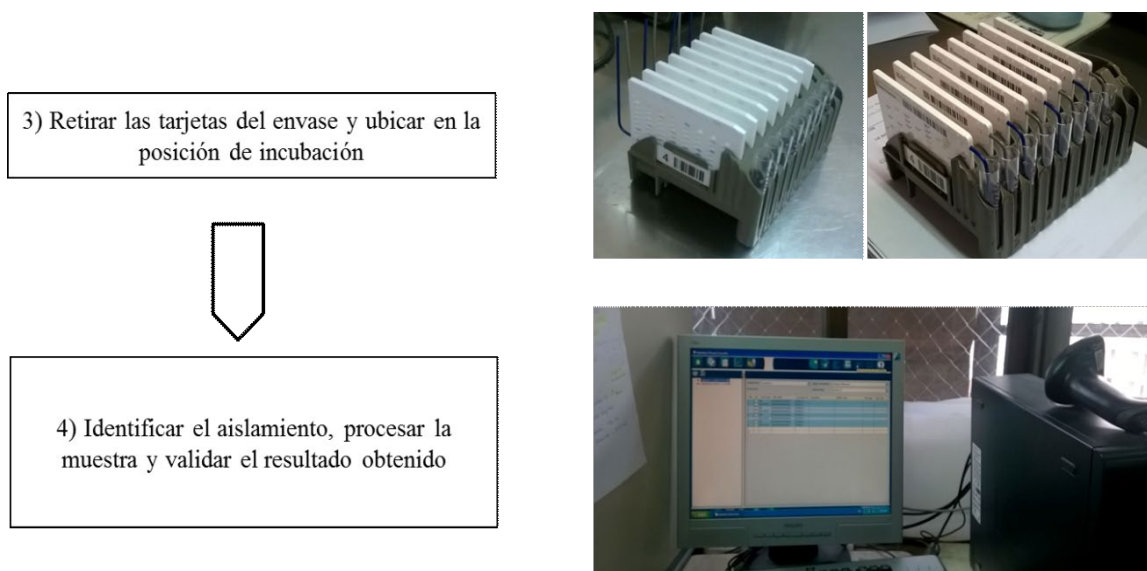


Figura 2.6: identificación bacteriana mediante métodos automatizados. Detalle de tarjetas individuales para identificación y antibiograma automatizado Vitek2. Fuente: elaboración propia

2.5.3.2.3- Serotipificación

La serotipificación clásica se basa en la determinación de los antígenos O y H. El antígeno O define los serogrupos de *E. coli* mientras que la combinación específica de los antígenos O y H define el serotipo. Una designación de NM o H- indica una ausencia del antígeno H y que el aislado no es móvil (figura 2.7).

Los aislamientos bacterianos se confirmaron mediante técnicas de aglutinación con antisueros para *Salmonella* (OMA y OMB), *Shigella* spp. (A-D), EPEC (serotipos O111, 055, 026, 086, 0119, 0127, 0125, 0126, 0128) y *E. coli* STEC (serotipos O157 y O104) (Rodríguez-Ángeles *et al.*, 2002; Murray 2007; Konemann 2008; Croxen *et al.*, 2013; Lopardo *et al.*, 2016).

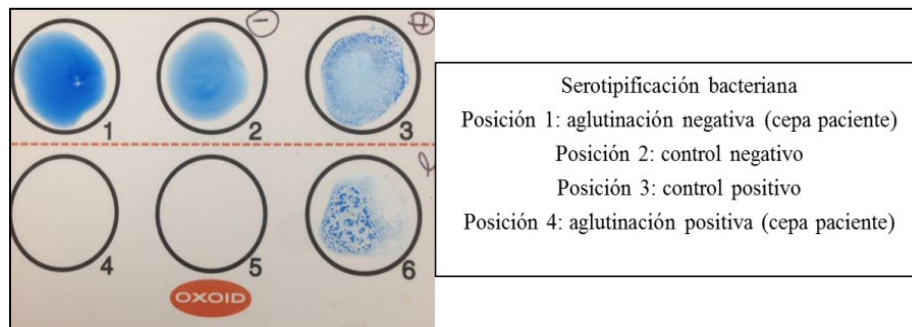


Figura 2.7: identificación bacteriana mediante métodos inmunológicos. Fuente: elaboración propia

2.5.3.2.4- Susceptibilidad a los agentes antimicrobianos:

La susceptibilidad de las cepas fue evaluada mediante dos métodos:

2.5.3.2.4.1-Microdilución en caldo

El sistema VITEK2 es una metodología de análisis automatizado de sensibilidad antimicrobiana basado en la técnica de concentración inhibitoria mínima (CIM). Las lecturas y las interpretaciones automatizadas de los halos de inhibición se combinan con un programa de computadora para producir valores de CIM y para detectar perfiles de resistencia poco frecuentes.

A partir de un cultivo bacteriano puro en Agar Tripteina Soya (Agar ATS) se preparó la suspensión bacteriana, primero ajustando la turbiedad a 0,50-0,63 unidades de la escala de McFarland con el densitómetro DensiChek™ y luego, una segunda dilución fue realizada. La suspensión se puso en contacto con la tarjeta de antibiograma, se colocó en el sistema VITEK2 para su incubación, lectura e interpretación del crecimiento bacteriano (figuras 2.5 y 2.6). Los antimicrobianos seleccionados para el informe final fueron los de uso clínico habitual en cuadros diarreicos (Famiglietti 2005; CLSI 2015; WHONET 2016).

2.5.3.2.4.2- Antibiograma por difusión

La sensibilidad a Fosfomicina debe estudiarse para los aislamientos de *Shigella* spp. mediante el método de difusión en agar (Técnica de Kirby-Bauer) (CLSI 2015). Brevemente, a partir de un cultivo bacteriano puro se preparó la suspensión bacteriana ajustando la turbiedad a 0,50 unidades de la escala de McFarland. La suspensión se extendió en la superficie de una placa de Agar Mueller-Hinton con hisopo estéril y luego se adicionó el disco de fosfomicina. El cultivo se incubó en aerobiosis a 37°C durante 18 horas, se midió el diámetro de inhibición y el resultado se categorizó en sensible o resistente según el valor hallado. (CLSI 2015; WHONET 2016).

2.5.4- Métodos técnicos y operativos. Determinación de patotipos de *Escherichia coli* diarraigénico

2.5.4.1- Diagramas del estudio

Los patotipos de *Escherichia coli* diarraigénico (DEC) investigados en este estudio fueron *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* productora de Toxina Shiga (STEC).

El algoritmo de diagnóstico molecular de las cepas DEC está constituido por dos etapas secuenciales: la primera etapa consiste en un tamizaje molecular para la detección de cepas DEC en el cultivo primario y la segunda etapa incluye la confirmación molecular, seguido del aislamiento y la identificación de la cepa en estudio (figuras 2.8 y 2.9).

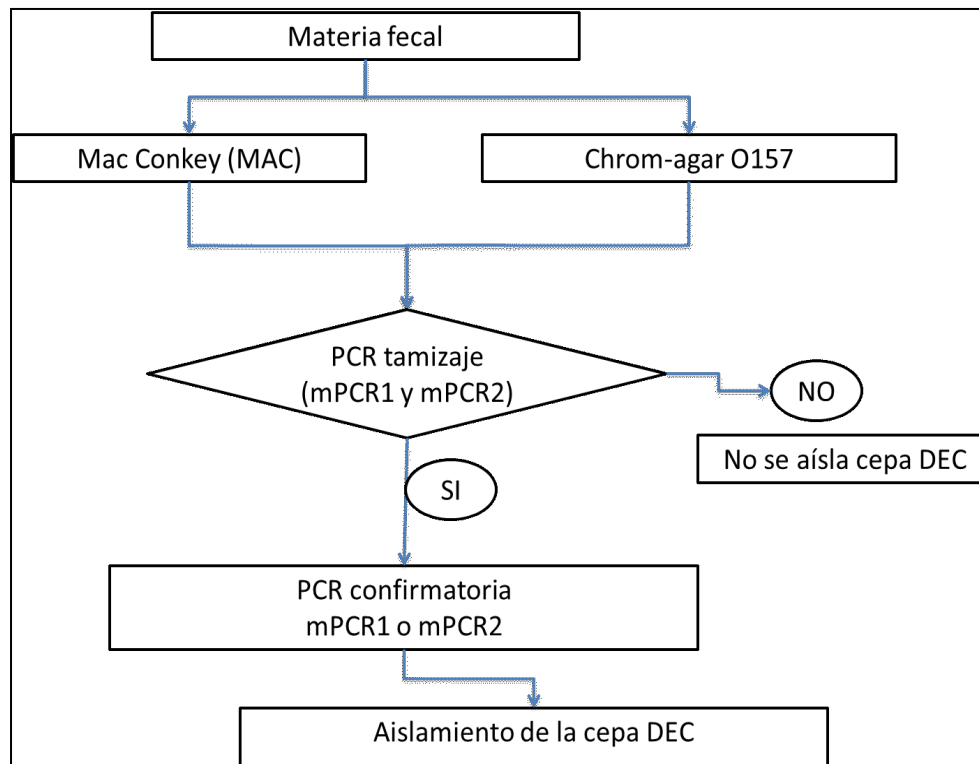


Figura 2.8: algoritmo general de diagnóstico molecular de las cepas DEC. Fuente: elaboración propia

La identificación de los aislamientos DEC se basó en la detección genotípica de ocho factores de virulencia por la técnica de la polimerasa múltiple (mPCR). Los protocolos utilizados han sido previamente validados (Carbonari *et al.*, 2014). Los genes estudiados fueron: intimina (*eae*), toxina termolábil (*lt*), toxinas termoestables (*sth* y *stp*), antígeno plasmídico de invasión H (*lpaH*), activador transcripcional R (*AggR*), Toxinas Shiga 1 y 2 (*stx1* y *stx2*) y gen

ribosomal (16S). La identificación de los 5 patotipos DEC se realizó mediante la amplificación uno o varios genes característicos (figura 2.9).

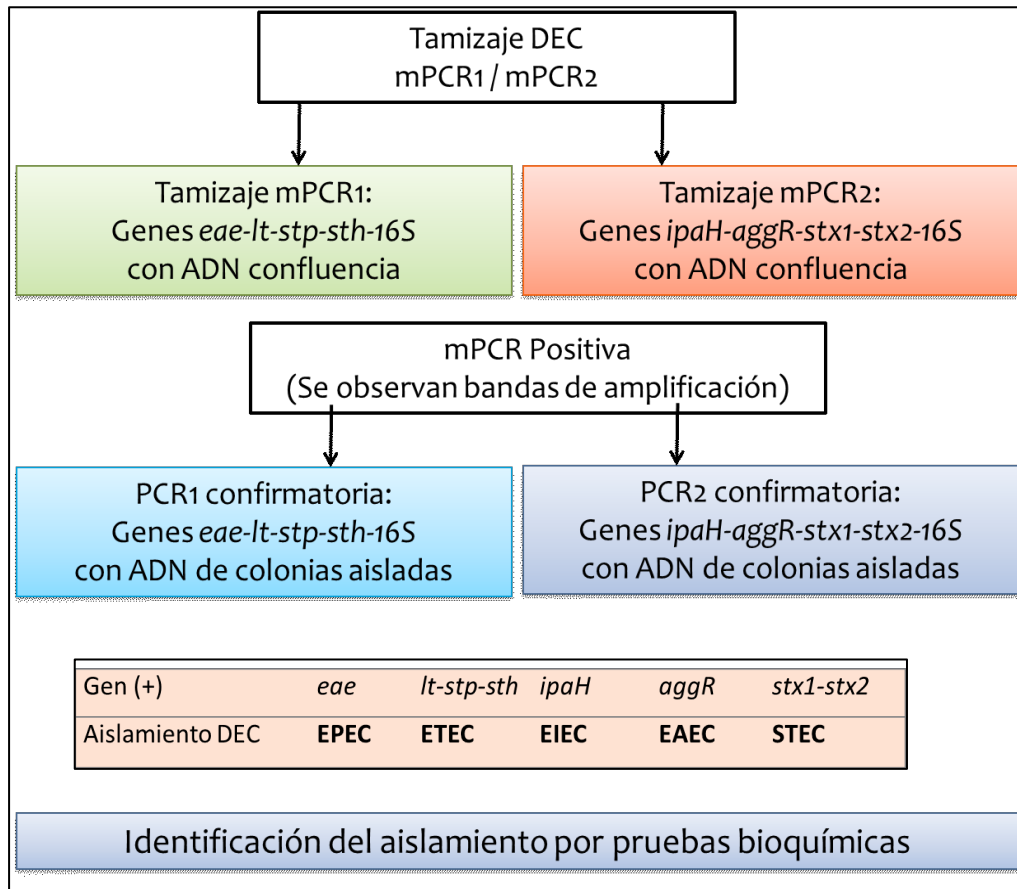


Figura 2.9: algoritmo detallado de diagnóstico molecular de las cepas DEC. Fuente: elaboración propia (Malbrán 2014).

2.5.4.2- Técnicas y aspectos operativos

2.5.4.2.1- Cultivo bacteriano primario

Cada materia fecal fue sembrada en agar MacConkey (MAC) y en Chrom-agar. Estos medios de cultivo se utilizan para el crecimiento de bacilos Gram negativos de fácil desarrollo como las especies de la familia *Enterobacteriaceae*. En particular, el Chrom-agar es un medio adecuado para la detección de *E. coli* O157.

La placa sembrada fue incubada en aerobiosis a 35-37°C durante 24 h (Carbonari *et al.*, 2014; Malbrán 2014).

2.5.4.2.2- Extracción de ADN

2.5.4.2.2.1- Extracción de ADN de confluencia bacteriana

Una ansada de bacterias, correspondiente a la zona del cultivo confluyente, se sembró en una nueva placa de agar MAC y sin quemar el ansa, el remanente de bacterias adheridas se resuspendió en un vial con 150 µl de buffer Tritón X-100 al 1% en buffer TE 1X (figura 2.10). La preparación de los reactivos se detalla en el Anexo II. La suspensión bacteriana se calentó en baño seco a 100°C durante 15 minutos y se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos. El extracto de ADN presente en el sobrenadante fue conservado a -20°C hasta su utilización (Carbonari *et al.*, 2014; Malbrán 2014).

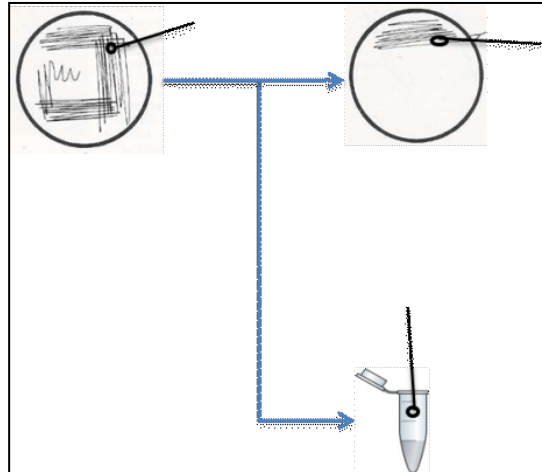


Figura 2.10: extracción de ADN, detalle de procedimiento de repique y extracción de ADN de la zona de confluencia bacteriana. Fuente: elaboración propia.

2.5.4.2.2- Extracción de ADN de colonias bacterianas aisladas

Una colonia aislada fue sembrada en una nueva placa de agar MAC y sin quemar el ansa, el remanente de bacterias adheridas se resuspendió en un vial con 150 μ l de buffer Tritón X-100 al 1% en buffer TE 1X (figura 2.11). Este procedimiento se repitió con 10 colonias aisladas del cultivo original. Las suspensiones bacterianas se calentaron en baño seco a 100°C durante 15 minutos y se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 minutos. Los cultivos en proceso fueron conservados en heladera hasta su confirmación. Los extractos de ADN presentes en los 10 sobrenadantes fueron conservados a -20°C hasta su utilización (Carbonari *et al.*, 2014; Malbrán 2014).

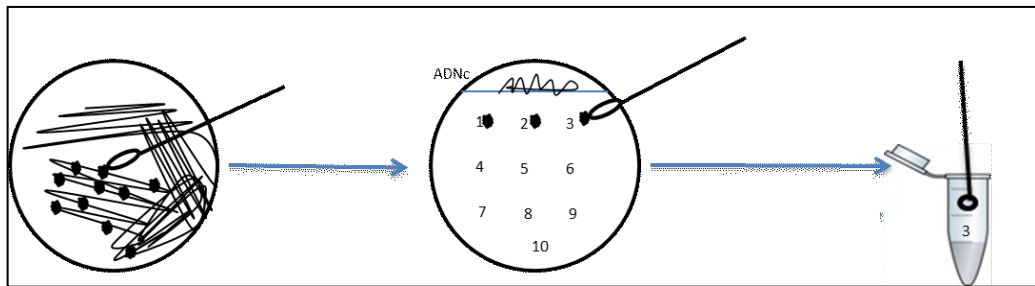


Figura 2.11: detalle de procedimiento de repique y extracción de ADN de 10 colonias aisladas. Fuente: elaboración propia.

2.5.4.2.3- Amplificación de ADN bacteriano mediante PCR

La identificación de los patotipos DEC fue realizada mediante la amplificación molecular de fragmentos de ocho genes de virulencia característicos aplicando una estrategia diagnóstica de dos etapas. La primera consistió en la realización de dos PCR múltiples (mPCR1 y mPCR2) amplificando el ADN genómico proveniente de la zona de cultivo confluyente (PCR tamizaje) (figura 2.12).

En caso de que se hubiera observado amplificación en alguno de los genes DEC con ADN de confluencia, la segunda etapa se basó en la realización de una PCR múltiple (mPCR1 o mPCR2), utilizando el ADN de diez colonias aisladas (PCR confirmatorias). Si la PCR con ADN confluencia hubiese sido positiva, pero la PCR

confirmatoria de las 10 colonias seleccionadas no mostrara amplificación, se repitió el mismo procedimiento con otras 10 colonias aisladas. La colonia bacteriana que mostró amplificación de algún gen DEC fue aislada y caracterizada por pruebas bioquímicas (VITEK2, Biomerieux) (Malbrán 2014).

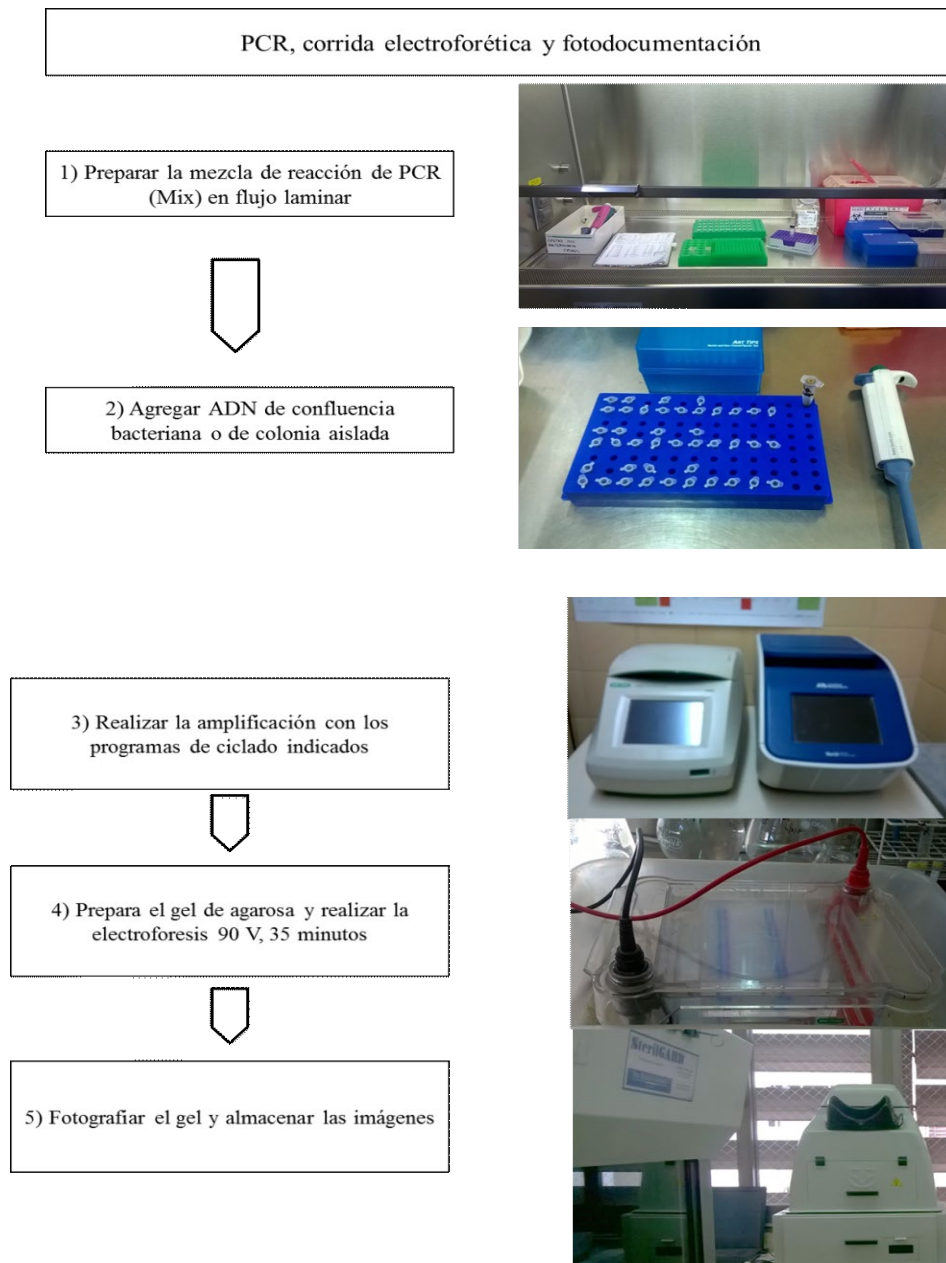


Figura 2.12: fotografías del procedimiento de amplificación. Preparación de la mezcla de reacción en flujo laminar, adición de ADN bacteriano, amplificación génica, electroforesis en geles de agarosa, visualización y fotodocumentación de los productos de amplificación. Fuente: elaboración propia

2.5.4.2.3.1- PCR múltiple 1 (mPCR1)

Los 5 genes amplificados en la PCR múltiple 1 (mPCR-1) fueron *eae*, *lt*, *stp*, *sth*, *16S*. Las concentraciones de los reactivos en la mezcla de reacción fueron las siguientes: Buffer PCR 1X, dNTPs 0,1 mM, Cl₂Mg 1,5 mM, Taq polimerasa 0,03 U/μl, primers SK1 y SK2 0,2 pmol/μl cada uno, primers LT-R y LT-F 0,25 pmol/μl cada uno, primers STh-f y STh-r 0,2 pmol/μl cada uno, STp-f y STp-r 0,2 pmol/μl cada uno, primers 16S-f y 16S-r 0,125 pmol/μl cada uno y ADN de confluencia bacteriana 2 μl. El volumen final de reacción fue 50 μl. (Carbonari *et al.*, 2014; Malbrán 2014). Las secuencias de los primers y los tamaños de amplificación de cada fragmento se indican en la tabla 2.5.

En cada ronda de PCR se utilizaron controles positivos (cepas DEC), control negativo (muestra sin ADN) y controles de amplificación de PCR (cepa ATCC). Las cepas utilizadas como controles en la mPCR-1 y el protocolo de amplificación aplicado se muestran en las tablas 2.6 y 2.7.

Tabla 2.5: Genes, primers, secuencias y tamaño de los fragmentos amplificados para mPCR-1

gen	Primer	Secuencia del primer (5'-3')	Tamaño del fragmento de amplificación (pb)
<i>eae</i>	SK1	CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC	864
	SK2	CCGGATCCGTCTCGCCAGTATTCG	
<i>lt</i>	LT-L	TCTCTATGTGCATACGGAGC	322
	LT-R	CCATACTGATTGCCGCAAT	
<i>sth</i>	STh-f	TTCACCTTCCCTCAGGATG	120
	STh-r	CTATTCATGCTTTCAGGACCA	
<i>stp</i>	STp-f	TCTTCCCCTCTTTAGTCAG	166
	STp-r	ACAGGCAGGATTACAACAAAG	
<i>16S</i>	16S-f	AGAAGCACCGGCTAACTC	204
	16S-r	CGCATTTCACCGCTACAC	

<i>E. coli</i>	gen	Patotipo
2348/69	<i>eae</i>	EPEC
KNH-172	<i>lt</i>	ETEC
	<i>stp</i>	ETEC
O126-53	<i>sth</i>	ETEC
ATCC 25922 sin factores de virulencia	<i>16S</i>	Control de amplificación

Etapa	Temperatura	Tiempo	Nº ciclos
Desnaturalización	94 °C	5 min	1
Desnaturalización	94 °C	30 seg	30 ciclos
Pegado de primers (<i>annealing</i>)	56 °C	1 min	
Extensión	72 °C	1 min	
Extensión	72 °C	2 min	1

2.5.4.2.3.2- PCR múltiple 2 (mPCR2)

Los 5 genes amplificados en la PCR múltiple 2 (mPCR-2) fueron *ipaH*, *aggR*, *stx1*, *stx2*, *16S*. Las concentraciones de los reactivos en la mezcla de reacción fueron las siguientes: Buffer PCR 1X, dNTPs 0,1 mM, Cl₂Mg 0,75mM, Taq polimerasa 0,03 U/μl, primers IpaH8 y IpaH15 0,25 pmol/μl cada uno, primers aggRks1 y aggRkas2 1 pmol/μl cada uno, primers Stx1-F y Stx1-R 1,6 pmol/μl cada uno, Stx2-F y Stx2-R 0,4 pmol/μl cada uno, primers 16S-f y 16S-r 0,25 pmol/μl cada uno y ADN de confluencia bacteriana 2 μl. El volumen final de reacción fue 50 μl. (Carbonari *et al.*, 2014; Malbrán 2014). Las secuencias de los primers y los tamaños de amplificación de cada fragmento se indican en la tabla 2.8

En cada ronda de PCR se utilizaron controles positivos (cepas DEC), control negativo (muestra sin ADN) y controles de amplificación de PCR (cepa ATCC). Las

cepas utilizadas como controles en la mPCR-2 y el protocolo de amplificación aplicado se muestran en las tablas 2.9 y 2.10.

Tabla 2.8: genes, primers, secuencias y tamaño de los fragmentos amplificados para mPCR-2

gen	Primer	Secuencia del primer (5'-3')	Tamaño del fragmento de amplificación (pb)
<i>ipaH</i>	lpaH8B	G TTCCTTGACCGCCTTTCCGA	619
	lpaH15B	GCCGGTCAGCCACCCTCTGAG	
<i>aggR</i>	aggRks1	GTATACACAAAAGAAGGAAGC	254
	aggRkas2	ACAGAATCGTCAGCATCAGC	
<i>stx1</i>	stx1a	GAAGAGTCCGTGGGATTACG	130
	stx1b	AGCGATGCAGCTATTAATAA	
<i>stx2</i>	stx2a	TTAACCACACCCCACCGGGCAGT	346
	stx2b	GCTCTGGATGCATCTCTGGT	
<i>16S</i>	16S-f	AGAAGCACCGGCTAACTC	204
	16S-r	CGCATTTACCGCTACAC	

Tabla 2.9: cepas control utilizadas en la PCR múltiple 2 (mPCR-2)

<i>E. coli</i>	gen	Patotipo
C-481	<i>ipaH</i>	EIEC
17-2	<i>aggR</i>	EAEC
110/05	<i>stx1</i>	STEC
	<i>stx2</i>	STEC
ATCC 25922 sin factores de virulencia	<i>16S</i>	Control de amplificación

Tabla 2.10: Protocolo de amplificación mPCR-2

Etapas	Temperatura	Tiempo	Nº ciclos
Desnaturalización	94 °C	5 min	1
Desnaturalización	94 °C	30 seg	30 ciclos
Pegado de primers (<i>annealing</i>)	57 °C	1 min	
Extensión	72 °C	30 seg	
Extensión	72 °C	2 min	1

2.5.4.2.3.3- Detección de los productos de amplificación

Los productos de amplificación (amplicones) fueron detectados mediante una electroforesis en geles de agarosa al 2,5% en buffer TAE 1X y teñidos con Bromuro de Etidio (10 mg/ml, Promega). En cada pocillo se sembraron 10 µl del amplicón con el buffer de carga. Las condiciones de corrida fueron 90V durante 35 minutos. La lectura de la PCR se realizó comparando el peso molecular de cada banda de amplificación con los controles y el marcador de peso molecular. Los perfiles de bandas obtenidos fueron documentados utilizando el sistema de adquisición de imágenes y el software correspondiente (Carbonari *et al.*, 2014; Malbrán 2014). La preparación de reactivos se detalla en el Anexo II.

2.5.4.2.3.4- Conservación de las cepas bacterianas

2.5.4.2.3.4.1- Conservación de cepas en ultra frío (-70°C)

Las cepas patógenas aisladas en este trabajo de tesis y las cepas control fueron mantenidas a largo plazo mediante ultracongelación. La cepa se cultivó en 10 ml de Caldo Tripteina Soya (CTS) a 37°C durante 6 h. El caldo se fraccionó en 10 crioviales y a cada uno se le adicionó 400 µl de glicerol, se homogeneizaron y conservaron a -70°C. Cada criovial se utilizó un máximo de tres veces (Malbrán 2014).

2.5.4.2.3.4.2- Conservación de cepas en frío (4°C)

La cepa se cultivó en Caldo Tripteina Soya (CTS) a 37°C durante 6 h y se repicó en 7 viales (1 vial de trabajo y 6 de reserva) con agar blando estéril (caldo CTS y agar-agar 0,8%). Los viales sembrados fueron incubados a 37°C durante 18 h y conservados a 4°C (Malbrán 2014).

2.5.5- Métodos técnicos y operativos. Detección de antígenos virales.

2.5.5.1- Diagrama de estudio

Las etapas de procesamiento de las heces para la detección de agentes virales productores de diarrea se indican en la figura 2.13.

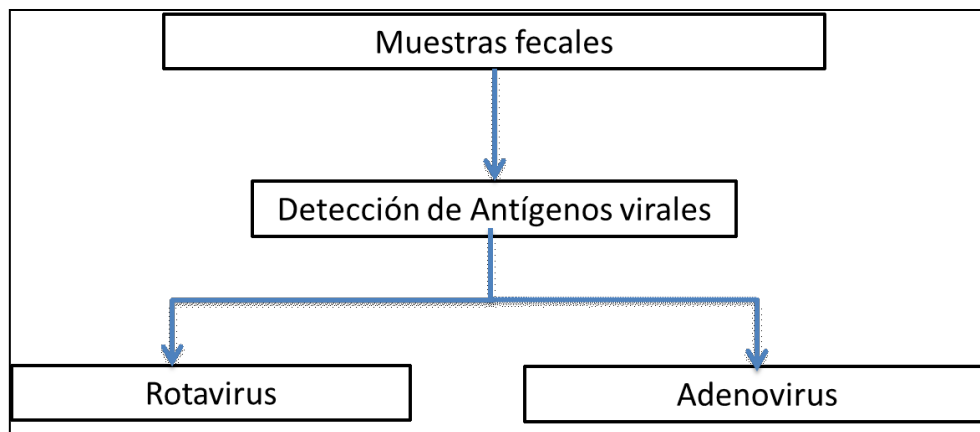


Figura 2.13: algoritmo de identificación de virus entéricos. Fuente: elaboración propia.

2.5.5.2- Técnicas y aspectos operativos. Detección de antígenos virales.

Rotavirus y Adenovirus se identificaron mediante un método inmunológico (QuickStripe© Adeno/Rota, Savyon Biodiagnostics) que consiste en un inmunoensayo cromatográfico cualitativo para la detección simultánea de antígenos de ambos virus en heces. Durante el desarrollo de la prueba, la muestra reacciona con los conjugados coloreados (anticuerpos monoclonales anti-rotavirus y anticuerpos monoclonales anti-adenovirus) previamente secados en la tira reactiva permitiendo que este complejo antígeno-anticuerpo avance por capilaridad a través de la membrana de la prueba. Los anticuerpos específicos presentes en la membrana capturarán las partículas coloreadas con antígenos (figura 2.14) Independientemente de que haya presencia o no de Rotavirus y/o Adenovirus, la mezcla de conjugado avanza por la membrana hasta la región de control siempre aparecerá una línea de control de reacción (control interno de los reactivos).

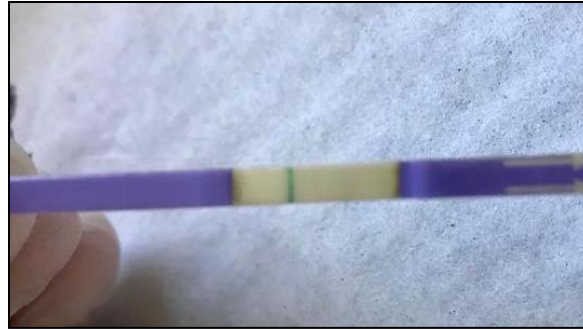


Figura 2.14: equipo diagnóstico para la detección de antígenos virales en heces mediante inmunocromatografía. Fuente: elaboración propia.

2.5.6- Métodos técnicos y operativos. Detección de parásitos intestinales

2.5.6.1 Diagrama de estudio de los protozoos y helmintos intestinales

Las etapas de procesamiento de las heces para la detección de agentes parasitarios indican en las figuras 2.15 y 2.16.

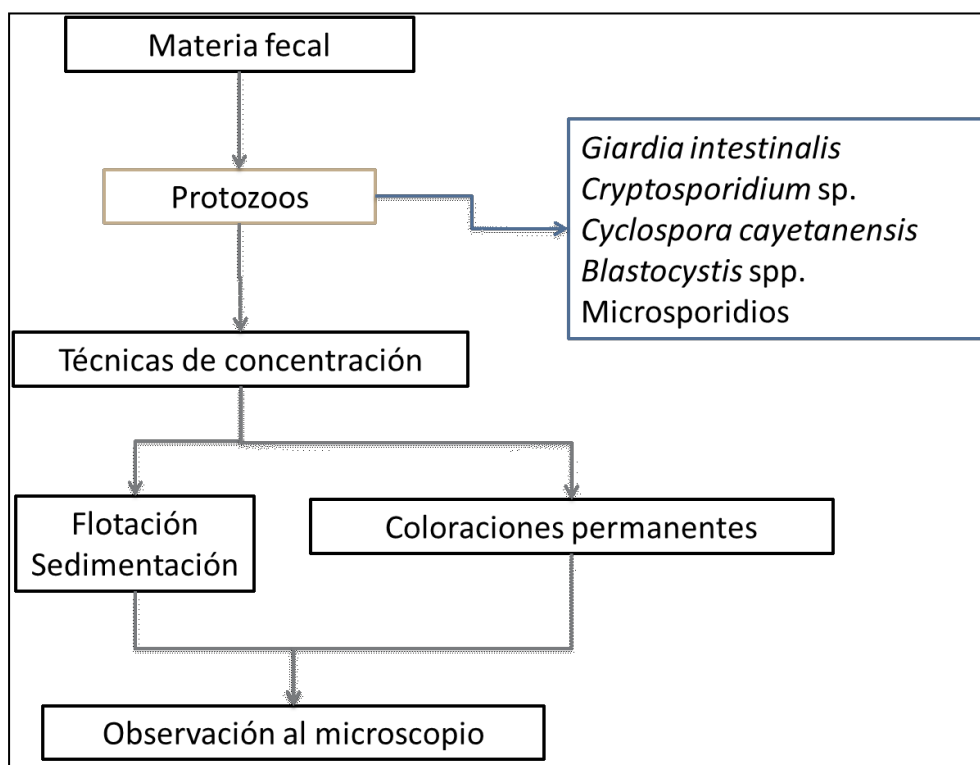


Figura 2.15: algoritmo de procesamiento de las muestras para la detección de protozoos intestinales. Fuente: elaboración propia.

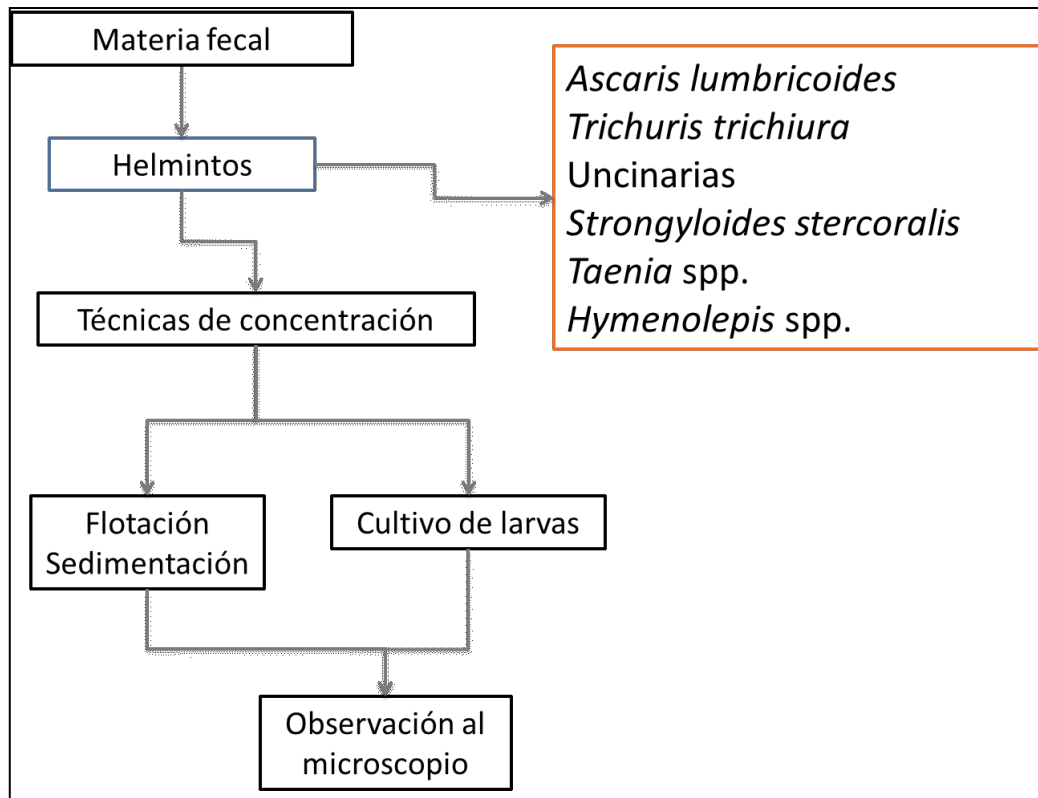


Figura 2.16: algoritmo de procesamiento de las muestras para la detección de helmintos intestinales. Fuente: elaboración propia.

2.5.6.2- Técnicas y aspectos operativos para la detección de los parásitos

La detección de los elementos parasitarios (protozoos y helmintos) fue realizada mediante diversas técnicas.

2.5.6.2.1- Detección de elementos parasitarios

2.5.6.2.1.1- Concentración por flotación

La Técnica de Willis se fundamenta en la utilización de una solución de alta densidad en la cual flotan los elementos parasitarios. Una porción de materia fecal fue homogeneizada con un volumen de solución saturada de NaCl (densidad entre 1,20 y 1,25), se dejó decantar la suspensión durante 15 minutos,

se tomó una alícuota de la superficie y se observó al microscopio con objetivos de 10X y 40X (figura 2.17) (Feldman y Guardis, 1990; Konemann 2008).

2.5.6.2.1.2- Concentración por sedimentación

Las técnicas de Telemann y Agua-éter se basan en la utilización de soluciones de baja densidad en la cual los elementos parasitarios sedimentan al fondo del tubo. Una porción de materia fecal fue filtrada y homogeneizada con 10 ml de solución de baja densidad, luego se agregó 1 ml de éter etílico, se agitó vigorosamente y se centrifugó 10 minutos a 2000 rpm. El sobrenadante fue descartado y el sedimento se observó al microscopio con objetivos de 10X y 40X (figura 2.16) (Feldman y Guardis, 1990; Konemann 2008).

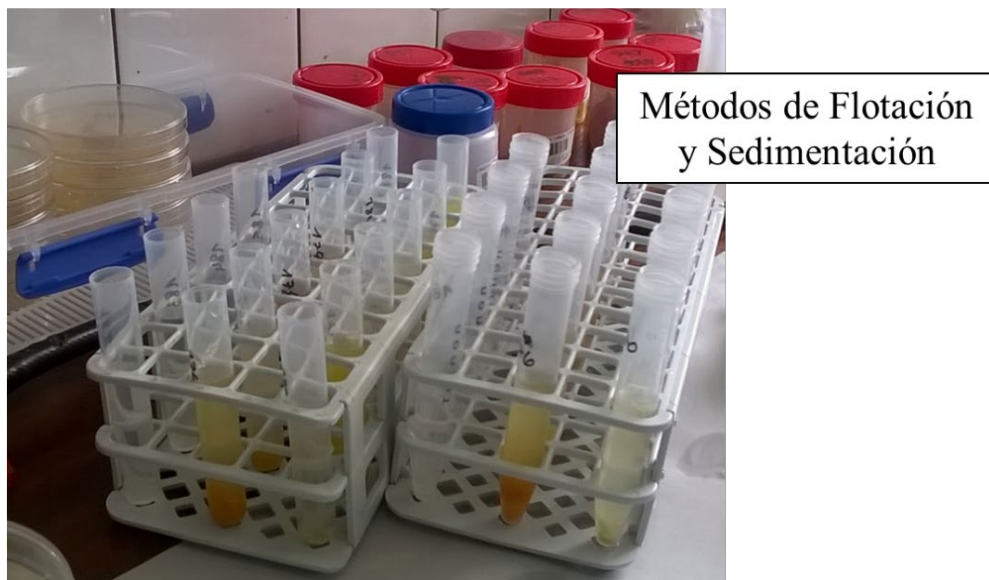


Figura 2.17: procesamiento de muestras fecales por flotación y sedimentación.

Fuente: elaboración propia

2.5.6.2.1.3- Coloraciones permanentes.

La preparación de los reactivos y el detalle de los procedimientos de coloración se encuentran en el Anexo III.

2.5.6.2.1.3.1- Coloración: Ziehl Neelsen modificado

Brevemente, el extendido fecal se secó al aire, se cubrió con Carbolfucsina, se calentó hasta la emisión de vapores blancos y se lavó con agua. La decoloración se realizó con ácido sulfúrico y luego se coloreó con azul de metileno. El frotis se enjuagó y observó al microscopio (Feldman y Guardis, 1990).

2.5.6.2.1.3.2- Coloración Safranina-Azul de Metileno

Brevemente, el extendido fecal se secó al aire, se fijó con una solución de alcohol ácido, se cubrió con safranina, se calentó hasta la emisión de vapores blancos, se lavó con agua y se coloreó con azul de metileno. El frotis se enjuagó y observó al microscopio (Feldman y Guardis, 1990).

2.5.6.2.1.3.3- Coloración Tricrómica de Ryan

Brevemente, el extendido fecal se secó al aire y se fijó con metanol absoluto. El frotis se cubrió con la solución Tricrómica durante 90 minutos, se decoloró con alcohol-ácido y luego se sumergió varias veces en mezclas de alcohol-agua. El frotis se enjuagó y observó al microscopio (Feldman y Guardis, 1990).

2.5.6.2.1.3.4- Coloración Quick Hot Gram-cromotrópica

Esta coloración combina la Tinción de Gram con la Coloración Tricrómica en caliente. Brevemente, el extendido fecal se secó al aire y se fijó con calor. El frotis se cubrió con Violeta de Genciana y después con Lugol, se decoloró con alcohol y por último, se sumergió en la solución Tricrómica caliente seguido de varios lavados en etanol. El frotis se enjuagó y observó al microscopio (Feldman y Guardis, 1990).

2.5.6.2.2- Detección de larvas parasitarias

Una pequeña porción de heces frescas fue incubada en una placa de agar tripticasa soya. La muestra fue incubada durante 6 días a temperatura ambiente, luego de la incubación, la placa se cubrió con formol 10% y el líquido recolectado fue centrifugado 10 minutos a 2.000 rpm. El sobrenadante fue descartado y el

sedimento se observó al microscopio con objetivos de 10X y 40X (figura 2.17) (Hernández *et al.*, 2001; Campo *et al.*, 2014; Khanna *et al.*, 2015).

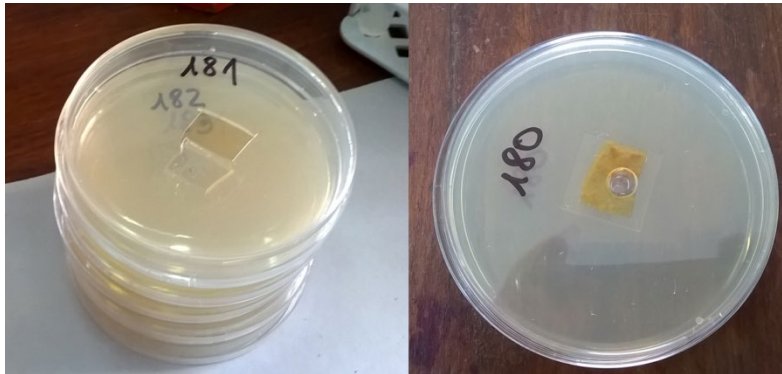


Figura 2.18: detalle de cultivo de larvas parasitarias en Agar Tripteina Soya (ATS).
Fuente: elaboración propia

2.6- Organización y validación de la información

Los resultados del estudio fueron cargados en una planilla de cálculo (Microsoft Office, Excel®, Microsoft Corporation). Los resultados obtenidos de fuentes primarias fueron datos generados por mediciones biofisiológicas incluyendo los análisis de laboratorio y las pruebas moleculares. Los resultados obtenidos de fuentes secundarias fueron información recopilada de la historia clínica informatizada. Los resultados obtenidos por cálculo matemático fueron edad (a partir de la fecha de nacimiento), estación del año (a partir de la fecha del estudio), georreferenciación de la vivienda de los participantes del estudio (a partir de la dirección postal).

La validación de la información cargada en la planilla electrónica se realizó mediante la revisión minuciosa y detallada de todos los resultados volcados a la base. En esta etapa, los datos recopilados fueron depurados mediante la evaluación de las inconsistencias en la información (palabras mal escritas, direcciones incompletas, resultados ausentes).

La confidencialidad de la información personal de cada participante fue resguardada cuidadosamente mediante la asignación de un número consecutivo interno que identifica al paciente sin mostrar la información sensible. Esta identificación numérica se utilizó en toda la investigación con el fin de proteger los datos del paciente y asegurar la trazabilidad de la información obtenida en este estudio.

2.7- Diseño y armado de los mapas digitales

2.7.1- Mapas de los casos de diarrea

El primer paso para el armado de mapas fue la georreferenciación espacial de la vivienda de cada niño con diarrea usando un archivo *shape* (shapefile de punto), de modo que a cada individuo se le asignaron coordenadas de latitud y longitud para su posterior análisis e investigación (Cromley y McLafferty 2012).

Los datos geográficos de la hoja de cálculo se importaron al software Quantum GIS (QGIS, versión 2.18.12). Este programa constituye un Sistema de Información Geográfica (SIG) libre y de código abierto distribuido por GNU (sistema operativo de software libre) patrocinado por el Chief Directorate: Spatial Planning & Information, Department of Land Affairs (DLA), Eastern Cape, en conjunto la Unidad de Gestión de Información Espacial, Oficina del Premier, Eastern Cape, Sudáfrica (<https://www.qgis.org/es/site/>).

Los archivos shape fueron volcados sobre un mapa de coordenadas proyectadas WGS 84- Pseudo Mercator (EPSG: 3857), utilizando como mapa base el provisto por Google Street Maps (<https://maps.google.com.ar/>). Los mapas temáticos finales se obtuvieron aplicando diversos criterios de selección de la información mediante la unión de dos conjuntos de datos distintas: la tabla base y las tablas de resultados obtenidos en el estudio.

2.7.2- Mapas de calor de los casos de diarrea

La estimación de la Densidad del núcleo o Estimador de densidad Kernel (KDE) es una herramienta de aplicación geoespacial basada en la función de núcleo. Esta técnica permite estimar de forma no paramétrica, la función de densidad de probabilidad de una variable aleatoria (Cromley y McLafferty 2012). Mediante la combinación de KDE y QGIS se obtuvo un gráfico que muestra la intensidad de los eventos estudiados sobre una superficie (dos dimensiones). Esta técnica se utilizó como análisis exploratorio para identificar posibles puntos calientes o puntos de alta concentración de casos o eventos (*hotspots*) en un área geográfica determinada.

En esta etapa, KDE se utilizó para visualizar la distribución espacial de los casos de diarrea en la ciudad de Tandil durante el período de estudio. Para el diseño de los mapas de densidad de núcleo o de calor, se aplicó una función gaussiana como estimador de densidad y los resultados se introdujeron en una cuadrícula espacial (ancho de banda) de 500 × 500 m de resolución (Cromley y McLafferty 2012). Los mapas temáticos finales se obtuvieron aplicando diversos criterios de selección de la información mediante la unión de dos conjuntos de datos distintas: la tabla base y las tablas de resultados obtenidos en el estudio.

2.8- Técnicas de carga y análisis estadístico de los resultados

2.8.1- Instrumentos para la carga y análisis de los datos

La carga y análisis de los datos se realizó mediante la utilización de planillas electrónicas Microsoft Excel® y de Infostat (versión libre, 2018).

2.8.2- Técnicas estadísticas de análisis de los datos

Las técnicas estadísticas de análisis de datos fueron técnicas descriptivas, de verificación de diferencias (Test de Chi cuadrado), con un nivel de confianza de 95%. La descripción cuantitativa de los datos demográficos fue realizada utilizando medidas de resumen como media y porcentajes. La investigación de

los predictores para la detección de patógenos se realizó comparando las características clínicas de los pacientes con presencia y ausencia de patógenos en las heces. Las variables continuas fueron analizadas con T-test para muestras independientes y expresadas como el valor medio \pm el desvío estándar. Las variables categóricas fueron evaluadas mediante la prueba exacta de Fisher o de Chi cuadrado. Los factores asociados a los casos positivos (patógenos en heces) fueron analizados usando el análisis de regresión logística multivariado. Para el análisis multivariado, se seleccionaron las variables significativas halladas en el análisis univariado. Un valor de probabilidad $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

3. Resultados

3.1.1- Perfil demográfico de los niños con diarrea

El grupo de estudio quedó constituido por 227 niños con diarrea. La edad promedio fue 3 años y 5 meses, con un leve predominio del género masculino (54%).

Los niños fueron categorizados en grupos etarios: lactantes menores (menores de 12 meses), lactantes mayores (13 a 24 meses), preescolares (2 a 5 años), escolares (6 a 11 años) y adolescentes (mayores de 11 años) (Nelson, 2013). La contribución porcentual de cada grupo etario al total de los casos estudiados fue la siguiente: lactantes menores (20%), lactantes mayores (30%), preescolares (31%), escolares (14%) y adolescentes (5%). La población infantil menor de 5 años representó el 81% de los casos totales de diarrea estudiados en el período (figura 3.1)

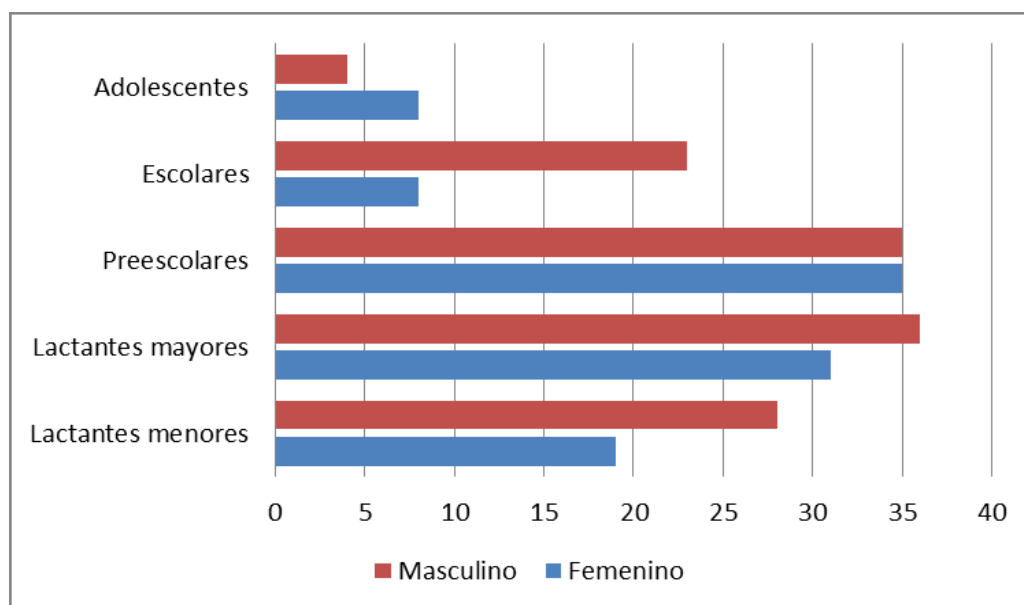


Figura 3.1: perfil demográfico de los niños con diarrea. Número de niños con diarrea estudiados según grupo etario. Tandil, 2016-2017. Fuente: elaboración propia.

3.1.2- Perfil clínico de los niños con diarrea

De acuerdo a su perfil clínico, los niños con diarrea fueron categorizados en: cuadros agudos si la duración temporal era menor a 7 días, cuadros prolongados, si la diarrea continuaba entre 7 y 13 días, y cuadros persistentes si la duración era mayor a 13 días (Shane *et al.*, 2017; González Corona *et al.*, 2017). La mayor frecuencia de casos estuvo representada por la diarrea aguda, mientras que las otras categorías se observaron en menor proporción (tabla 3.1, figura 3.2).

Tipos de Diarrea	Frecuencia	
	n	%
Aguda	180	79
Prolongada	31	14
Persistente	16	7
TOTAL	227	100

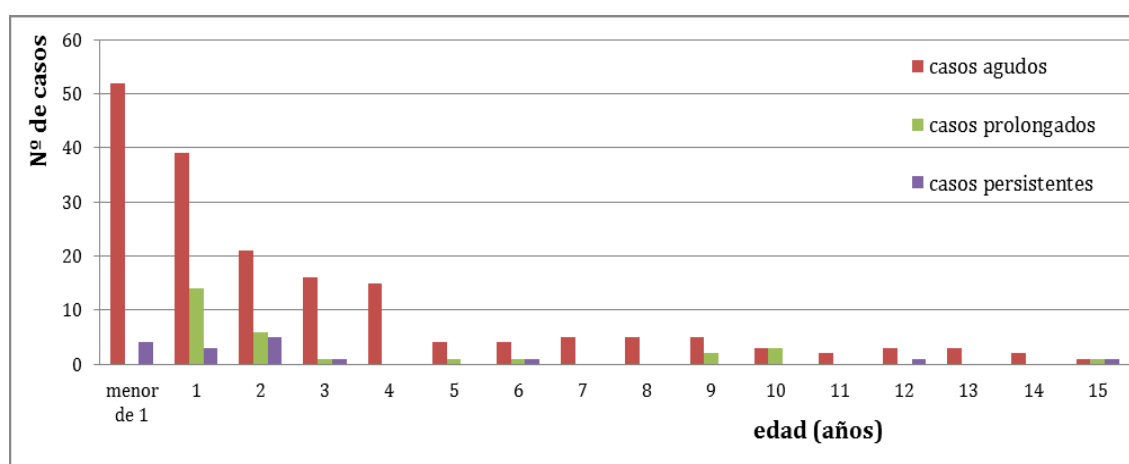


Figura 3.2: número de casos de diarrea según edad y duración temporal del cuadro. Tandil 2016-2017. Fuente: elaboración propia.

Los cuadros agudos fueron prevalentes en todos los grupos etarios (72% a 91%). Los cuadros prolongados presentaron frecuencias menores a 24% y los persistentes variaron entre 4 y 17% (figura 3.3).

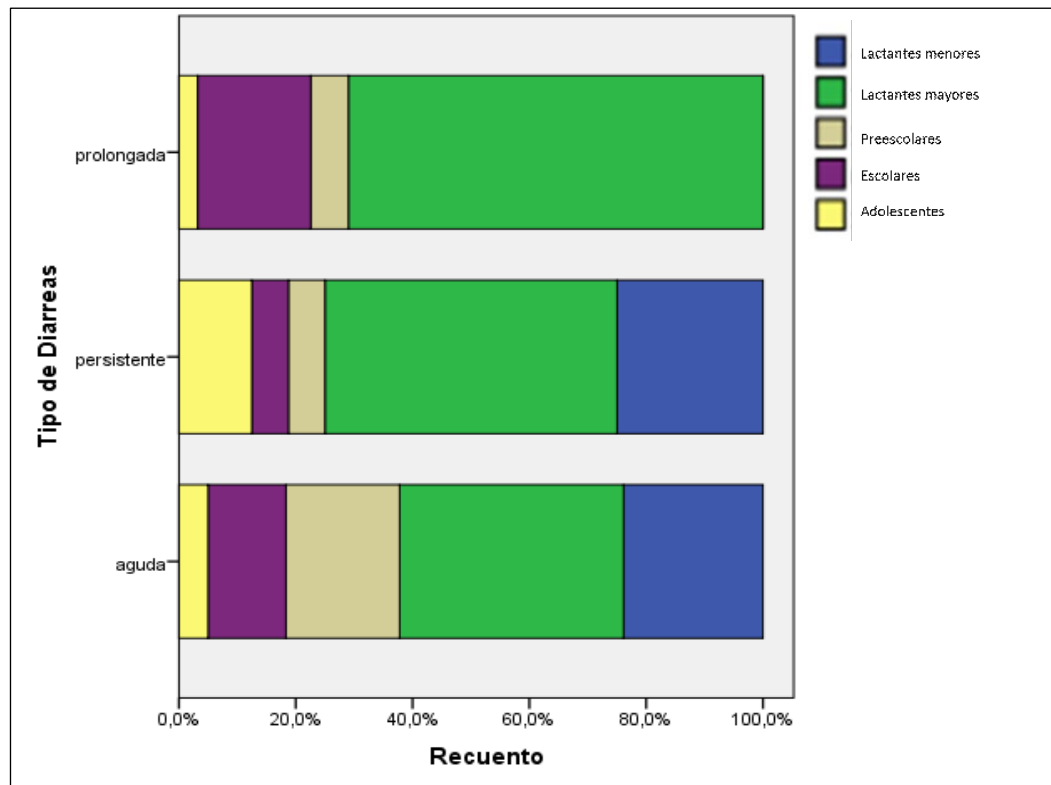


Figura 3.3: frecuencia de casos según tipo de diarrea y grupo etario. Tandil, 2016-2017. Fuente: elaboración propia.

El promedio global de días de diarrea en los 227 niños fue $4,6 \pm 3,5$ días. Este resultado presentó variaciones según el grupo etario y la estación del año, alcanzando los valores más elevados en lactantes mayores y en verano (tabla 3.2, figuras 3.4 y 3.5).

Tabla 3.2: Duración temporal del cuadro diarreico de 227 niños según tipo de diarrea. Tandil. 2016-2017		
Tipo de Diarrea	$\bar{X} \mp S^a$ (días)	[LI; LS] 95% ^b (días)
Aguda	3,5 ± 1,2	3,4; 3,7
Prolongada	8,4 ± 1,5	7,9; 9,0
Persistente	15,6 ± 1,9	14,5; 16,6

a- \bar{X} : promedio, S:desvío estándar
b- LI: límite inferior, LS: límite superior

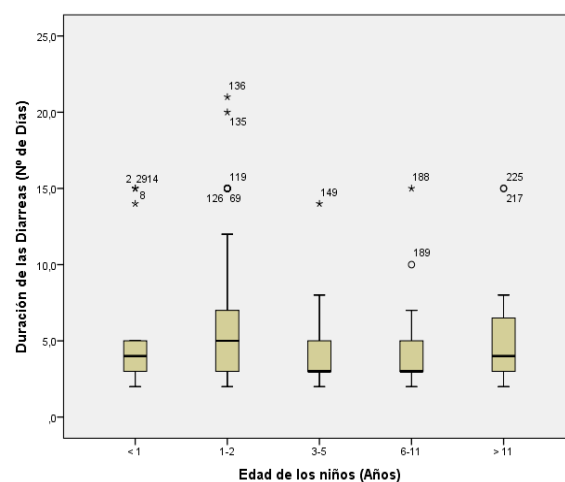


Figura 3.4: diagrama de cajas y bigotes (*box-plot*) sobre la duración de la diarrea según edad de los niños. Tandil, 2016-2017. Fuente: elaboración propia.

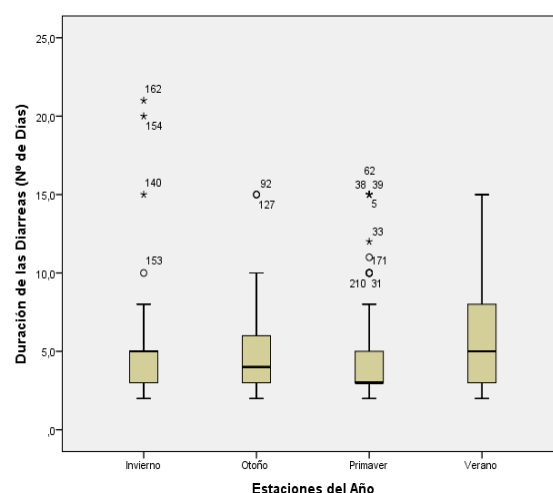


Figura 3.5: diagrama de cajas y bigotes (*box-plot*) sobre la duración de la diarrea según estación del año. Tandil, 2016-2017. Fuente: elaboración propia.

En el período de estudio se registraron 1.149 días con diarrea. Los niños con cuadros agudos, prolongados y persistentes contribuyeron con el 55%, 23% y 22% de los días totales con diarrea, respectivamente (figura 3.6)

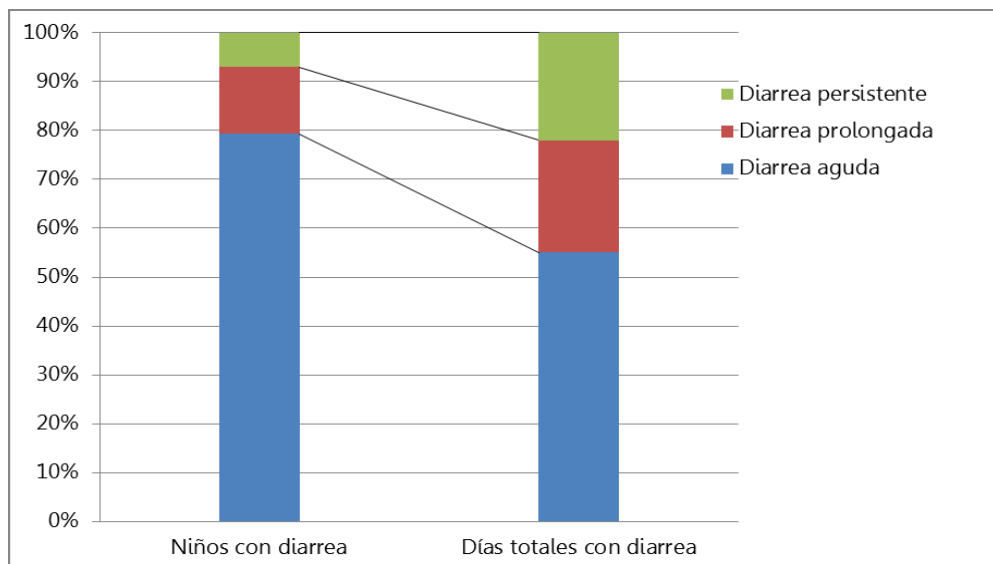


Figura 3.6: número de días con diarrea y contribución porcentual al total de días con diarrea para los cuadros agudos, prolongados y persistentes. Tandil, 2016-2017. Fuente: elaboración propia.

Las manifestaciones clínicas más frecuentes en los niños con diarrea fueron vómitos ($n=87$; 38%) y deshidratación ($n=34$; 15%). Los signos y síntomas restantes como anorexia, pujo, tenesmo, dolor abdominal y otros asociados al cuadro que motivó la consulta médica fueron reportados en muy baja proporción y se incluyeron en una única categoría (otros) (figura 3.7).

La presencia de diarrea, vómitos y deshidratación fue observada con mayor frecuencia en los casos de DAG, sin embargo, esta diferencia no fue significativa ($p=0,110$).

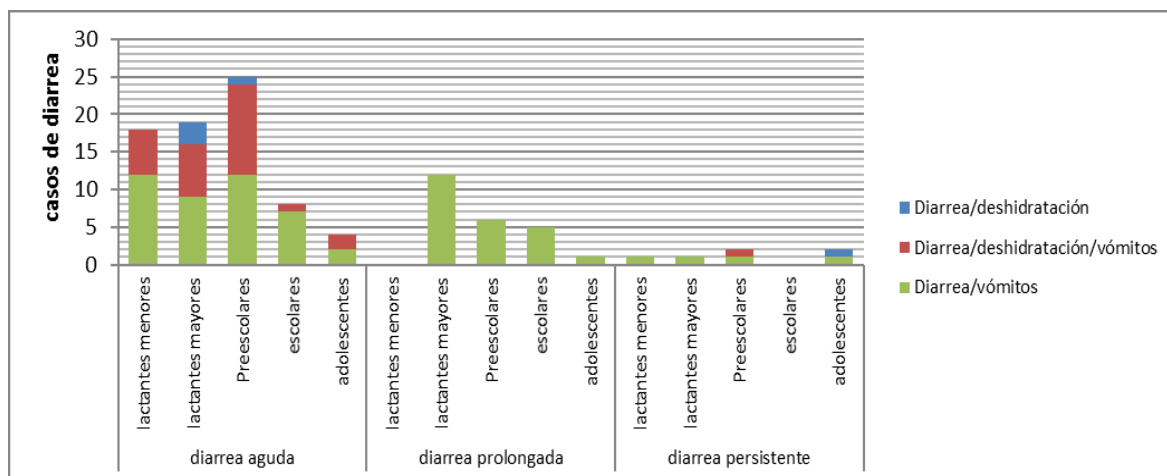


Figura 3.7: manifestaciones clínicas de los niños con diarrea según el grupo etario y el tipo de diarrea. Tandil. 2016-2017. Fuente: elaboración propia

3.2- Estudio macroscópico y microscópico de las heces

3.2.1- Aspecto macroscópico: forma y consistencia de las heces

Las heces de los niños con diarrea fueron categorizadas según forma y consistencia utilizando la Escala de Bristol. Las heces diarreicas (categorías 6: heces pastosas y categoría 7: heces líquidas) fueron las presentaciones más frecuentes (82%), mientras que las categorías 1 y 2 (heces duras) no fueron observadas.

Las heces formes (categorías 4 y 5) se observaron en todos los tipos de diarrea. Cuatro muestras fecales de niños con diarrea aguda presentaron muy escaso volumen y no pudieron ser valoradas.

Los cuadros agudos y prolongados presentaron una mayor frecuencia de heces líquidas mientras que, los persistentes mostraron un predominio de heces pastosas, sin embargo, dicha diferencia no fue significativa ($p=0,240$) (figura 3.8)

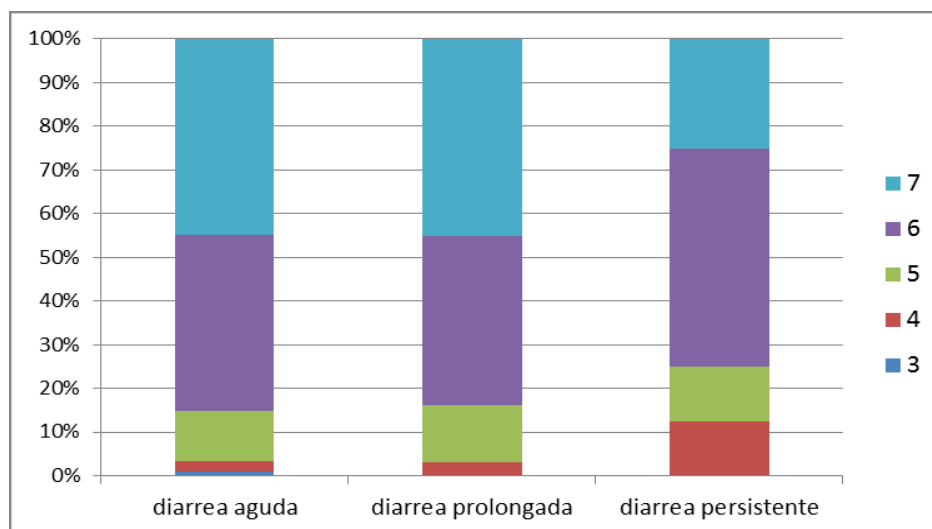


Figura 3.8: proporción de niños con cada tipo de diarrea según las categorías de la Escala de Bristol: heces formes (3 y 4), heces pastosas (5 y 6), heces líquidas (7). Tandil, 2016-2017. Fuente: elaboración propia.

3.2.2- Aspecto microscópico: presencia de leucocitos y hematíes fecales

Las heces de los 227 niños fueron categorizadas en 4 grupos (I, II, III y IV) según la presencia de leucocitos y/o hematíes fecales. La categoría I (ausencia de ambos elementos) representó el 75% de todos los casos de diarrea (tabla 3.3 y gráfico 3.9).

Grupo	Leucocitos	Hematíes	Frecuencia	
			n	%
I	No	No	171	75
II	No	Si	18	8
III	Si	No	6	3
IV	Si	Si	32	14
Total			227	100

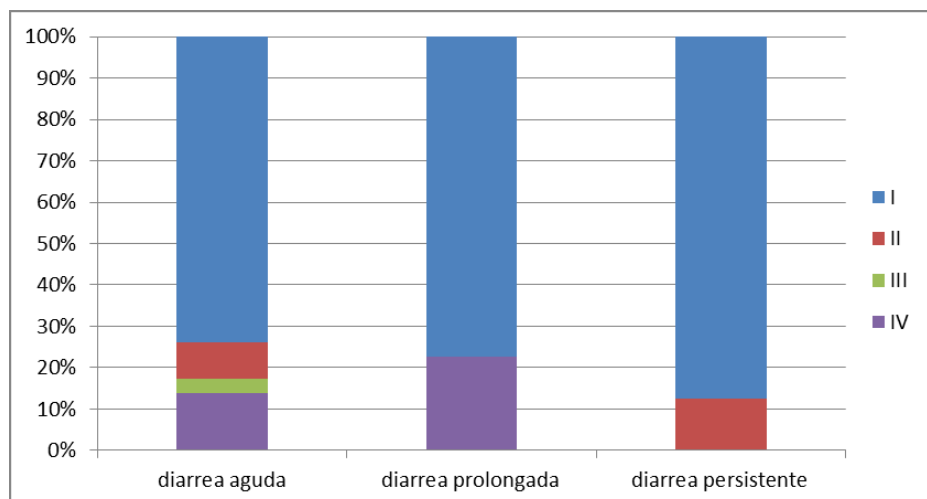


Figura 3.9: frecuencia de niños con cada tipo de diarrea según la presencia de leucocitos y/o hemáties en las heces. Tandil, 2016-2017. Fuente: elaboración propia.

3.2.3- Patógenos bacterianos

3.2.3.1- Caracterización fenotípica de bacterias patógenas

Los patógenos hallados mediante cultivo (coprocultivo) fueron *E. coli* diarreigénica, *S. enterica* y *Shigella* spp. No se detectaron niños con *Aeromonas* spp. o *Vibrio* spp. El rendimiento del coprocultivo fue 33,5% (76/227) (tabla 3.4, figuras 3.10, 3.11 y 3.12).

Bacterias enteropatógenas		frecuencia	
		n	%
<i>Escherichia coli</i>	Enteropatógena (EPEC)	58	76
	<i>E. coli</i> O157	2	3
<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i> (OMA)	5	7
	<i>enterica</i> (OMB)	1	1
<i>Shigella</i>	<i>flexneri</i>	9	12
	<i>sonnei</i>	1	1
TOTAL		76	100

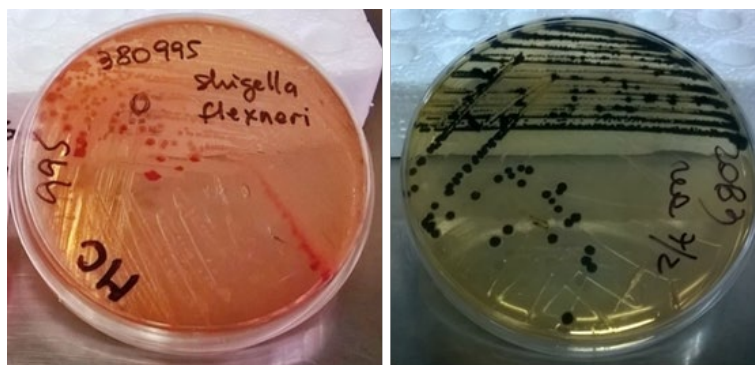


Figura 3.10: fotografía de cultivos bacterianos de *Shigella* spp. y *S. enterica* provenientes de niños con diarrea. **Izquierda:** Agar MacConkey. **Derecha:** Agar Tripteina Soya. Tandil, 2016-2017. Fuente: elaboración propia.



Figura 3.11: fotografía de cultivos bacterianos de *E. coli* provenientes de niños con diarrea. **Izquierda:** Agar MacConkey. **Derecha:** Agar cromogénico. Tandil, 2016-2017. Fuente: elaboración propia.

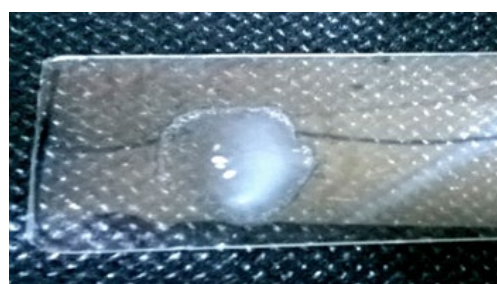


Figura 3.12: prueba inmunológica para identificación de *Shigella* spp. En la fotografía se observa aglutinación positiva con antisuero para *S. flexneri* proveniente de cultivo de un niño con diarrea. Tandil, 2016-2017. Fuente: elaboración propia.

3.2.3.2- Perfiles de resistencia bacteriana a los antimicrobianos de utilización clínica

En el período de estudio se hallaron 10/227 (4,4%) niños infectados con *Shigella* spp. Las especies detectadas fueron *S. flexneri* (90%) y *S. sonnei* (10%). Los perfiles de resistencia antimicrobiana fueron diversos. El 60% de los aislamientos de *Shigella* spp. mostró resistencia a los betalactámicos.

Las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) produjeron resistencia a todas las penicilinas, cefalosporinas y aztreonam. La presencia del fenotipo BLEE fue detectada mediante Cefpodoxima (CPD) y se observó en 20% de los aislamientos. Los perfiles de resistencia de las especies de *Shigella* a los antimicrobianos se presentan en la tabla 3.5.

Tabla 3.5: Perfil de resistencia a los antimicrobianos en aislamientos de <i>Shigella</i> spp. provenientes de niños con diarrea. Tandil. 2016-2017			
Perfiles de resistencia	Nº de aislamientos de <i>Shigella</i> (n)		
	<i>S. flexneri</i>	<i>S. sonnei</i>	Total
Sensible a todos los antimicrobianos ensayados	2	0	2
AMP	5	0	5
AMS	1	0	1
AMP/TMS	0	1	1
CIP/NAL	1	0	1
Total	9	1	10

AMP: ampicilina; AMS: ampicilina-sulbactam; TMS: trimetoprima-sulfametoxazol, CIP: ciprofloxacina, NAL: ácido nalidíxico; FOS: fosfomicina; CRO: ceftriaxona

3.2.3.4- Caracterización genotípica de *Escherichia coli* diarreigénico

3.2.3.4.1- Cultivo y extracción de ADN

Las muestras de materia fecal presentaron un crecimiento bacteriano adecuado en los medios de cultivo MacConkey y Chrom-Agar, permitiendo la realización de los métodos moleculares. Los cultivos bacterianos de heces, tanto primarios como secundarios y la morfología de las colonias bacterianas observadas en dichos cultivos se presentan en las figuras 3.13, 3.14, 3.15 y 3.16.

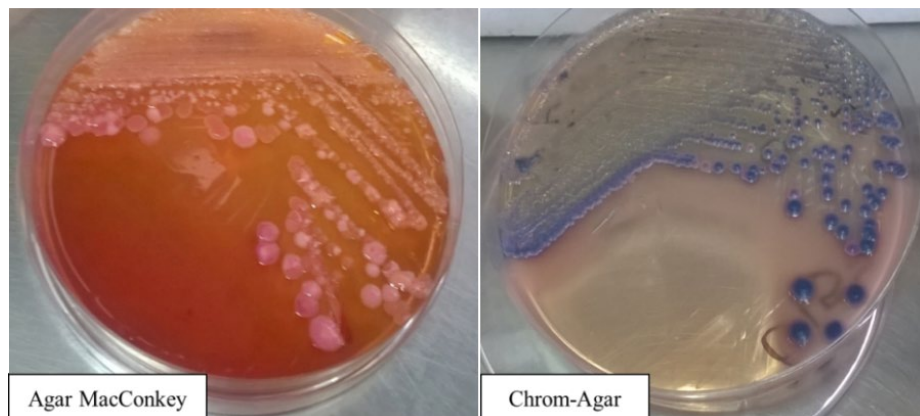


Figura 3.13: fotografías del cultivo bacteriano primario obtenido de un niño con diarrea. **Izquierda:** Agar MacConkey. **Derecha:** Chrom-Agar. Tandil, 2016-2017. Fuente: elaboración propia.

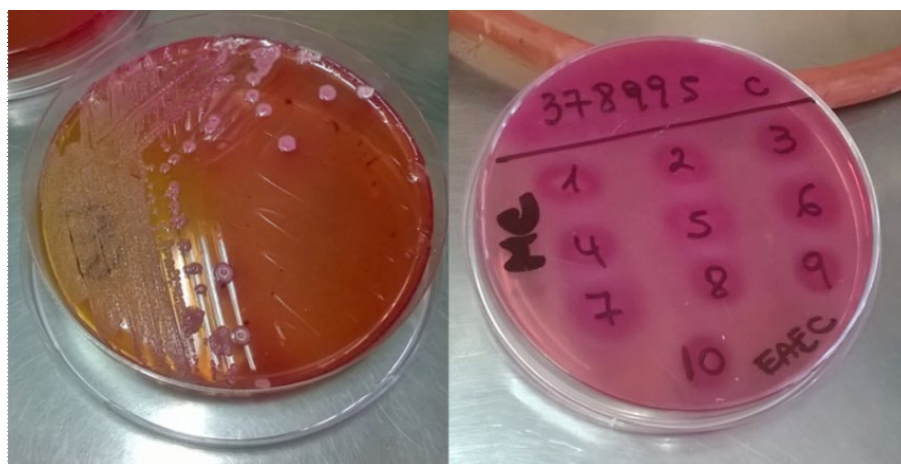


Figura 3.14: fotografías de cultivos bacterianos en Agar MacConkey obtenidos de un niño con diarrea. **Izquierda:** detalle de cultivo primario. **Derecha:** detalle de cultivo secundario donde se observan las diez colonias aisladas. Tandil, 2016-2017. Fuente: elaboración propia.

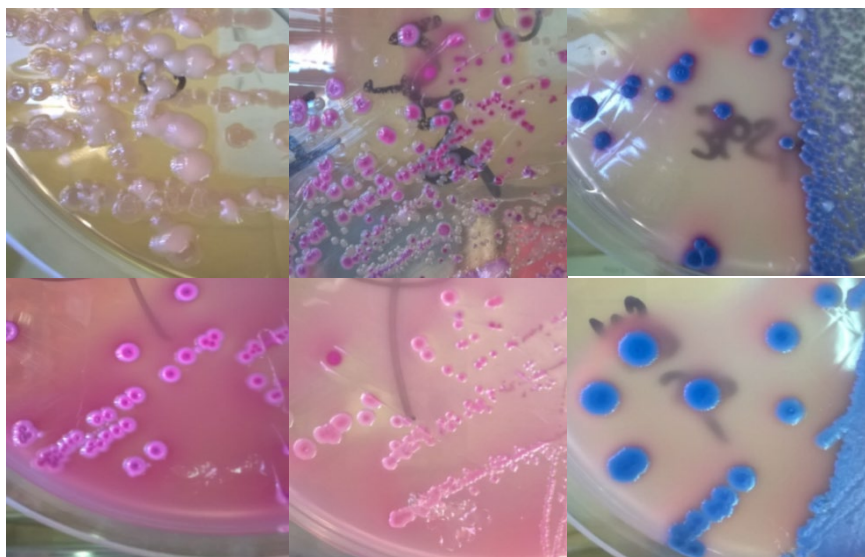


Figura 3.15: fotografías de cultivos de heces en Agar MacConkey y Chrom-Agar obtenidas de niños con diarrea. Detalle de la morfología de las distintas colonias bacterianas provenientes del cultivo primario. Tandil, 2016-2017. Fuente: elaboración propia.

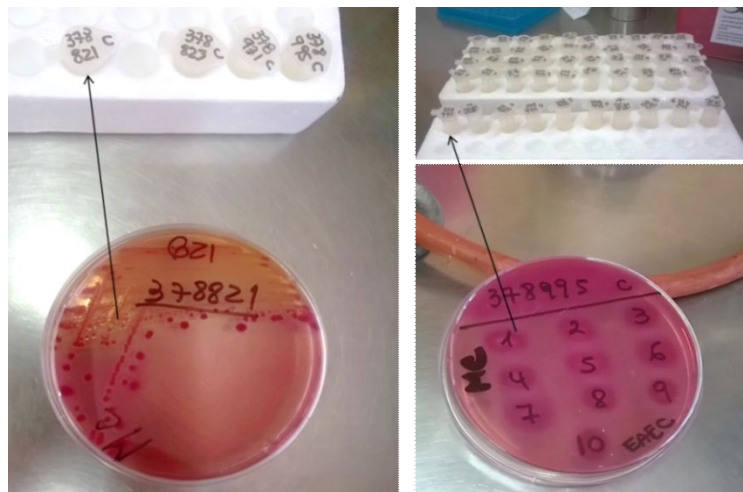


Figura 3.16: fotografías de los cultivos bacterianos en agar MacConkey obtenidos de niños con diarrea. **Izquierda:** detalle del cultivo primario para la obtención ADN de confluencia bacteriana. **Derecha:** detalle del cultivo secundario para la obtención ADN de diez colonias aisladas. Tandil, 2016-2017. Fuente: elaboración propia.

3.2.3.4.2-Amplificación de genes de virulencia de cepas control de *E. coli*

La puesta a punto de la metodología de PCR permitió la amplificación de todos los genes de virulencia de las cepas control (figura 3.17).

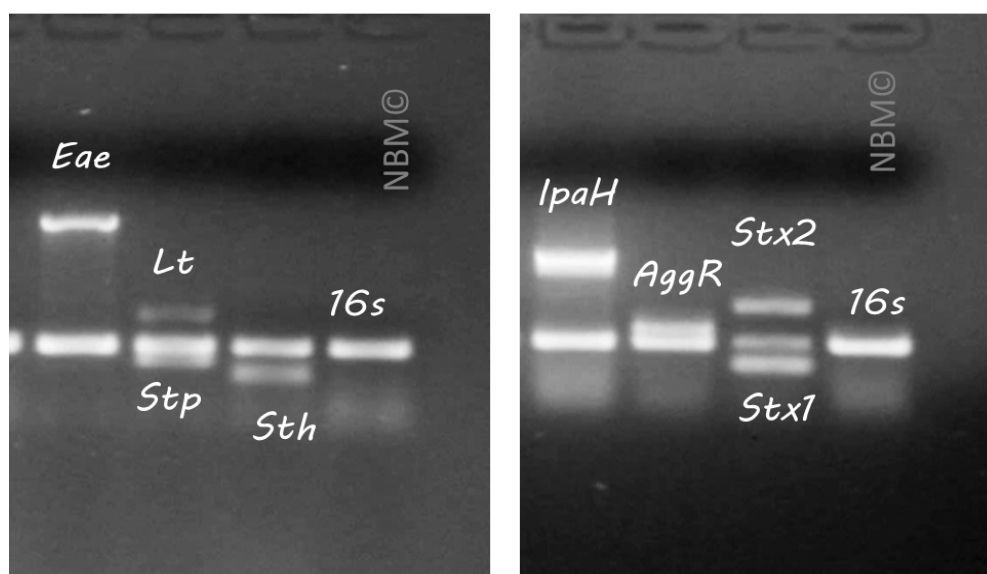


Figura 3.17: fotografía de los productos de amplificación de factores de virulencia de *Escherichia coli* en gel de agarosa con cepas control (*E. coli* 2348/69, *E. coli* KNH-172, *E. coli* O126-53, *E. coli* C-481, *E. coli* 17-2, *E. coli* 110/05 y *E. coli* ATCC 25922). **Izquierda:** PCR múltiple 1, mPCR1. Línea 1: control negativo (*16S*, 204 pb), línea 2: gen intimina (*eae*, 864 pb), línea 3: genes de toxina termolábil (*lt*, 322 pb) y termoestables (*stp*, 166 pb), línea 4: gen toxina termoestable (*sth*, 120 pb), línea 5: cepa ATCC 95922 (*16S*, 204 pb). **Derecha:** PCR múltiple 2, mPCR2. Línea 1: control negativo (*16S*, 204 pb), línea 2: gen Antígeno plasmídico de invasión H (*IpaH*, 619 pb), línea 3: gen Activador transcripcional R (*AggR*, 254 pb), línea 4: genes de las toxinas Shiga 1 (*stx1*, 130 pb) y Shiga 2 (*stx2*, 346 pb), línea 5: cepa ATCC 95922 (*16S*, 204 pb). Fuente: elaboración propia.

3.2.3.4.3- Amplificación de genes de virulencia de aislamientos clínicos de *E. coli* diarreigénico

La estrategia de amplificación aplicada demostró la presencia de seis genes de virulencia. Los factores hallados fueron intimina, antígeno plasmídico de invasión H, activador transcripcional R y tres exotoxinas (*lt*, *stp* y *stx2*). Dos toxinas bacterianas (*stp* y *stx1*) no fueron detectadas. (Tabla 3.6 y figura 3.18).

Tabla 3.6: Factores de virulencia bacterianos investigados por métodos moleculares en las heces de niños con diarrea. Tandil. 2016-2017.

Gen	Factores de virulencia	frecuencia	
		n	%
<i>eae</i>	Intimina	7	21
<i>lt</i>	Toxina termolábil	5	15
<i>stp</i>	Toxina termoestable	1	3
<i>sth</i>	Toxina termoestable	-	0
<i>ipaH</i>	Antígeno plasmídico de invasión H	6	18
<i>AggR</i>	Activador transcripcional R	12	35
<i>stx1</i>	Toxinas Shiga 1	0	0
<i>stx2</i>	Toxinas Shiga 2	3	8
TOTAL		34	100

(-): No detectado

El 82% de los genes de virulencia (n=28) pertenecieron a 25 aislamientos de *E. coli* diarreigénica, mientras que todos los aislamientos con *ipaH* positivo (18%) correspondieron al género *Shigella* spp.

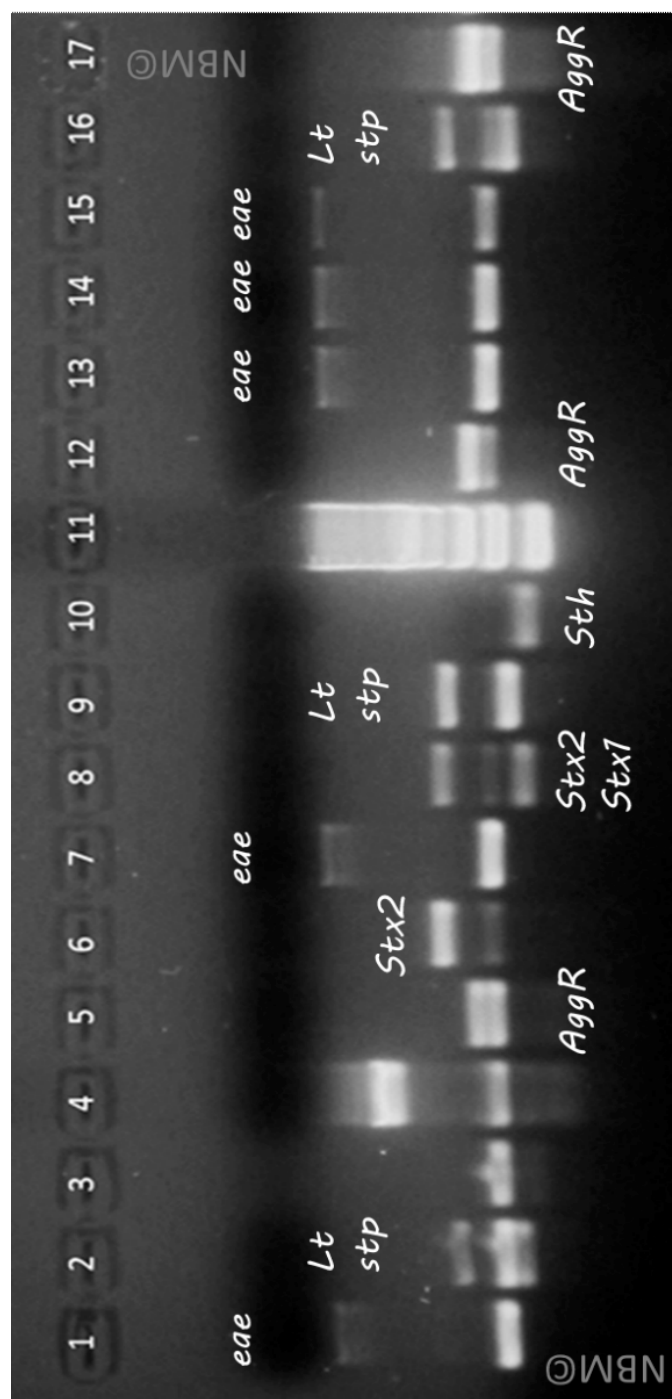


Figura 3.18: fotografía de los productos de amplificación de los factores de virulencia de *Escherichia coli*. Intimina: líneas 1, 7, 13, 14 y 15. Toxina termolábil: 2, 9, 16. Antígeno plasmídico de invasión: línea 4. Toxina Shiga 2: línea 6. Toxinas shiga 1 y 2: línea 8. Toxina termoestable: línea 2. Activador transcripcional: líneas 5, 12 y 17. Líneas 1 a 17: gen 16S, control de amplificación.

3.2.3.4.4- Detección de los patotipos diarreigénicos de *Escherichia coli* mediante tamizaje molecular

Los métodos moleculares de tamizaje permitieron detectar los diferentes genes de virulencia en las heces de los pacientes con diarrea (figura 3.19).

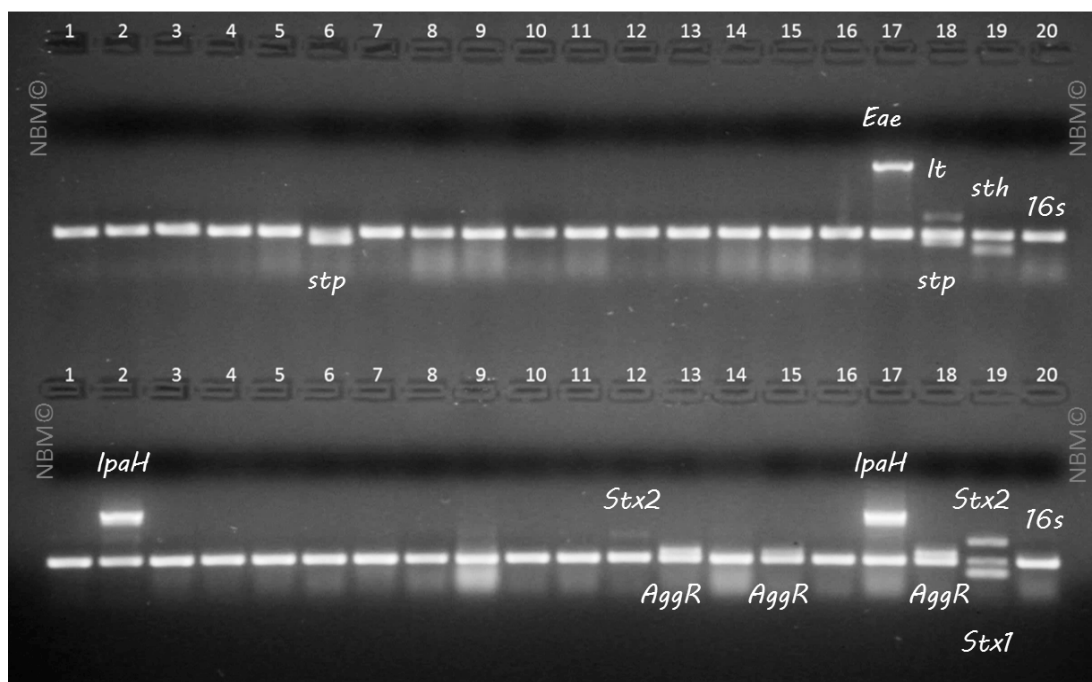


Figura 3.19: fotografía de los productos de amplificación de los factores de virulencia de *Escherichia coli* diarreigénica mediante dos PCR múltiples. **Arriba:** PCR tamizaje, mPCR1. Líneas 1 a 16 corresponden a ADN de confluencia bacteriana de 16 pacientes distintos. Línea 6: gen *stp* positivo, líneas 1 a 5 y 7 a 16: sin amplificación, línea 17: cepa control del gen intimina (*eae*, 864 pb), línea 18: cepa control de genes de toxina termolábil (*lt*, 322 pb) y termoestable (*stp*, 166 pb), línea 19: cepa control del gen toxina termoestable (*sth*, 120 pb), línea 20: cepa control ATCC 95922 (*16S*, 204 pb). Niños con diarrea. Tandil, 2016-2017. Fuente: elaboración propia. **Abajo:** PCR tamizaje, mPCR2. Líneas 1 a 16 corresponden a ADN de confluencia bacteriana de 16 pacientes distintos. Línea 2: gen *ipaH* positivo, línea 12: *stx2* positivo, líneas 13 y 15 gen *aggR* positivo, línea 1, 3 a 12, 14, 16: sin amplificación, línea 17: cepa control del gen Antígeno plasmídico de invasión H (*ipaH*, 619 pb), línea 18: cepa control del gen Activador transcripcional R (*AggR*, 254 pb), línea 19: cepa control de genes de las toxina

Shiga 1 (*stx1*, 130 pb) y toxina shiga 2 (*stx2*, 346 pb), línea 20: cepa control ATCC 95922 (*16S*, 204 pb). Niños con diarrea. Tandil, 2016-2017. Fuente: elaboración propia.

3.2.3.4.5- Detección de los patotipos diarreigénicos de *Escherichia coli* mediante PCR confirmatoria.

La PCR confirmatoria y la caracterización fenotípica de la colonia aislada permitieron identificar los aislamientos bacterianos de *E. coli* diarreigénica (figura 3.20 y 3.21).

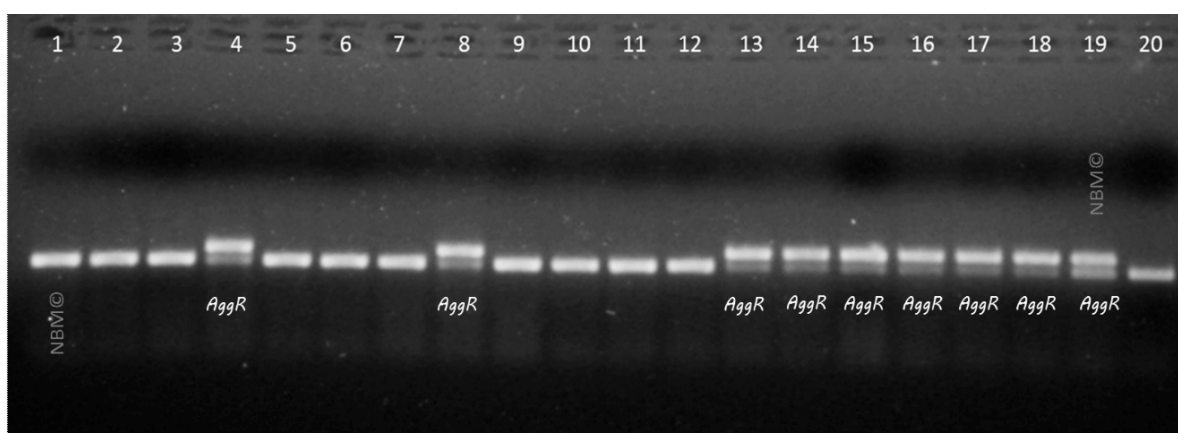


Figura 3.20: fotografía de los productos de amplificación de los factores de virulencia de *Escherichia coli* (mPCR2). Líneas 1 a 18 corresponden a ADN de colonias aisladas. Línea 1 a 3: sin amplificación, líneas 4: gen *AggR* positivo, líneas 5 a 7: sin amplificación, línea 8: gen *aggR* positivo, línea 9 a 12: sin amplificación, líneas 13 a 18: gen *AggR* positivo, línea 19: cepa control del gen Activador transcripcional R (*AggR*, 254 pb), línea 20: cepa control ATCC 95922 (*16S*, 204 pb). Niños con diarrea. Tandil, 2016-2017. Fuente: elaboración propia.

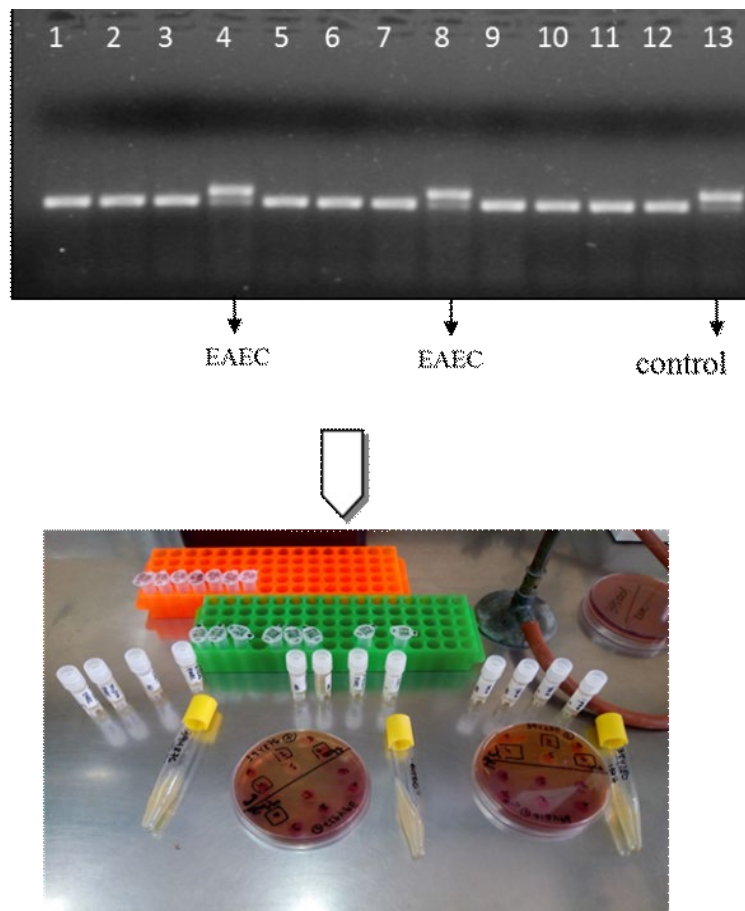


Figura 3.21: obtención de cepa de *E. coli* enteroagregativa (EAEC) mediante PCR, aislamiento y criopreservación bacteriana. **Arriba:** gel de agarosa de PCR confirmatoria (mPCR2). Líneas 4 y 8: gen *aggR* positivo proveniente de un niño con diarrea, línea 13: control positivo. **Abajo:** detalle del aislamiento y criopreservación de la cepa EAEC hallada.

3.2.3.4.6- Caracterización de los aislamientos de *E. coli* diarregénicos

El patotipo diarregénico más frecuente en los niños con diarrea fue *E. coli* enteroagregativa (48%), mientras que *E. coli* enteroinvasiva no fue hallada en este estudio (tabla 3.7 y figuras 3.22, 3.23, 3.24 y 3.25).

Tabla 3.7: frecuencia de patotipos de *Escherichia coli* diarreigénicos identificados por PCR, en niños con diarrea. Tandil. 2016-2017.

Patotipo		Genes detectados	Frecuencia de patotipos	
			n	%
<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa	EAEC	<i>aggR</i>	12	48
<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica	EPEC	<i>lt</i>	5	20
<i>Escherichia coli</i> enteropatogénica	EPEC	<i>eae</i>	4	16
<i>Escherichia coli</i> productora de toxina shiga	STEC	<i>eae+stx2</i>	3	12
<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica	EPEC	<i>stp</i>	1	4
TOTAL			25	100

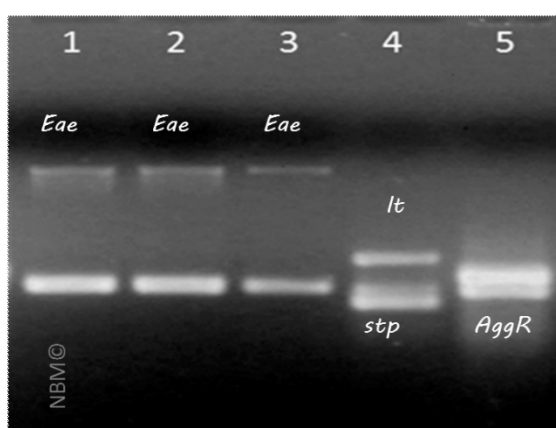


Figura 3.22: fotografía de los productos de amplificación de los factores de virulencia de **EPEC** (mPCR1). Líneas 1 y 2: pacientes con **EPEC** (gen *eae* positivo), línea 3: cepa control del gen intimina (*eae*, 864 pb), línea 4: cepa control de genes de toxina termolábil (*lt*, 322 pb) y termoestable (*stp*, 166 pb), línea 5: cepa control del gen Activador transcripcional R (*AggR*, 254 pb). Niños con diarrea. Tandil, 2016-2017. Fuente: elaboración propia.

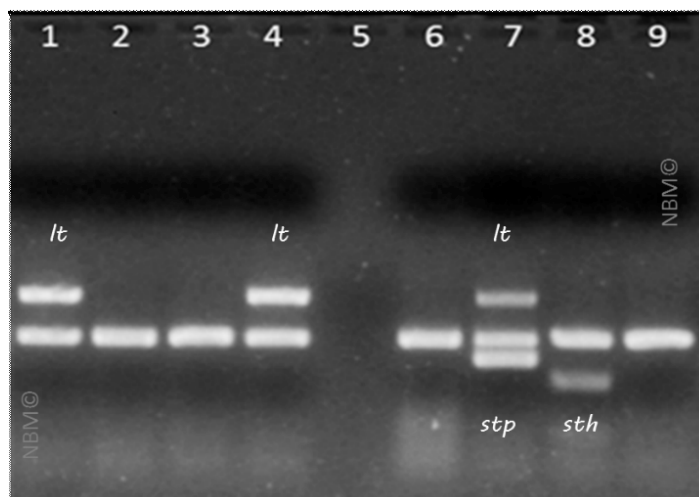


Figura 3.23: fotografía de los productos de amplificación de los factores de virulencia de ETEC (mPCR1). Líneas 1 y 4: pacientes con **ETEC-LT** (gen *lt* positivo), líneas 2 y 3: sin amplificación, línea 7: cepa control de genes de toxina termolábil (*lt*, 322 pb) y termoestable (*stp*, 166 pb), línea 8: cepa control del gen toxina termoestable (*sth*, 120 pb), línea 9: cepa control ATCC 95922 (*16S*, 204 pb).

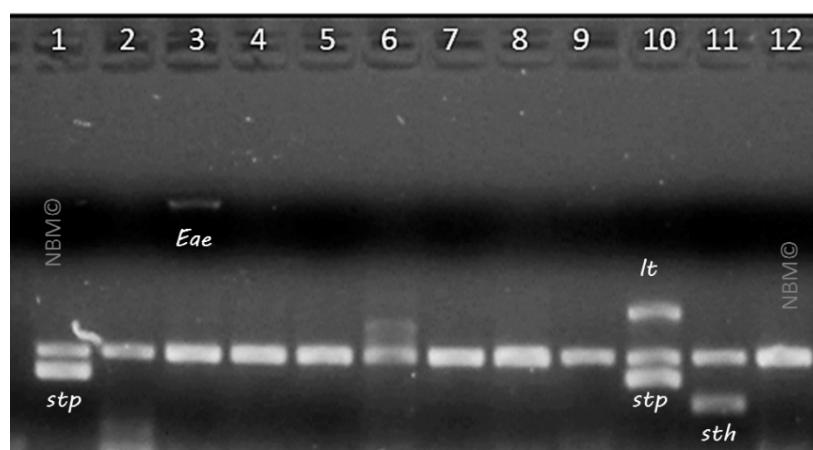


Figura 3.24: fotografía de los productos de amplificación de los factores de virulencia de ETEC (mPCR1). Línea 1: pacientes con **ETEC-STP** (gen *stp* positivo), línea 2: sin amplificación, línea 3: paciente con gen *eae* positivo, líneas 4 a 9: sin amplificación, línea 10: cepa control de genes de toxina termolábil (*lt*, 322 pb) y termoestable (*stp*, 166 pb), línea 11: cepa control del gen toxina termoestable (*sth*, 120 pb), línea 12: cepa control ATCC 95922 (*16S*, 204 pb). Niños con diarrea. Tandil, 2016-2017. Fuente: elaboración propia.

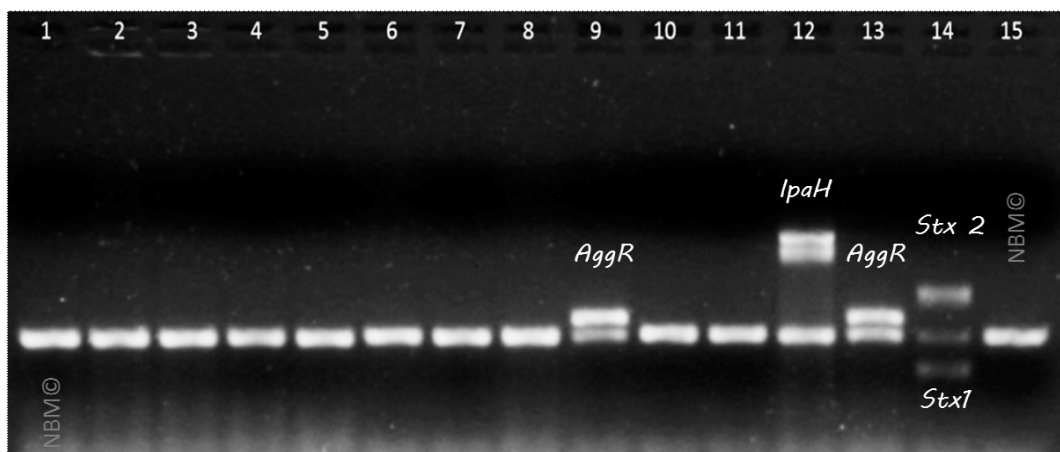


Figura 3.25: fotografía de los productos de amplificación de los factores de virulencia de EAEC (mPCR2). Líneas 1 a 11 corresponden a ADN confluencia bacteriano de 11 pacientes distintos. Línea 1 a 8: sin amplificación, línea 9: paciente con **EAEC** (gen *aggR* positivo), líneas 10 y 11: sin amplificación, línea 12: cepa control del gen Antígeno plasmídico de invasión H (*IpaH*, 619 pb), línea 13: cepa control del gen Activador transcripcional R (*AggR*, 254 pb), línea 14: cepa control de genes de las toxina Shiga 1 (*stx1*, 130 pb) y toxina shiga 2 (*stx2*, 346 pb), línea 15: cepa control ATCC 95922 (*16S*, 204 pb). Fuente: elaboración propia.

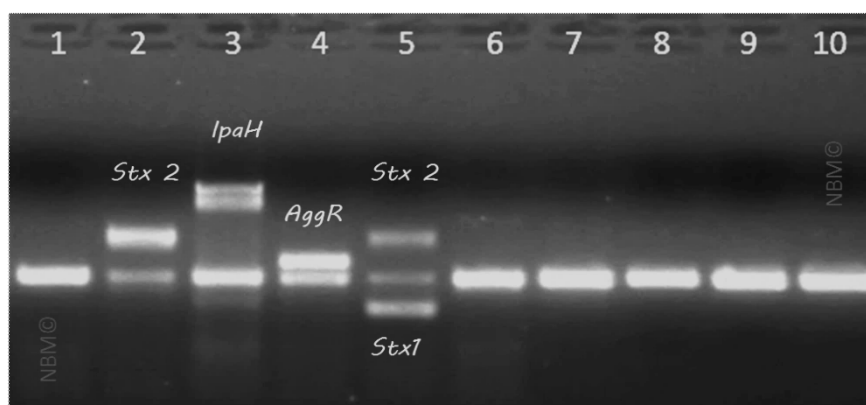


Figura 3.26: fotografía de los productos de amplificación de los factores de virulencia de STEC (mPCR2). Línea 1: sin amplificación, línea 2: paciente con **STEC** (gen *stx2* positivo), línea 3: cepa control del gen Antígeno plasmídico de invasión H (*IpaH*, 619 pb), línea 4: cepa control del gen Activador transcripcional R (*AggR*, 254 pb), línea 5: cepa control de genes de las toxina shiga 1 (*stx1*, 130 pb) y toxina shiga 2 (*stx2*, 346 pb), línea 6: cepa control ATCC 95922 (*16S*, 204 pb), líneas 7 a 10: sin amplificación. Niños con diarrea. Fuente: elaboración propia.

Con el fin de categorizar los tres aislamientos de STEC obtenidos, se subtipificaron aplicando métodos inmunológicos y moleculares. Estos estudios fueron realizados en el laboratorio de Fisiopatogenia Bacteriana del Instituto ANLIS-Malbrán, Buenos Aires, Argentina (tabla 3.8)

Factor de virulencia	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3
Serotipo (O:H)	O145:H28	O157:H7	O157:H7
<i>eae</i>	Positivo	Positivo	Positivo
<i>stx1</i>	Negativo	Negativo	Negativo
<i>stx2</i>	Positivo	Positivo	Positivo
Variante <i>stx</i>	2a	2a	2a
<i>ehxA</i> (enterohemolisina)	Positivo	Positivo	Positivo
<i>rfbO157(O157)</i>	Negativo	Positivo	Positivo
<i>fliC</i> (H7)	Negativo	Positivo	Positivo

Los aislamientos STEC fueron categorizados en: cepas O157 (n=2; 67%) y cepas No-O157 (n=1; 33%). A partir de los resultados obtenidos, se confirmó que las tres cepas STEC aisladas pertenecen al subgrupo de EHEC (100%). Estos tres aislamientos presentaron la variante Stx_{2a} de la toxina Shiga y fueron positivas para el gen de la enterohemolisina.

El estudio de la relación clonal entre cepas bacterianas provenientes de distintos orígenes puede estudiarse mediante Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE). Una de las cepas STEC obtenida en este estudio (08/03/2017) proveniente de una niña con diarrea sanguinolenta, residente de Tandil (Buenos Aires) presentó el mismo patrón molecular por PFGE que una cepa STEC aislada en una fecha cercana (12/03/2017) proveniente de otro niño con SHU internado en un hospital de la Provincia de Santa Fe. Los patrones de restricción de ambas cepas fueron idénticos (100% de similitud) y correspondieron al Patrón PFGE, XbaI, AREXHX01.0011 y Patrón PFGE, BlnI, AREXHA26.0097 (figura 3.27) Estos

estudios fueron realizados en el laboratorio de Fisiopatogenia bacteriana del Instituto ANLIS-Malbrán, Buenos Aires, Argentina.

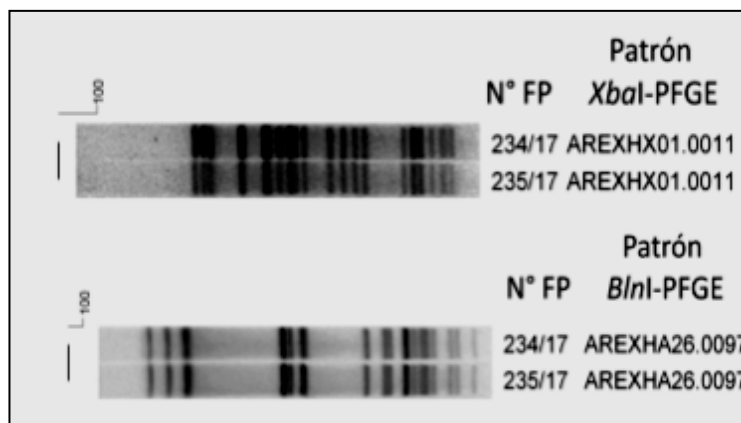


Figura 3.27: patrones de restricción PFGE de dos aislamientos STEC pertenecientes a dos pacientes pediátricos, uno con cuadro de diarrea sanguinolenta y otro con síndrome urémico hemolítico. 2017.

3.2.3.5- Patógenos virales

En el período de estudio se detectaron ocho niños con antígenos de Rotavirus en las heces. No se observó ningún niño infectado con Adenovirus (figura 3.28).



Figura 3.28: inmunocromatografía para la detección de antígenos de Rotavirus y Adenovirus. Tandil. 2016-2017. **Izquierda:** test negativo. **Derecha:** test positivo para Rotavirus. Niños con diarrea. Tandil, 2016-2017. Fuente: elaboración propia.

3.2.3.6- Patógenos parasitarios

Trece niños con parásitos intestinales fueron detectados. Los protozoos fueron *Cryptosporidium* spp. (n=3), *Blastocystis* spp. (n=8) y *Giardia intestinalis* (n=2) (figura 3.29). No se detectaron niños infectados con nematodos ni platelmintos. La carga parasitaria no fue realizada debido a la ausencia de helmintos en los niños estudiados.

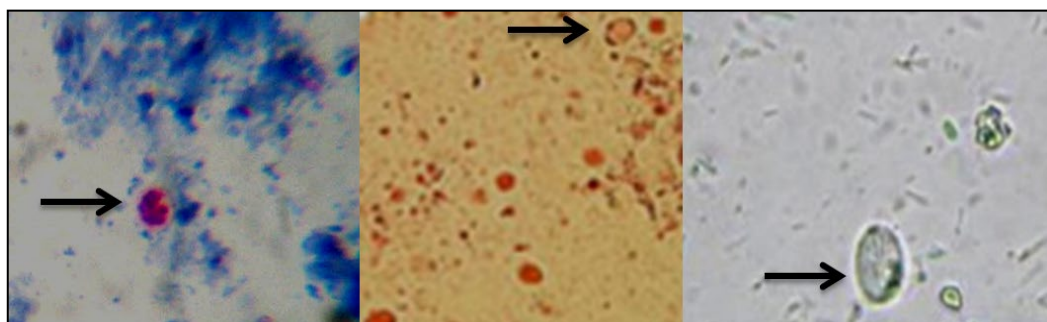


Figura 3.29: microfotografía de los protozoos *Cryptosporidium* spp., *Blastocystis* spp. y *G. intestinalis* hallados en los niños con diarrea. Tandil, 2016-2017. Fuente: elaboración propia.

3.3- Frecuencias de infección en niños con diarrea

3.3.1- Frecuencia de infección según agente etiológico de diarrea

Los patógenos intestinales detectados fueron *E. coli* diarraigénica (patotipos EPEC, EAEC, ETEC, STEC), *Shigella* (*S. flexneri*, *S. sonnei*), *S. enterica* (OMA y OMB), Rotavirus, *Cryptosporidium* spp., *Blastocystis* spp. y *G. intestinalis*. Las bacterias EPEC, EAEC y *Shigella* spp. representaron el 70% de los patógenos hallados en cuadros diarreicos.

En los niños con diarrea, la frecuencia de monoinfección entérica fue prevalente (86%), mientras que la coinfección fue hallada en menor proporción (14%). Las monoinfecciones bacterianas fueron producidas por *E. coli* diarraigénica, *Shigella* spp. y *S. enterica*; las de origen viral estuvieron causadas

por Rotavirus y las de origen parasitario se debieron a *Cryptosporidium* spp., *G. intestinalis* y *Blastocystis* spp. En los niños coinfectados, las combinaciones de patógenos estuvieron representadas por el binomio bacteria/bacteria (n=8), seguidas de las infecciones bacteria/parásito (n=5) y bacteria/virus (n=2) (tabla 3.9).

Agentes patógenos en heces	Frecuencia de infección		
	n	%	
EPEC	49	46,7	
<i>Shigella flexneri</i>	9	8,6	
<i>Salmonella enterica</i> OMA	5	4,8	
EAEC	5	4,8	
EPEC (lt)	4	3,8	
STEC	3	2,9	
<i>Shigella sonnei</i>	1	1,0	
EPEC (stp)	1	1,0	
Rotavirus	6	5,7	
<i>Blastocystis</i> spp.	4	3,8	
<i>Cryptosporidium</i> spp.	2	1,9	
<i>Giardia intestinalis</i>	2	1,9	
EPEC	EAEC	5	4,8
EPEC	<i>Blastocystis</i> spp.	4	3,7
EAEC	<i>Salmonella enterica</i> OMB	1	1,0
EPEC	EPEC (lt)	1	1,0
EPEC	Rotavirus	1	1,0
EAEC	Rotavirus	1	1,0
EPEC	<i>Cryptosporidium</i> spp.	1	1,0

El 82% de los niños presentó heces tipo diarreicas, sin embargo, no se observaron diferencias significativas con la duración temporal del cuadro ($p=0,240$). La presencia de leucocitos fecales se halló en 17% de los niños. No se observaron diferencias significativas con la presencia de patógenos entéricos ($p=0,978$) ni con la duración temporal del cuadro ($p=0,136$). La presencia de

hematíes fecales estuvo presente en 22% de los casos de diarrea y fue independiente del hallazgo de patógenos intestinales ($p=0,118$) y de la duración de la diarrea ($p=0,636$) (figuras 3.30 y 3.31).

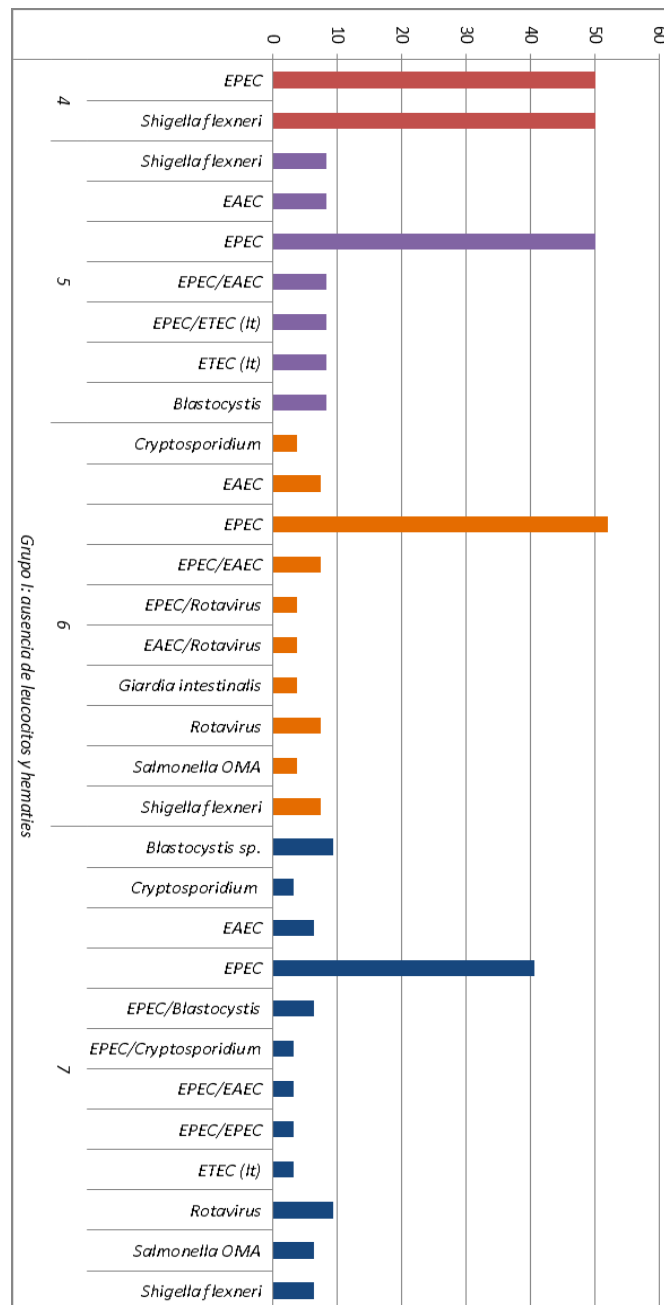


Figura 3.30: frecuencia relativa de patógenos entéricos en casos de diarrea infecciosa sin leucocitos ni hematíes (grupo I), según Escala de Bristol: heces formes (4), heces blandas con bordes definidos (5), heces pastosas con bordes irregulares (6), heces líquidas (7). Fuente: elaboración personal.

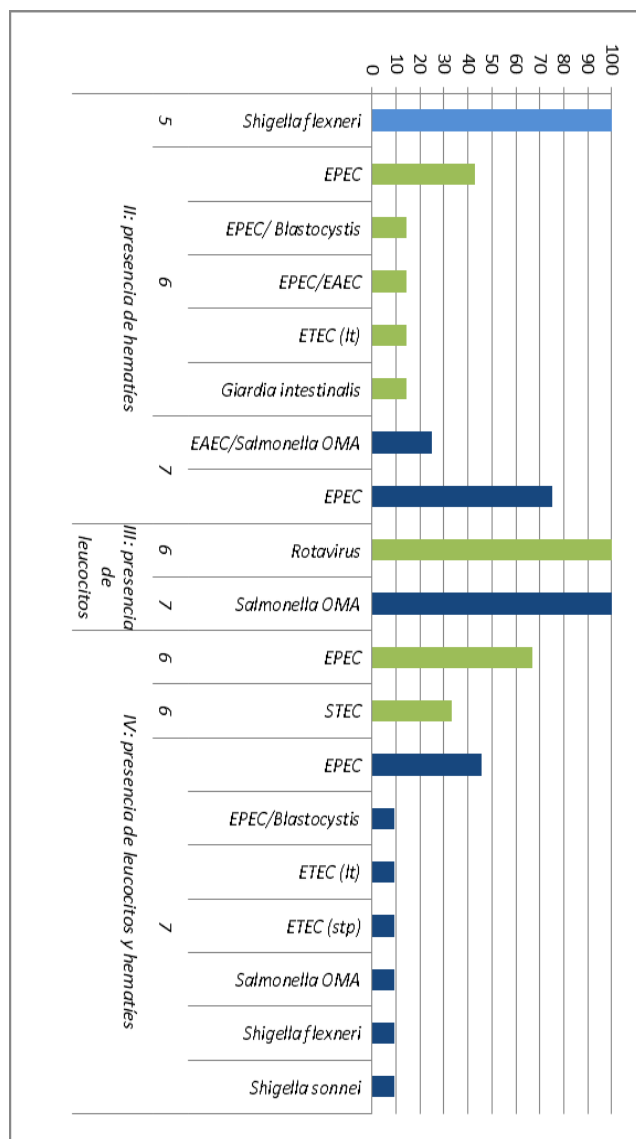


Figura 3.31: frecuencia de patógenos entéricos en casos de diarrea infecciosa según presencia o ausencia fecal de leucocitos y hemáties (grupos II, III y IV) y Escala de Bristol: heces formes (4), heces blandas con bordes definidos (5), heces pastosas con bordes irregulares (6), heces líquidas (7). Fuente: elaboración personal.

3.3.2- Frecuencia de infección según edad de los niños con diarrea

La presencia de patógenos intestinales fue observada en 105 niños con diarrea (*casos positivos*), valor que representa el 46% de población estudiada. En los niños infectados por un único patógeno (monoinfección, n=91), la etiología bacteriana fue prevalente (84,6%, n=77), mientras que las infecciones de etiología viral (6,6%, n=6) y parasitaria (8,8%, n=8) se hallaron en menor proporción.

En los niños infectados con dos patógenos (coinfeción, $n=14$), las combinaciones de patógenos estuvieron representadas por el binomio bacteria/bacteria (50%, $n=7$), seguidas de las infecciones bacteria/parásito (36%, $n=5$) y bacteria/virus (14%, $n=2$). Los niños con patógenos intestinales (casos positivos) fueron significativamente menores que los niños sin patógenos intestinales (casos negativos) ($p<0,01$) (figura 3.32, tablas 3.10 y 3.11).

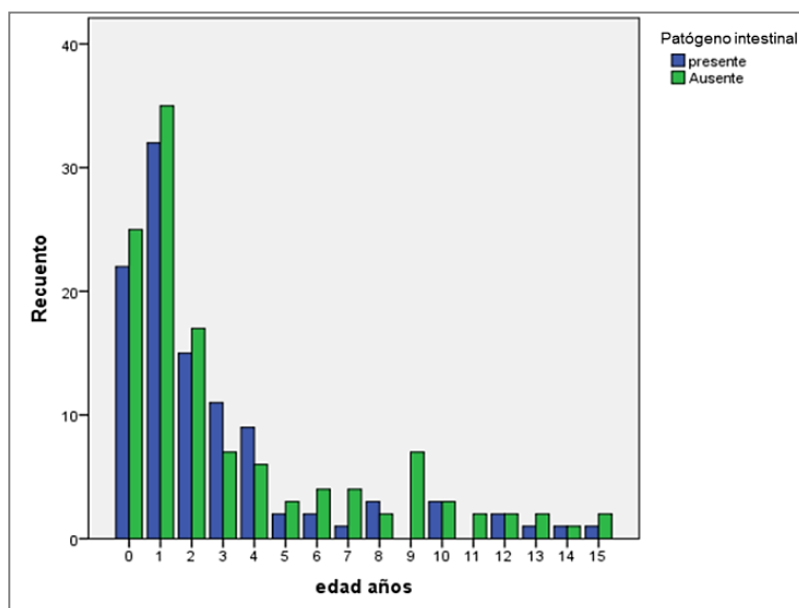


Figura 3.32: número de niños con diarrea según presencia o ausencia de patógenos intestinales y edad. Tandil, 2016-2017. Fuente: elaboración personal.

Tabla 3.10: datos demográficos, manifestaciones clínicas y hallazgos de laboratorio en niños con diarrea. Tandil. 2016-2017.

Parámetro	Casos Positivos (n=105)	Casos Negativos (n=122)	<i>P</i> valor
Sexo (Masculino:Femenino)	57:43	43:57	0,732
Edad (Media \pm SD)	2,7 \pm 3,3	3,3 \pm 3,9	<0,01
Internación (%)	67 (64%)	40 (33%)	0,591
Duración de la diarrea (Media \pm SD)	5,1 \pm 3,6	4,9 \pm 3,6	0,733
Duración de la diarrea > 6 días (%)	26 (25%)	27 (22 %)	0,641
Presencia de Vómitos (%)	42 (40%)	37 (45%)	0,631
Presencia de leucocitos fecales (%)	18 (17%)	20 (16%)	0,978

Grupo etario	Patógenos	Frecuencia de casos	
		n	%
Lactantes menores	EAEC	1	2,1
	EPEC	14	30,0
	ETEC (lt)	2	4,2
	<i>Shigella flexneri</i>	3	6,4
	EPEC-EAEC	2	4,2
	ND	25	53,1
	TOTAL	47	100,0
Lactantes mayores	<i>Blastocystis sp.</i>	1	1,5
	<i>Cryptosporidium sp.</i>	1	1,5
	EAEC	1	1,5
	EPEC	16	17,5
	EPEC- <i>Blastocystis sp.</i>	1	1,5
	EPEC-EAEC	3	4,5
	ETEC (lt)	1	1,5
	<i>Giardia intestinalis</i>	1	1,5
	Rotavirus	2	3,0
	<i>S. enterica</i> OMA	3	4,5
	<i>Shigella flexneri</i>	1	1,5
	STEC	1	1,5
	ND	35	58,5
	TOTAL	67	100,0
Preescolares	<i>Blastocystis sp.</i>	3	4,3
	EAEC	3	4,3
	EAEC- <i>S. enterica</i> OMB	1	1,4
	EPEC	12	17,1
	EPEC- <i>Blastocystis sp.</i>	3	4,3
	EPEC- <i>Cryptosporidium</i>	1	1,4
	EPEC-EPEC	1	1,4
	EPEC- ETEC (lt)	1	1,4
	EAEC- Rotavirus	1	1,4
	<i>Giardia intestinalis</i>	1	1,4
	Rotavirus	3	4,3
	<i>S. enterica</i> OMA	2	2,9
	<i>Shigella flexneri</i>	2	2,9
	<i>Shigella sonnei</i>	1	1,4
	STEC	2	2,9
	ND	33	47,2
TOTAL	70	100,0	
Escolares	EPEC	5	16,1
	ETEC (lt)	1	3,2
	ETEC (stp)	1	3,2
	<i>Shigella flexneri</i>	1	3,2
	Rotavirus	1	3,2
	ND	22	71,1
	TOTAL	31	100,0
Adolescentes	<i>Cryptosporidium sp.</i>	1	8,3
	EPEC	1	8,3
	<i>Shigella flexneri</i>	2	16,7
	EPEC- Rotavirus	1	8,3
	ND	7	58,4
	TOTAL	12	100,0

3.3.3- Frecuencia de infección según duración temporal de la diarrea

La frecuencia de infección intestinal en los niños con cuadros agudos, prolongados y persistentes fue 45%, 52% y 44% respectivamente (tabla 3.12, figuras 3.33, 3.34 y 3.35).

Tabla 3.12: Frecuencia de infección de niños con diarrea según etiología y duración temporal de la diarrea. Tandil. 2016-2017			
Presencia de patógenos en heces	Frecuencia de infección		
	n	%	
Diarrea aguda			
EPEC	37	45,1	
<i>Shigella flexneri</i>	7	8,5	
Rotavirus	5	6,1	
EAEC	4	4,9	
<i>Salmonella enterica</i> OMA	4	4,9	
<i>Blastocystis</i> spp.	3	3,7	
ETEC (lt)	3	3,7	
STEC (O157:H7)	2	2,4	
<i>Giardia intestinalis</i>	2	2,4	
<i>Cryptosporidium</i> spp.	2	2,4	
ETEC (stp)	1	1,2	
<i>Shigella sonnei</i>	1	1,2	
EPEC	EAEC	4	4,9
EAEC	<i>Salmonella enterica</i> OMB	1	1,2
EPEC	<i>Blastocystis</i> spp.	3	3,7
EPEC	ETEC (lt)	1	1,2
EAEC	Rotavirus	1	1,2
EPEC	Rotavirus	1	1,2
Diarrea prolongada			
EPEC		8	50,0
<i>Shigella flexneri</i>		2	12,5
STEC (O145:H28)		1	6,3
ETEC (lt)		1	6,3
<i>Salmonella enterica</i> OMA		1	6,3
Rotavirus		1	6,3
EPEC	<i>Cryptosporidium</i> spp.	1	6,3
EPEC	EAEC	1	6,3
Diarrea persistente			
EPEC		4	57,1
EAEC		1	14,3
<i>Blastocystis</i> spp.		1	14,3
EPEC	<i>Blastocystis</i> spp.	1	14,3

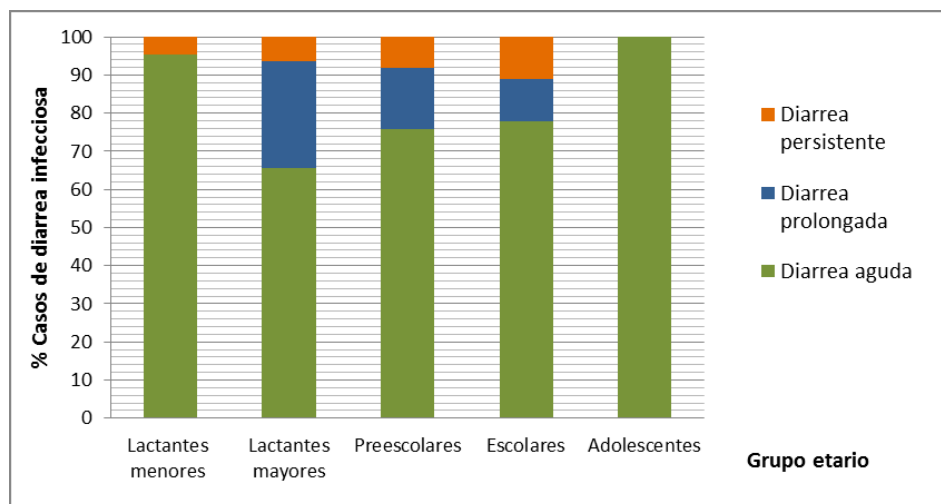


Figura 3.33: frecuencia de diarrea infecciosa según grupo etario y duración temporal de la diarrea. Niños con diarrea. Tandil, 2016-2017. Fuente: elaboración propia.

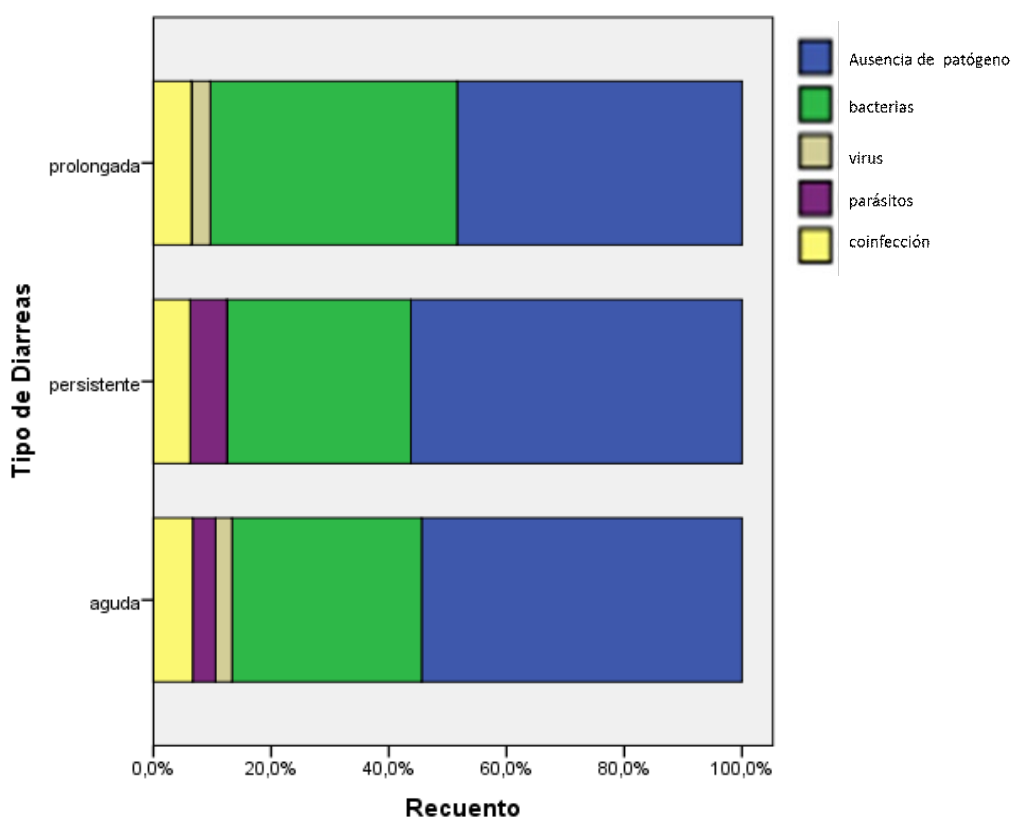
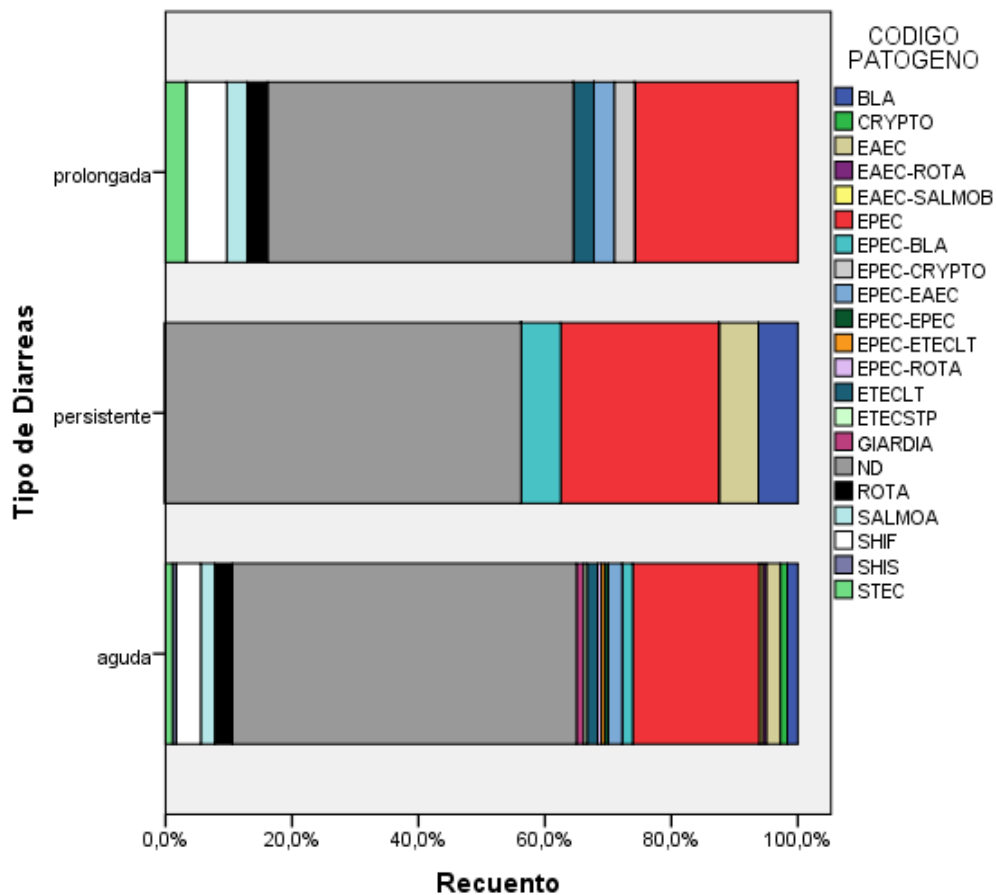


Figura 3.34: distribución de los casos de diarrea infecciosa según tipo de diarrea y agente etiológico. Niños con diarrea. Tandil, 2016-2017. Fuente: elaboración propia.



Código	Patógeno
BLA	<i>Blastocystis</i> sp.
CRYPTO	<i>Cryptosporidium</i> sp.
EAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa
EAEC-ROTA	<i>E. coli</i> enteroagregativa/ Rotavirus
EAEC-SALMOB	<i>E. coli</i> enteroagregativa/ <i>Salmonella enterica</i> OMB
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatógena
EPEC-BLA	<i>E. coli</i> enteropatógena/ <i>Blastocystis</i> sp.
EPEC-CRYPTO	<i>E. coli</i> enteropatógena/ <i>Cryptosporidium</i> sp.
EPEC-EAEC	<i>E. coli</i> enteropatógena/ <i>E. coli</i> enteroagregativa
EPEC-ETECLT	<i>E. coli</i> enteropatógena/ <i>E. coli</i> enterotoxigénica (toxina termolábil)
EPEC-ROTA	<i>E. coli</i> enteropatógena/ Rotavirus
ETECLT	<i>E. coli</i> enterotoxigénica (toxina termolábil)
ETECSTP	<i>E. coli</i> enterotoxigénica (toxina termoestable)
GIARDIA	<i>Giardia intestinalis</i>
ND	Ausencia de patógeno
ROTA	Rotavirus
SALMOA	<i>Salmonella enterica</i> OMA
SHIF	<i>Shigella flexneri</i>
SHIS	<i>Shigella sonnei</i>
STEC	<i>Escherichia coli</i> productora de Toxina shiga

Figura 3.35: distribución de patógenos entéricos según tipo de diarrea. Tandil, 2016-2017. Fuente: elaboración propia.

3.4-Aspectos espacio-temporales de las diarreas

3.4.1- Distribución geográfica de los niños con diarrea

Las viviendas de 223/227 (98,2%) niños con diarrea de Tandil pudieron ser geolocalizadas. Con el fin de conocer las características epidemiológicas de la población con diarrea, el espacio urbano fue categorizado en tres regiones: periférica, central y sur, en base a las dimensiones socioeconómica, habitacional y espacial de Tandil reportadas previamente por otros autores (Linares *et al.*, 2007, Lan 2011).

La región periférica (región A, figura 3.36) concentró alrededor del 50% de los casos de diarrea estudiados y estuvo conformada por un cinturón poblacional externo. Los barrios que conformaron este conglomerado urbano fueron La Movediza, Tropezón, Maggiori, San Juan, Villa Italia Norte, San Cayetano, Villa Aguirre, Palermo, Villa Gaucho, Las Tunitas y Villa Laza, Arco Iris, Villa Galicia, Villa Italia, barrio Cabildo, barrio Rodríguez, el área entre Av. Balbín y Ruta Nacional 226 y los barrios tangentes a dicha ruta.

La región central (región B, figura 3.36) presentó alrededor del 35% de los casos de diarrea y estuvo conformada por la zona urbana delimitada al norte de las cuatro avenidas y los radios que demarcan las dos avenidas Del Valle y Juan B. Justo.

Por último, la región sur (región C, figura 3.36) comprendió alrededor del 15% de los casos de diarrea y estuvo constituida por el centro comercial y financiero de la ciudad. Dicha zona se delimitó por las Avenidas Brasil y Avellaneda, hasta Villa del Parque y barrio Calvario.

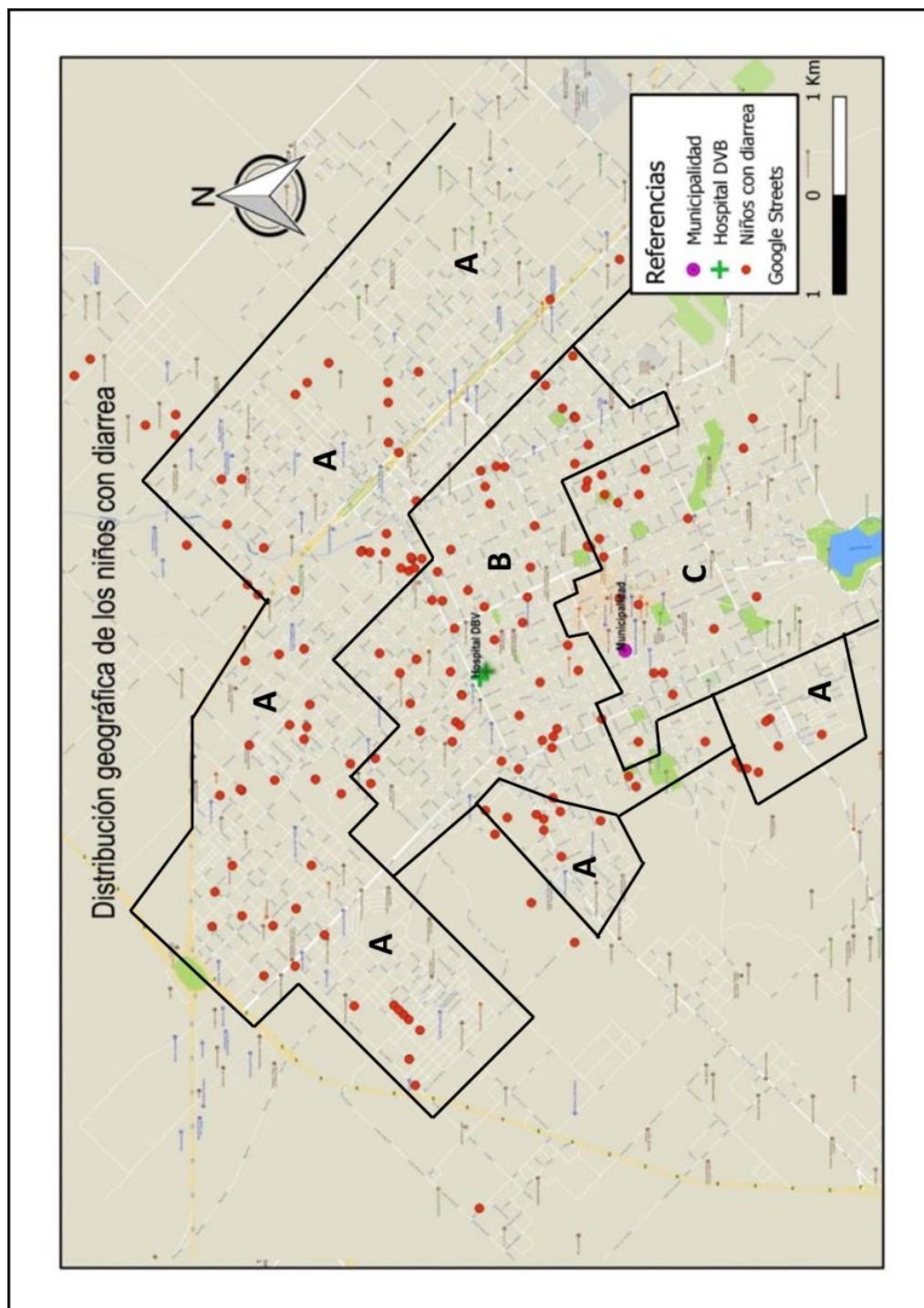


Figura 3.36: Distribución geográfica de las viviendas de los niños con diarrea estudiados en el período 2016-2017. Región A: región periférica. Región B: región central. Región C: región sur. Mapa de la ciudad de Tandil, Provincia de Buenos Aires. Fuente: elaboración propia.

3.4.2- Distribución geográfica de los niños con diarrea según el agente etiológico

Sobre un total de 227 niños con diarrea, 105 (46%) presentaron patógenos intestinales (diarrea infecciosa). Las viviendas de los niños tandilenses con diarrea infecciosa y no infecciosa se muestran en la figura 3.37.

Las áreas urbanas de la ciudad con mayor densidad de casos totales (*hotspots*) de diarrea se indican en la figura 3.38.

El principal agente etiológico detectado en los cuadros diarreicos fue *Escherichia coli* diarreigénica. Otros patógenos hallados en menor proporción fueron *Shigella* spp., *S. enterica*., Rotavirus, *G. intestinalis*, *Cryptosporidium* spp. y *Blastocystis* spp.

Las coinfecciones estuvieron representadas por dos patotipos DEC (n=7), DEC y *S. enterica* OMB (n=1), DEC y Rotavirus (n=2) y, por último, DEC y parásitos (n=5) (figuras 3.39 y 3.40). Las áreas urbanas de mayor densidad de niños con diarrea infecciosa se muestran en la figura 3.41.

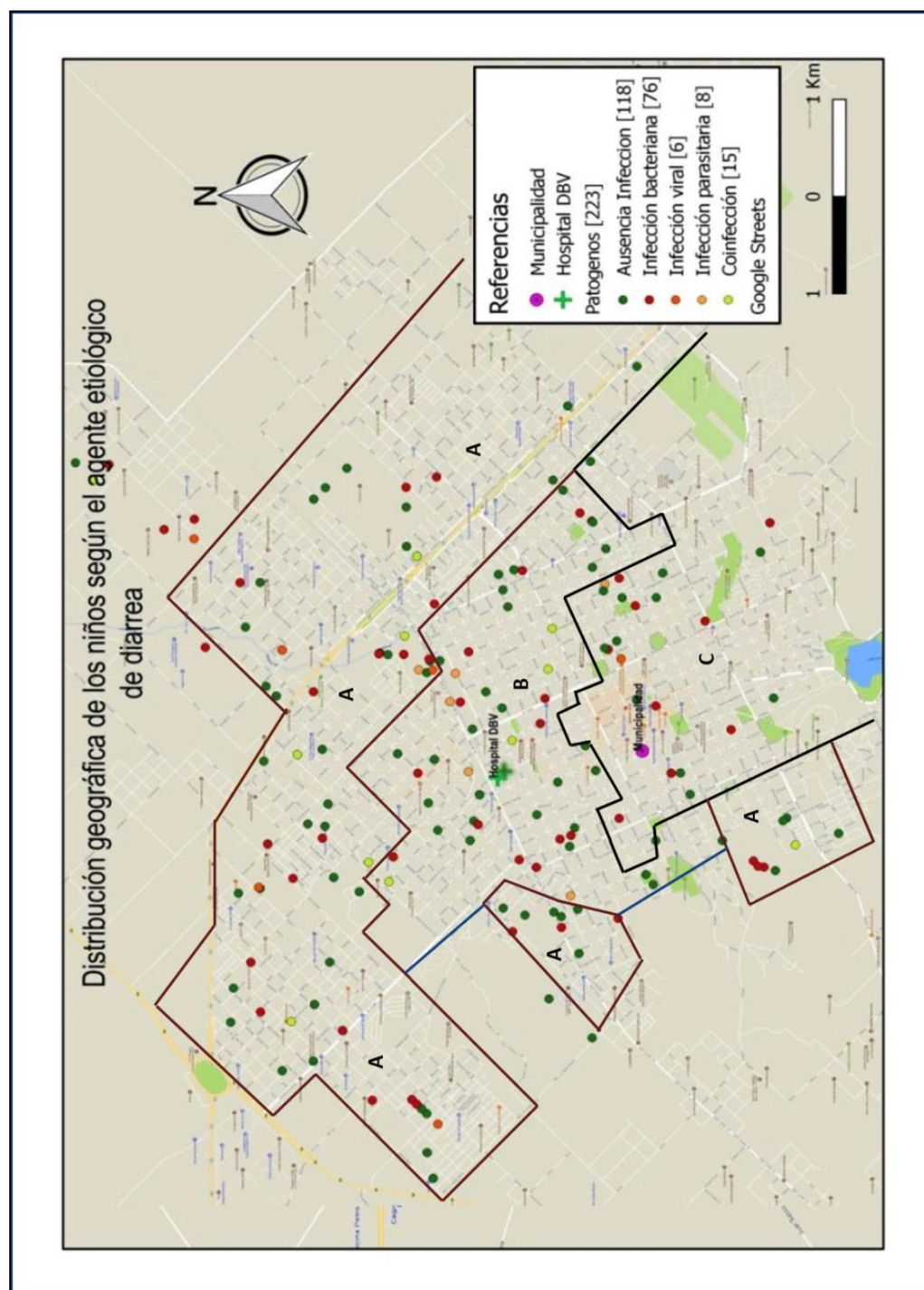


Figura 3.37: Distribución geográfica de las viviendas de los niños con diarrea según el agente etiológico. Mapa de la ciudad de Tandil, Provincia de Buenos Aires. Regiones A, B y C determinadas en base a las dimensiones socioeconómica, habitacional y espacial. Cada punto corresponde a un niño incluido en el estudio. Período 2016-2017. Fuente: elaboración propia.

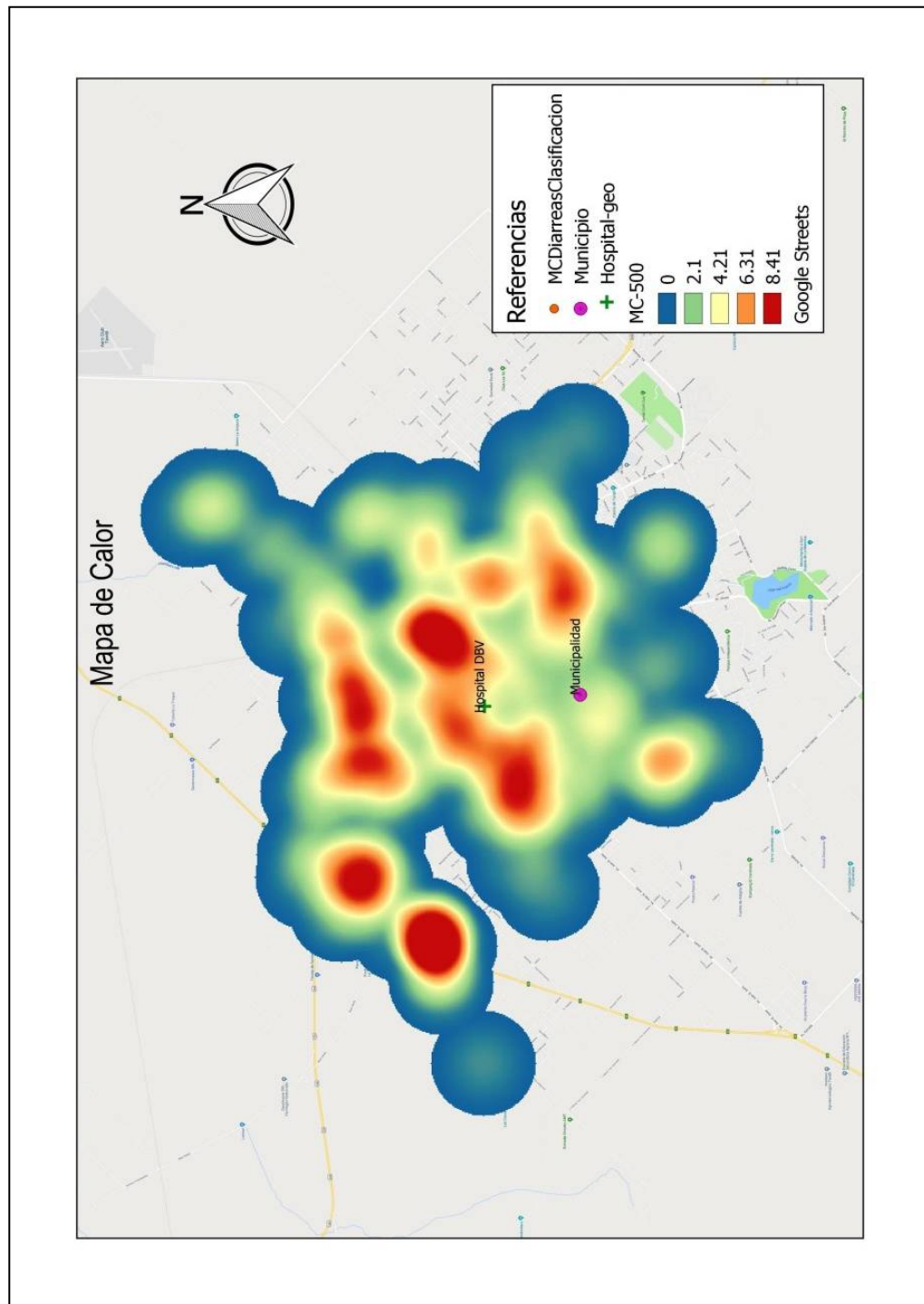


Figura 3.38: Mapa de calor (*hotspots*). Distribución geográfica de las viviendas de los niños con diarrea. Mapa de la ciudad de Tandil, Provincia de Buenos Aires. Período 2016-2017. Las áreas de color rojo representan la mayor densidad de casos. Fuente: elaboración propia.

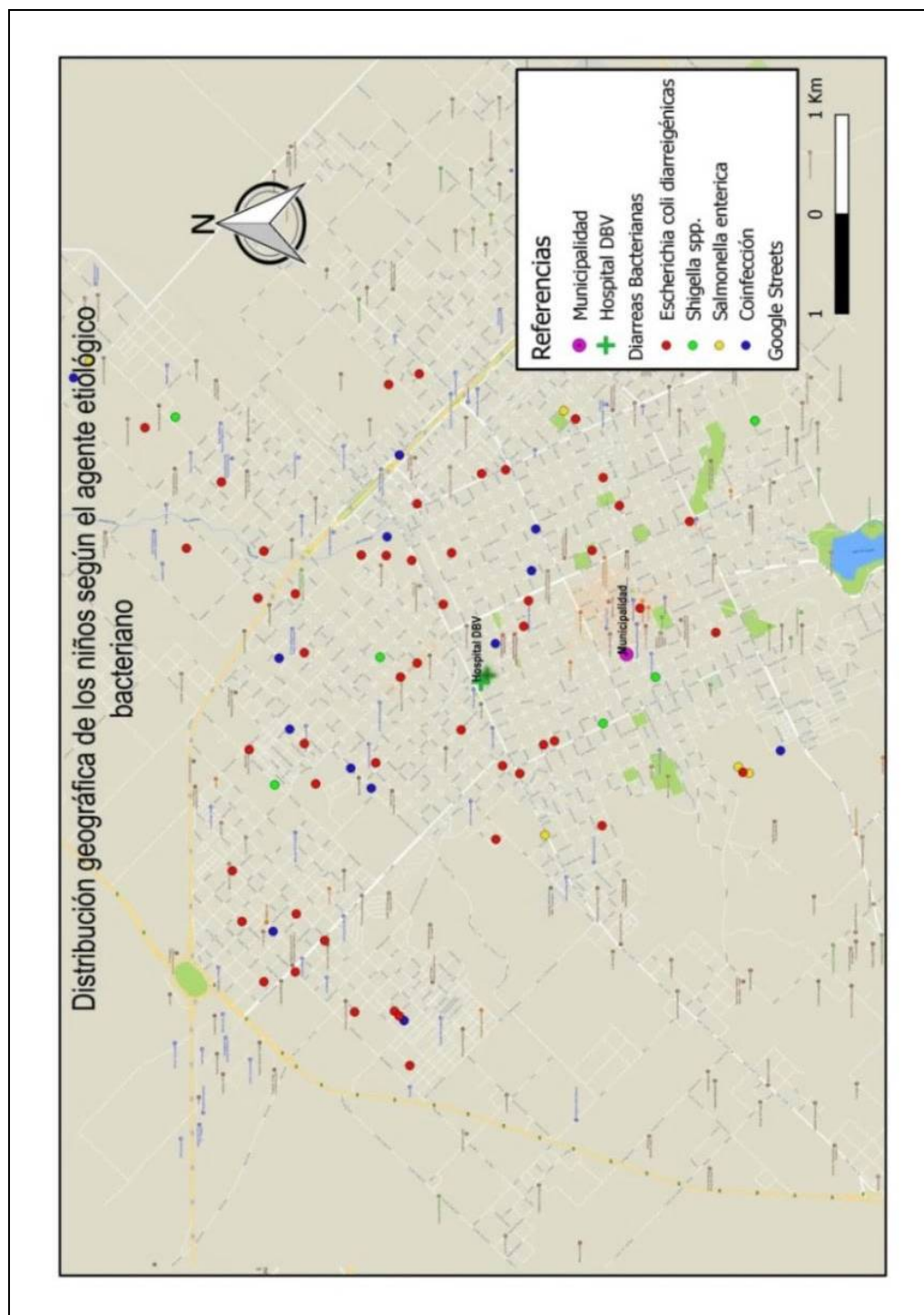


Figura 3.39: Distribución geográfica de las viviendas de los niños según el agente etiológico bacteriano de diarrea. Mapa de la ciudad de Tandil, Provincia de Buenos Aires. Cada punto corresponde a un niño incluido en el estudio. Período 2016-2017. Fuente: elaboración propia.

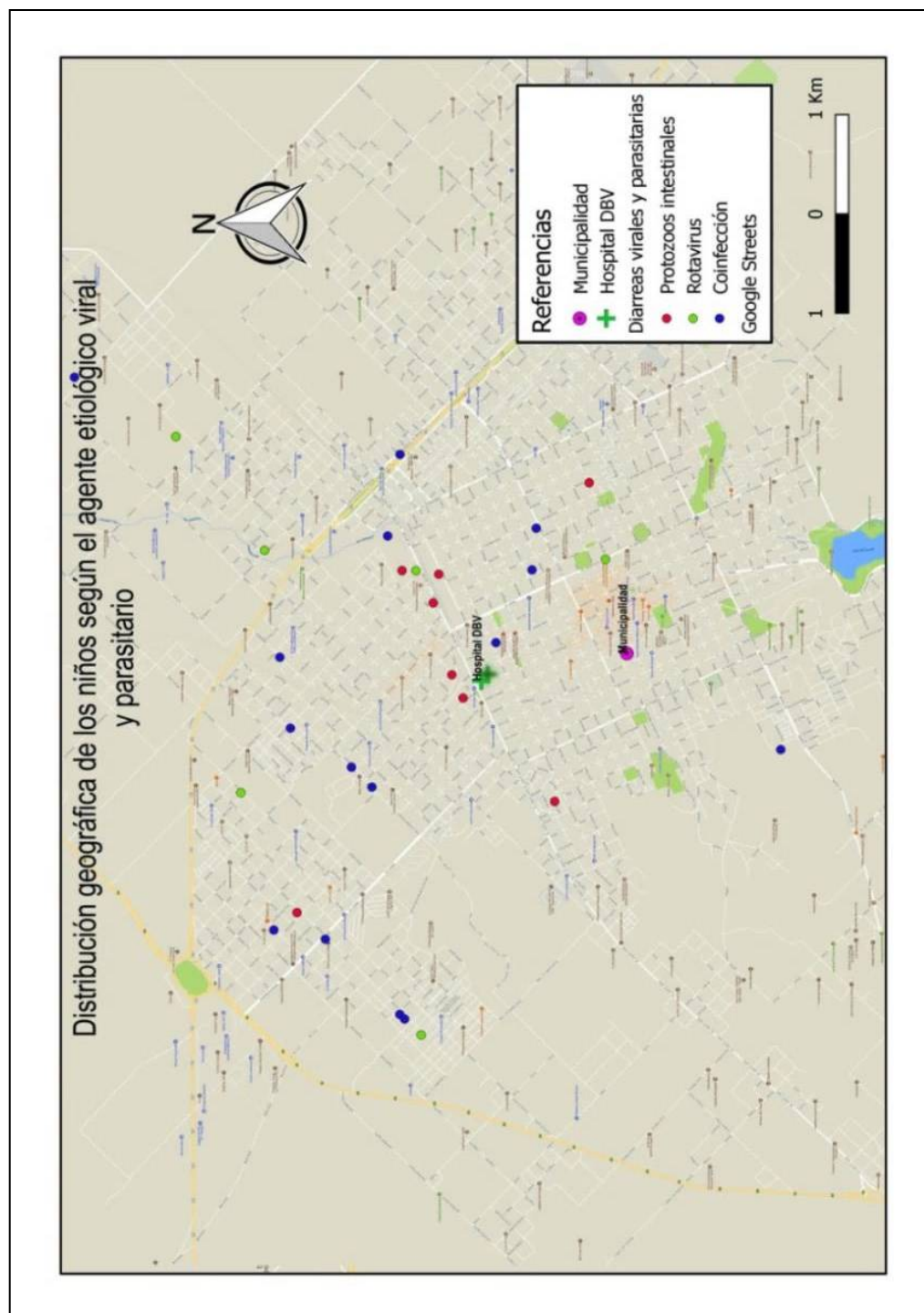


Figura 3.40: Distribución geográfica de las viviendas de los niños según el agente etiológico viral y parasitario de diarrea. Mapa de la ciudad de Tandil, Provincia de Buenos Aires. Cada punto corresponde a un niño incluido en el estudio. Período 2016-2017. Fuente: elaboración propia.

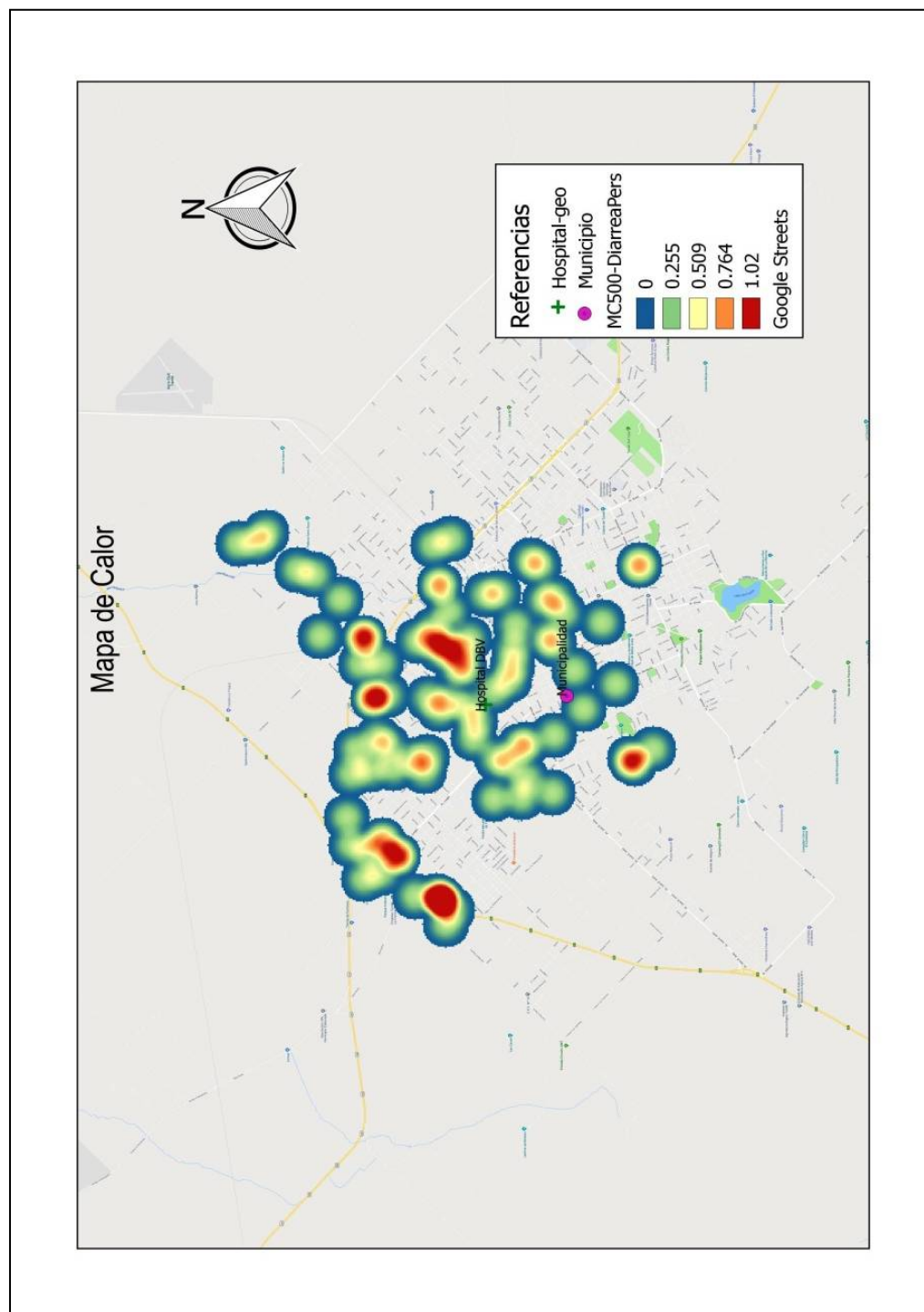


Figura 3.41: Mapa de calor (*hotspots*). Distribución geográfica de las viviendas de los niños con diarrea infecciosa (presencia de patógenos intestinales). Mapa de la ciudad de Tandil, Provincia de Buenos Aires. Las áreas de color rojo representan la mayor densidad de casos positivos de diarrea infecciosa. Período 2016-2017. Fuente: elaboración propia.

3.4.3- Estacionalidad de los agentes etiológicos de diarrea

3.4.3.1- Estacionalidad de la diarrea infecciosa según tipo de patógeno

Los patógenos intestinales fueron *E. coli* diarreigénica (EPEC, EAEC, ETEC, STEC), *Shigella* (*S. flexneri*, *S. sonnei*), *S. enterica*, Rotavirus, *Blastocystis* spp., *Cryptosporidium* spp. y *G. intestinalis*.

Las coinfecciones estuvieron representadas por el binomio bacteria/bacteria, bacteria/parásito y bacteria/virus. Las diarreas de origen bacteriano fueron prevalentes en todas las estaciones del año (figura 3.42).

La presencia de patógenos en las heces de los niños con diarrea mostró variaciones estacionales en el período estudiado (tabla 3.13)

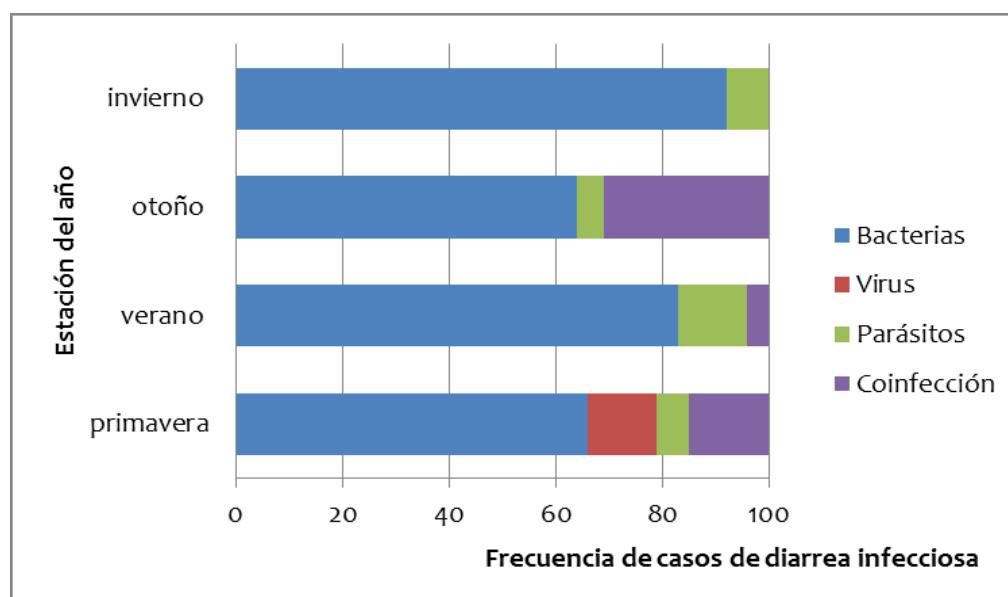


Figura 3.42: frecuencia de casos de diarrea infecciosa según tipo de patógeno y estación del año. Tandil, 2016-2017. Fuente: elaboración propia.

Tabla 3.13: Presencia de patógenos intestinales en niños con diarrea según estación del año. Tandil, 2016-2017				
Patógenos intestinales	Estación del año			
	Primavera	Verano	Otoño	Invierno
Monoinfecciones				
EPEC				
ETEC (lt)				
<i>S. flexneri</i>				
<i>Blastocystis</i> spp.				
EAEC				
<i>G. intestinalis</i>				
Rotavirus				
<i>S. enterica</i> OMA				
<i>Cryptosporidium</i> spp.				
<i>S. sonnei</i>				
STEC				
EPEC (stp)				
Coinfecciones				
EPEC- <i>Blastocystis</i> spp.				
EPEC-Rotavirus				
EAEC-Rotavirus				
EPEC- <i>S. enterica</i> OMB				
EPEC-EAEC				
EPEC-EPEC (lt)				
EPEC- <i>Cryptosporidium</i> spp.				
	<i>Ausencia del patógeno en niños con diarrea</i>			
	<i>Presencia del patógeno en niños con diarrea</i>			

3.4.3.2- Distribución geográfica y estacional de los niños con diarrea según agente etiológico.

3.4.3.2.1-Período: primavera-verano

Los patógenos entéricos hallados en el semestre primavera-verano fueron *S. flexneri*, *S. sonnei*, *S. enterica* OMA, EPEC, ETEC-lt, EAEC, STEC, Rotavirus, *G. intestinalis*, *Cryptosporidium* spp. y *Blastocystis* spp. Las coinfecciones estuvieron representadas por EPEC/*S. enterica*, EPEC/*Blastocystis* spp. y EPEC/Rotavirus o EAEC/Rotavirus (figura 3.43)

3.4.3.2.2-Período: otoño-invierno

Los patógenos entéricos hallados en el semestre otoño-invierno fueron *S. flexneri*, *S. enterica*, EPEC, ETEC-lt, ETEC-stp, EAEC, *G. intestinalis*, y *Cryptosporidium* spp. Las coinfecciones estuvieron representadas por EPEC/EPEC-lt y EAEC/*Cryptosporidium* spp. (figura 3.44)

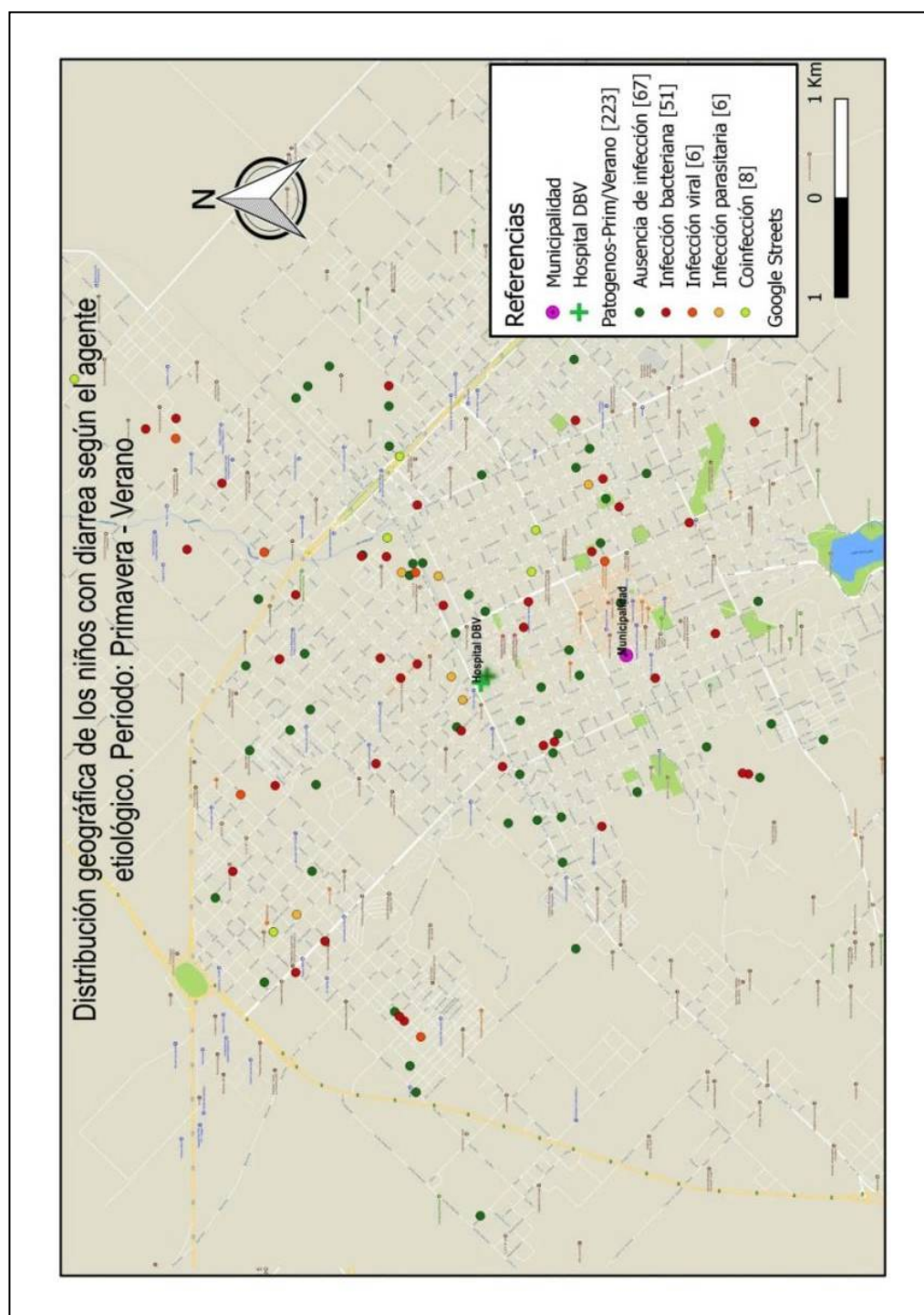


Figura 3.43: Distribución geográfica de los niños según el agente etiológico de diarrea durante el período primavera-verano. (2016-2017). Mapa de la ciudad de Tandil, Provincia de Buenos Aires. Cada punto corresponde a un niño incluido en el estudio. Fuente: elaboración propia.

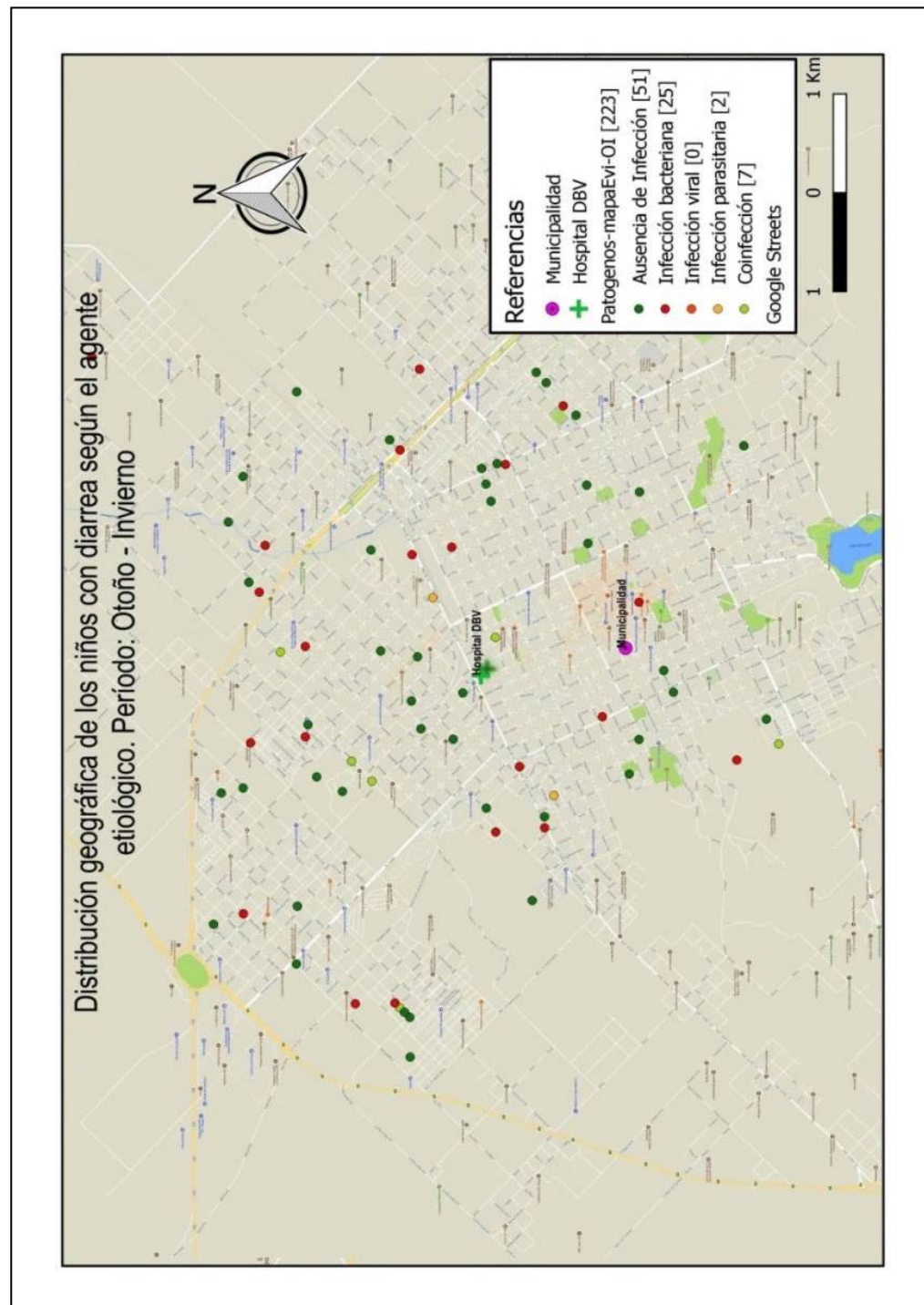


Figura 3.44: Distribución geográfica de los niños según el agente etiológico de diarrea durante el período otoño-invierno. (2016-2017). Mapa de la ciudad de Tandil, Provincia de Buenos Aires. Cada punto corresponde a un niño incluido en el estudio. Fuente: elaboración propia.

3.5- Diarrea persistente

3.5.1- Perfil epidemiológico de la población con diarrea persistente

Los niños con cuadros de diarrea persistente (DPE) representaron el 7% de todos los casos de diarrea estudiados en el período. La edad promedio fue 3,4 años, con valores comprendidos entre 1 mes y 15 años (figura 3.45).

La población infantil menor de 5 años representó el 81,3% de los casos totales de DPE estudiados en el período. La contribución porcentual de cada grupo etario al total de los casos de DPE fue la siguiente: lactantes (n=7; 44%), preescolares (n=6; 38%), escolares (n=1; 6%) y adolescentes (n=2; 12%).

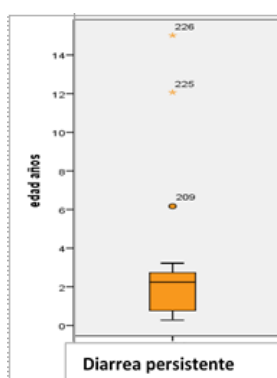


Figura 3.45: Diagrama de cajas y bigotes (*box-plot*) sobre la distribución de edades de los niños con diarrea persistente. Tandil, 2016-2017. Fuente: elaboración propia.

La frecuencia de infección entérica en niños con DPE fue 43,8% (7/16). Las monoinfecciones fueron prevalentes (86%) y los agentes etiológicos hallados fueron EPEC, EAEC y *Blastocystis* spp. (tabla 3.14).

Patógenos entéricos	Frecuencia	
	n	%
EPEC	4	57,1
EAEC	1	14,3
<i>Blastocystis</i> spp.	1	14,3
EPEC- <i>Blastocystis</i> spp.	1	14,3
TOTAL	7	100

La atención médica por guardia (emergencias) fue la modalidad más utilizada en la población con diarrea y alcanzó el 70% de todas las consultas por dicho cuadro (Figura 3.46). La internación hospitalaria representó el 34% de los niños con diarrea atendidos en el período. Las frecuencias de hospitalización fueron 37%, 19% y 31% para los cuadros agudos, prolongados y persistentes, respectivamente.

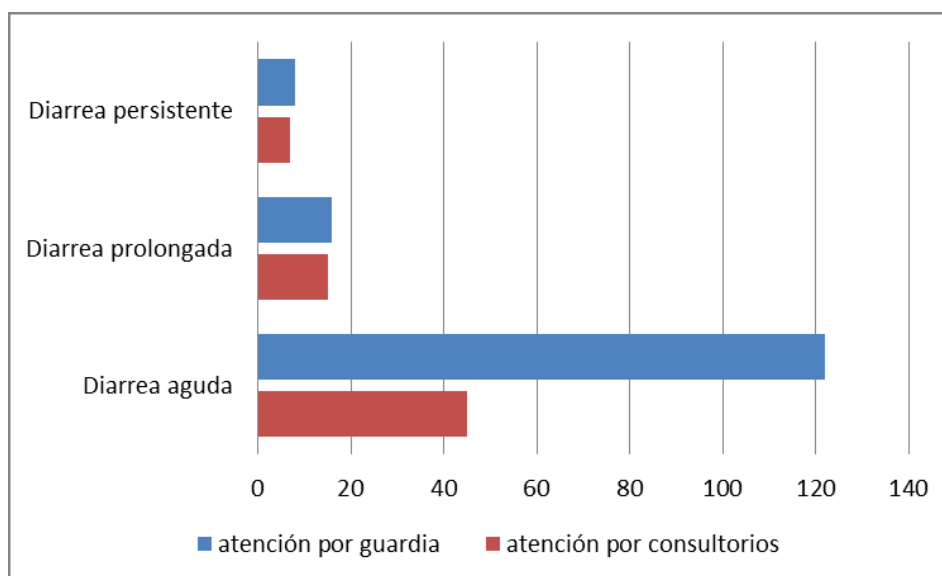


Figura 3.46: modalidad de atención médica pediátrica según duración temporal de la diarrea. Tandil, 2016-2017. Fuente: elaboración propia.

3.5.2- Distribución geográfica de los niños con diarrea persistente

La distribución geográfica de las viviendas de los niños con DPE mostró un patrón aleatorio, con mayor presencia de casos en la región periférica de la ciudad de Tandil (figura 3.47).

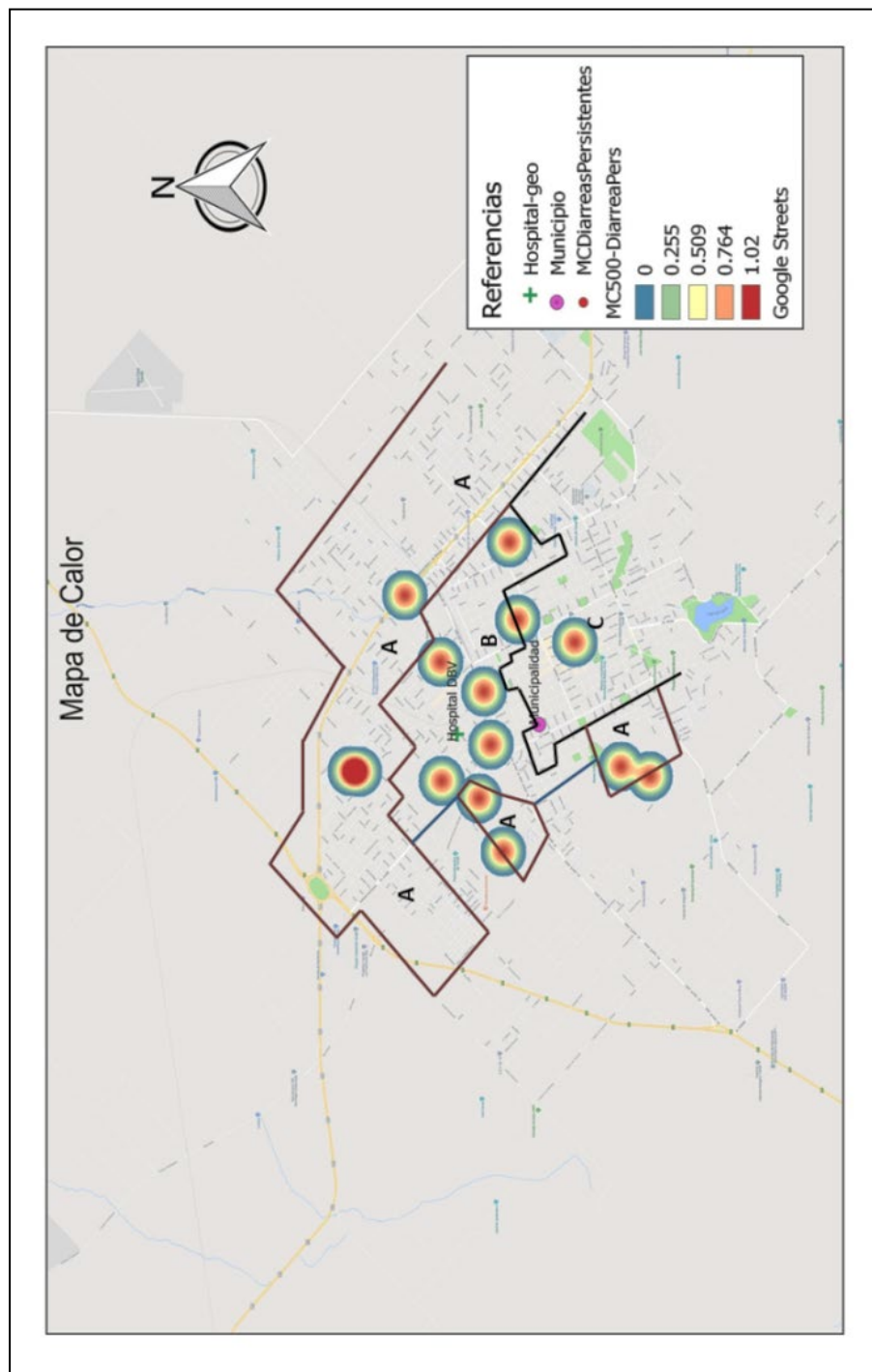


Figura 3.47: Mapa de calor (*hotspots*). Distribución geográfica de las viviendas de los niños con diarrea persistente. Período 2016-2017. Mapa de la ciudad de Tandil, Provincia de Buenos Aires. Regiones A, B y C determinadas en base a las dimensiones socioeconómica, habitacional y espacial. Las áreas de color rojo representan la mayor densidad de casos. Fuente: elaboración propia.

3.5.3- Estacionalidad de los cuadros de diarrea persistente

La distribución estacional de los niños con cuadros persistentes de diarrea fue variable en el período de estudio y mostró un incremento en dos meses diciembre y enero (figura 3.48).

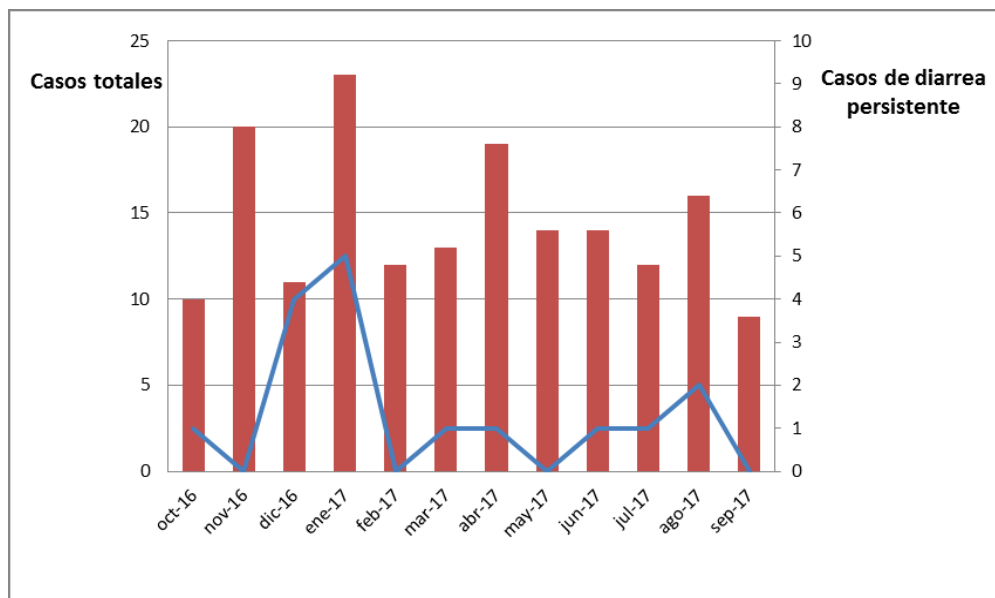


Figura 3.48: número de casos totales de diarrea (barras rojas) y de diarrea persistente (línea azul) según mes del año. Tandil, 2016-2017. Fuente: elaboración propia.

4. Discusión

Los estudios realizados en el marco de la presente tesis doctoral tuvieron la finalidad de caracterizar la diarrea persistente de tipo infeccioso en la población infantil que concurre al Hospital de Niños Debilio Blanco Villegas de Tandil durante el período 2016-2017.

El grupo de estudio quedó conformado por niños menores de 15 años con cuadros diarreicos que se atendieron en el Hospital Debilio Blanco Villegas de Tandil. La población menor de 5 años representó más del 80% de los casos estudiados. Al respecto, diversos autores han señalado la escasa presencia de publicaciones con información etiológica de diarreas en el grupo etario entre 5 y 15 años (Lamberti *et al.*, 2012; Levine *et al.*, 2012). En esta investigación se destaca la inclusión de niños escolares y adolescentes con el fin de aportar información clínica y epidemiológica sobre cuadros diarreicos en niños de mayor edad, constituyendo una línea de base para estudios futuros sobre el tema.

Los cuadros diarreicos pueden clasificarse en agudos, prolongados y persistentes según su duración temporal (Shane *et al.*, 2017). En esta investigación, la mayor frecuencia de casos estuvo representada por la diarrea aguda (DAG), mientras que las otras categorías se observaron en menor proporción. En particular, los cuadros agudos representaron el 79% de los casos. Esta frecuencia fue cercana a la reportada por Moore *et al.* (2010) que observaron cuadros agudos en 83% de los niños residentes en un asentamiento urbano. Además, valores similares de este tipo de diarrea (72-94%) han sido reportados por autores de diversos países de Asia, África y Latinoamérica (Bhutta 2006; Lima *et al.*, 2000; Mitike *et al.*, 2001; Kermani *et al.*, 2010; Rahman *et al.*, 2014; Islam *et al.*, 2018; González Corona *et al.*, 2017; Schilling *et al.*, 2017).

La diarrea prolongada (DPO) ocupó el segundo lugar en orden de frecuencia, alcanzando un valor de 14 % en los niños estudiados. El primer reporte sobre DPO como entidad clínica independiente fue realizado en Brasil, cuyos

autores reportaron 12% de DPO en la población infantil (Moore *et al.*, 2010). Estudios posteriores en países en desarrollo reportaron la prolongación de los síntomas gastrointestinales hasta en 15% de los casos de diarrea (Lamberti *et al.*, 2012). Sin embargo, otros autores han indicado valores superiores a 20% de DPO. Un relevamiento sobre cuadros prolongados en niños israelíes menores de dos años halló valores cercanos a 25%. De modo similar, dos estudios realizados en India y Kenia reportaron los valores de DPO más elevados, con frecuencias de 43% y 55% de los casos (Bhan *et al.*, 1989; Fraser *et al.*, 1998; Schilling 2010).

La diarrea persistente (DPE) ha sido definida como el cuadro diarreico que perdura más de dos semanas. En este estudio, la frecuencia de DPE fue observada en el 7% de los niños con diarrea. Los resultados obtenidos están en línea con diversos autores que indicaron que la persistencia de los síntomas puede observarse entre 3% y 20% de los casos (Andrade *et al.*, 2000; Moore *et al.*, 2011). De modo similar, en siete estudios realizados en niños de Bangladesh, Brasil, Perú, India, Kenia, Etiopía y Zimbawe se reportaron valores cercanos a 10% de cuadros persistentes en pediatría (Ketema *et al.*, 1997; Lima *et al.*, 2000; Bhutta 2006; Moore *et al.*, 2010; Schilling 2010; Islam *et al.*, 2018). Frecuencias más elevadas de DPE, entre 18% y 28% de los casos, fueron halladas por investigadores de Israel y de Brasil (Fraser *et al.*, 1998; Fagundes-Neto *et al.*, 2000; Moore *et al.*, 2011; Lamberti *et al.*, 2012).

Los lactantes conformaron el grupo etario más afectado por cuadros de diarrea. La bibliografía citada señala que la mayoría de los episodios de diarrea ocurren durante los primeros dos años de vida (Bhan *et al.*, 1989; Han *et al.*, 1995; Ketema *et al.*, 1997; Lima *et al.*, 2000; Koletzko *et al.*, 2009; Moore *et al.*, 2010; Nelson 2013; Mandell 2014; Vithayasai *et al.*, 2014; Gupta *et al.*, 2015; Giannattasio *et al.*, 2016; Gonzalez-Corona *et al.*, 2017; Schilling *et al.*, 2017; Mahfuz *et al.*, 2017; Hebbelstrup Jensen *et al.*, 2017). En esta investigación se observó la ausencia de cuadros prolongados de diarrea (DPO) en lactantes menores. Este hallazgo podría deberse a varios factores. En principio, una amplia revisión sistemática indicó que las consultas médicas en los cuadros de diarrea oscilan alrededor de 35%

(Lamberti *et al.*, 2012). Un estudio realizado por Singhi *et al.* (2004) informó que la mayor proporción de consultas por diarrea en centros de salud de India fue asociada al género masculino. Sumado a ello, Page *et al.* (2011) recolectaron información de salud mediante entrevistas, hallando frecuencias entre 14% y 70% de búsqueda de atención médica para el niño con diarrea, indicando que la distancia a recorrer y el costo económico fueron aspectos limitantes al momento de decidir el traslado del niño al centro asistencial. De modo similar, Adane *et al.* (2017) reportaron que la búsqueda de asistencia médica fue observada en 57% de los padres de niños con diarrea, recurriendo mayormente a medicamentos adquiridos en farmacias. Además, otro estudio sobre diarrea infantil realizado en Bangladesh señaló que solamente 22% de los padres realizó una visita al hospital para el tratamiento del cuadro, asegurando que las principales causas de la baja frecuencia de atención fueron la percepción materna de enfermedad leve y el costo elevado de la medicación (Das *et al.*, 2013).

Los niños con DPO y DPE atendidos en el hospital de Tandil representaron el 21% de todos los casos estudiados, sin embargo, contribuyeron con el 45% de los días totales con diarrea (DTD). Estos resultados fueron coincidentes con otros autores que reportaron que los niños con cuadros prolongados y persistentes representaron entre 34% a 50% de los DTD (Schorling *et al.*, 1990; Han *et al.*, 1995; Lima *et al.*, 2000; Bhutta 2006; Moore *et al.*, 2010; Fagundes-Neto *et al.*, 2013).

Las infecciones gastrointestinales engloban una amplia variedad de complejos sintomáticos y de agentes infecciosos (Mandell 2014). En los niños estudiados, la presencia de vómitos fue detectada en cuatro de cada diez casos de diarrea. En la bibliografía, los datos obtenidos reflejan que la frecuencia de emesis en los cuadros diarreicos es variable. En un estudio de cohorte, realizado por Bhan *et al.* (1989) en niños con diarrea de India se encontró que los vómitos estuvieron presentes en alrededor de 10% de los casos. Valores más elevados fueron reportados por otros investigadores. Dutta *et al.* (2013) estudiaron las diarreas de etiología bacteriana, hallando frecuencias de vómitos entre 50% y 84%. Chung *et al.* (2017) reportaron la emesis en 35% a 76% de los niños con

diarrea aguda. Asimismo, una revisión sobre casos de diarrea atendidos en hospitales y centros de salud reportó la presencia de este síntoma hasta el 58% de los niños enfermedades diarreicas (Lamberti *et al.*, 2012).

La deshidratación fue registrada en 15% de los niños estudiados. Los trabajos difieren ampliamente en la frecuencia de este signo clínico en la población con diarrea. Al respecto, seis estudios basados en consultas hospitalarias de niños con diarrea registraron la deshidratación entre 1% y 56% de los casos (Youssef *et al.*, 2000; Alam *et al.*, 2001; Anvikar *et al.*, 2008; De *et al.*, 2016; Chung *et al.*, 2017; Islam *et al.*, 2018). Asimismo, una extensa revisión sistemática sobre diarreas en población de países en desarrollo, observando valores entre 7% y 81% de los casos (Lamberti *et al.*, 2012). En resumen, diversos estudios han señalado que la frecuencia de deshidratación en cuadros diarreicos presentó una gran amplitud de valores y estuvo relacionada con el tipo de agente etiológico, la edad del niño, la estacionalidad, los vómitos incoercibles o la capacidad de recuperar las pérdidas de líquido, entre otros (MSAL 2012; Brandt *et al.*, 2015; Shane *et al.*, 2017).

Los niños con heces de consistencia diarreica representaron la mayor proporción de casos y uno de cada cuatro niños presentó leucocitos y hematíes fecales. El análisis estadístico de las variables macroscópicas y microscópicas analizadas no mostró asociaciones significativas con la presencia de patógenos ni con la duración temporal del cuadro diarreico. La forma y consistencia de las heces en un cuadro diarreico puede ser altamente variable, sin embargo, la mayoría de los estudios sobre el tema ha reportado una frecuencia elevada de heces diarreicas, tanto pastosas como líquidas. Al respecto, dos estudios prospectivos realizados en niños con diarrea de Cuba y Jordania indicaron la presencia de heces acuosas con frecuencias de mayores a 80% (Youssef *et al.*, 2000; González Corona *et al.*, 2002). Valores similares de heces diarreicas (80%-85%) fueron reportados por el Estudio Entérico Multicéntrico Global (GEMS) (Levine *et al.*, 2012).

La detección de leucocitos y hematíes fecales es una práctica clínica de rutina, utilizada para determinar si un episodio de diarrea bacteriana es invasivo (Mel 2000). Diversos estudios han revisado la validez de esta premisa. Por ejemplo, dos estudios sobre el tema determinaron que la sensibilidad de dicha prueba fue baja y que el resultado del estudio fue inversamente proporcional al tiempo de demora en el procesamiento de las heces (Mel 2000; Carreazo *et al.*, 2011). De modo similar, otro estudio prospectivo sobre la utilidad de la sangre oculta en heces como parámetro de infección inflamatoria, determinó que dicha prueba presenta una modesta sensibilidad y especificidad para detectar infecciones gastrointestinales invasivas (Khan *et al.*, 2006).

Los resultados hallados en esta tesis están en concordancia con lo reportado por las guías clínicas internacionales y demostraron el pobre valor de la búsqueda de leucocitos y hematíes fecales para determinar la naturaleza invasiva de la diarrea.

La presencia de enteropatógenos fue observada en 46% de los niños estudiados. Diversos autores han comunicado frecuencias de casos positivos entre 20% y 75% de los niños con diarrea, señalando que la recuperación de patógenos podría variar con tipo de agente etiológico investigado, los factores de virulencia del patógeno, el método de detección, la época del año o la región geográfica (Klein *et al.*, 2006; Moore *et al.*, 2010; Huruy *et al.*, 2011; Fletcher *et al.*, 2013a; Laham *et al.*, 2015; Tian *et al.*, 2016; Hebbelstrup-Jensen *et al.*, 2017; González-Corona *et al.*, 2017; Chung *et al.*, 2017; Hawash *et al.*, 2017). El porcentaje de positividad hallado en esta investigación se encuadra dentro de los valores reportados en otros estudios, sin embargo, por motivos metodológicos no se incluyó el estudio de *Campylobacter* spp., un patógeno microaerófilico de mayor complejidad diagnóstica.

La frecuencia de casos positivos y la edad del caso estuvieron asociados estadísticamente, señalando una mayor frecuencia de infección entérica a menor edad. La edad del niño es un factor relevante en la infección entérica. Ejemplos de dicha observación fueron reportados por varios autores. Shrivastava *et al.* (2017) analizaron las heces de niños con diarrea en búsqueda de patógenos

bacterianos, virales y parasitarios, hallando una mayor frecuencia de infección entérica en lactantes que en preescolares. De modo similar, dos grupos de investigadores de India y Taiwán comunicaron la mayor tasa de patógenos entéricos en niños de menor edad (Dutta *et al.*, 2013; Chung *et al.*, 2017).

Los agentes etiológicos bacterianos fueron prevalentes en los niños de todos los grupos etarios, independientemente de la duración del cuadro diarreico. Los patógenos bacterianos han sido frecuentemente detectados en niños de regiones en desarrollo (Fletcher *et al.*, 2013a). El perfil etiológico de las gastroenteritis depende de diversos factores como la población estudiada, la cobertura vacunal, el estado inmunológico y nutricional, la región geográfica o la estacionalidad (Dutta *et al.*, 2013; Fletcher *et al.*, 2013a; Giannattasio *et al.*, 2016; Chung *et al.*, 2017). Al respecto, el predominio de etiología bacteriana en casos de diarrea fue reportado en diversos relevamientos. Una extensa revisión sistemática publicada en 2009 por Abba *et al.* señaló que las bacterias fueron prevalentes en casos de diarrea de Latinoamérica y el Sudeste asiático. De modo similar el predominio bacteriano en cuadros diarreicos fue comunicado en diversos estudios recientes (Tian *et al.*, 2016; Gonzalez Corona *et al.*, 2017; Islam *et al.*, 2018). Sumado a ello, un trabajo temprano realizado en comunidades de India informó que los patógenos bacterianos fueron los agentes etiológicos más detectados en niños con diarrea (Bhan *et al.*, 1989). Si bien, este estudio presenta cierta antigüedad, resultados similares fueron reportados en un trabajo reciente sobre la etiología de la diarrea en dicho país (Shrivastava *et al.*, 2017).

El cultivo de las heces se utiliza en la práctica clínica para la detección de patógenos bacterianos. En esta investigación, el porcentaje de positividad del coprocultivo alcanzó 33% de los niños con diarrea. Valores inferiores de positividad fueron observados en Canadá, Estados Unidos y Noruega, mientras que porcentajes más elevados se reportaron en Grecia, Taiwán, México y Kenia (Afset *et al.*, 2003; Klein *et al.*, 2006; Slinger *et al.*, 2017; Schilling *et al.*, 2017). En países de Latinoamérica como Cuba, Perú y Venezuela, la frecuencia de detección de patógenos mediante coprocultivo varió entre 33% y 65% (Flores-Abuxapqui

et al., 1994; González Corona *et al.*, 2002; Carreazo *et al.*, 2011; Michelli *et al.*, 2016). En Argentina, los reportes oficiales del Ministerio de Salud indicaron un porcentaje de positividad del cultivo entre 10% y 25% (MSAL 2012). Sin embargo, el rendimiento del estudio mostró resultados variables según la provincia, con valores entre 8% y 34% de la población con diarrea atendida en hospitales públicos de Santa Fe, La Plata, Rosario, Corrientes, Chaco y Córdoba (Notario *et al.*, 1996; Gambandé *et al.*, 2006; Giugno y Oderiz 2010; Aro *et al.*, 2013; Huerta *et al.*, 2014; García Saito *et al.*, 2017).

En las últimas décadas se han hecho grandes avances en el diagnóstico molecular de los agentes productores de diarrea (Fratamico *et al.*, 2016). En esta tesis, la utilización de dos PCR múltiples permitió la detección de los cinco patotipos diarreigénicos de *E. coli*. Los métodos de amplificación múltiple (PCR multiplex o mPCR) constituyen una opción válida para la detección de varios patógenos en una sola reacción (Rodríguez Ángeles *et al.*, 2002). Sin embargo, una desventaja de los métodos moleculares de diagnóstico etiológico es la dificultad para detectar la viabilidad del patógeno en la muestra del paciente (Shane *et al.*, 2017). Para resolver este inconveniente, la técnica de PCR utilizada en esta tesis aseguró la viabilidad del patógeno mediante una estrategia secuencial de cultivo *in vitro* y posterior amplificación del ADN bacteriano. Además, todas las reacciones moleculares incluyeron un control de amplificación (gen 16S). La presencia de este control de amplificación permitió identificar claramente un resultado negativo por ausencia de patógeno o por causa de sustancias inhibitoras de la reacción.

Los estudios moleculares de *E. coli* requieren la implementación de protocolos validados para su aplicación diagnóstica en salud humana. En este estudio, todos los protocolos de PCR utilizados han sido validados por la Red Nacional de Diarreas coordinada por el Servicio Fisiopatogenia INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán". Dichas técnicas han sido previamente evaluadas en cuanto a límite de detección, selectividad, robustez, acordancia, concordancia, sensibilidad y especificidad diagnóstica (Malbrán 2014).

Los patógenos bacterianos hallados mediante cultivo y amplificación molecular fueron *E. coli* diarreigénica (DEC), representada por los patotipos EPEC, EAEC, ETEC, STEC, *S. flexneri*, *S. sonnei* y *S. entérica*. No obstante, siete de cada diez niños presentaron una infección entérica por EPEC, EAEC o *Shigella* spp.

El perfil etiológico de bacterias productoras de gastroenteritis varía con la región geográfica. En Europa, los patógenos más frecuentes en niños con diarrea fueron EPEC, EAEC y *S. entérica* (Bruzzese *et al.*, 2018). De modo similar, cuatro estudios sobre diarrea infantil realizados en Estados Unidos, Canadá, Noruega y Australia reportaron que el patógeno prevalente fue EPEC (Afset *et al.*, 2003; Klein *et al.*, 2006; Nguyen *et al.*, 2006; Slinger *et al.*, 2017). Estudios recientes en niños con diarrea de regiones desarrolladas de China reportaron que *S. enterica* y DEC fueron los agentes etiológicos más detectados, mientras que, en las regiones menos desarrolladas de dicho país, *Shigella* spp. fue más frecuente (Wang *et al.*, 2015; Tian *et al.*, 2016; Zang *et al.*, 2016). En India, Irán y Jordán, los patógenos más detectados en niños con diarrea fueron DEC y *Shigella* spp. (Youssef *et al.*, 2000; Anvikar *et al.*, 2008; Shrivastava *et al.*, 2017; Aminshahidi *et al.*, 2017).

En países en desarrollo de África, Asia y Latinoamérica, los principales patógenos reportados fueron *Shigella* spp. y *S. enterica* (Bruzzese *et al.*, 2018). Asimismo, tres relevamientos realizados en países africanos, Botsuana, Nigeria, y Zambia, informaron que la preponderancia de ambos patógenos en niños con diarrea (Urio *et al.*, 2001; Langendorf *et al.*, 2015; Chiyangi *et al.*, 2017). A diferencia de los estudios anteriores, dos trabajos realizados en Kenia reportaron que los patotipos EPEC y EAEC fueron prevalentes en los cuadros diarreicos (Sang *et al.*, 2012; Schilling *et al.*, 2017). En Latinoamérica, DEC fue el patógeno prevalente en México, Brasil y Uruguay, mientras que *Shigella* spp. fue predominante en Cuba y Perú (Flores-Abuxapqui *et al.*, 1994; Torres *et al.*, 2001; González-Corona *et al.*, 2002; Franzolin *et al.*, 2005; Carreazo *et al.*, 2011; Varela *et al.*, 2015).

En Argentina, la diarrea aguda es un evento de notificación obligatoria. El Ministerio de Salud de la Nación informó que los agentes bacterianos identificados con mayor frecuencia fueron *Shigella* spp., en particular *S. flexneri*,

E. coli diarreigénico, con predominio de EPEC y *S. enterica* (MSAL 2012). Diversos estudios observacionales realizados en las ciudades de Rosario, La Plata y Santa Fe indicaron que los patógenos *Shigella* spp., *S. enterica* y EPEC fueron frecuentes en niños con diarrea atendidos en hospitales públicos (Notario *et al.*, 1996; Giugno y Oderiz 2010; Aro *et al.*, 2013). De igual modo, un estudio prospectivo realizado en 600 niños correntinos menores de 5 años con diarrea reveló que los patógenos bacterianos hallados fueron *Shigella* spp. y *S. enterica* (Balbachan *et al.*, 2007).

Uno de cada tres niños con diarrea estuvo infectado con patotipos diarreigénicos de *E. coli*. Las frecuencias de infección humana con DEC variaron ampliamente según la región geográfica. Diversos estudios en países desarrollados como Dinamarca, Israel y Estados Unidos informaron frecuencias entre 14% y 19%, mientras que valores entre 30% y 63% fueron observados en relevamientos de Irán (Haghi *et al.*, 2013; Tobías *et al.*, 2015; Hebbelstrup Jensen *et al.*, 2016; Stockmann *et al.*, 2017; Miri *et al.*, 2017). En contraposición, cuatro recientes estudios realizados en distintas provincias de China reportaron frecuencias de infección por DEC menores a 8% (Qu *et al.*, 2014; Tian *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2018).

Ciertas regiones de Asia y África presentaron valores elevados de infección por patotipos diarreigénicos de *E. coli*. Al respecto, estudios realizados en India y el Sudeste asiático informaron frecuencias de infección por DEC entre 12% y 52% (Nguyen *et al.*, 2006; Rajendran *et al.*, 2010; Tilak *et al.*, 2012; Dutta *et al.*, 2013). De modo similar, países africanos como Nigeria, Tanzania y Burkina Faso han informado frecuencias entre 10% y 45% (Moyo *et al.*, 2007; Nweze *et al.*, 2010; Onanuga *et al.*, 2014; Konate *et al.*, 2017).

Los países de Latinoamérica mostraron una amplia variación en la frecuencia de infección con DEC. Chile, México, Bolivia y Brasil presentaron los valores más bajos (11% a 25%), mientras que, Perú, Venezuela, Uruguay y Paraguay mostraron mayores frecuencias de infección (31% a 47%) (Vidal *et al.*, 2005; Franzolin *et al.*, 2005; Varela *et al.*, 2007; Ochoa *et al.*, 2008; Gonzales *et al.*, 2013; Canizalez-Roman *et al.*, 2016; Michelli *et al.*, 2016; Canata *et al.*, 2016).

En Argentina, la mayoría de los estudios han sido realizados en STEC, un patógeno de gran relevancia clínica y epidemiológica para la salud pública. Sin embargo, la detección de los patotipos DEC en estudios de tipo hospitalario son muy escasos. Al respecto, dos relevamientos realizados en Corrientes señalaron que la frecuencia de DEC varió entre 31% y 37%, valores cercanos al reportado en esta tesis (Medina *et al.*, 2010; Esquivel *et al.*, 2010).

Las cepas DEC aisladas de niños con diarrea de Tandil presentaron un predominio de EPEC, seguido de EAEC. Los patotipos ETEC y STEC se detectaron en menor proporción, mientras que EIEC no fue hallado en este estudio. Estos resultados son concordantes con la información oficial de Argentina. Al respecto, el Sistema Nacional de Vigilancia por Laboratorios (SIVILA-SNVS) de Argentina informó que el segundo agente bacteriano en importancia fue EPEC. De igual modo, el Servicio de Fisiopatogenia del Instituto Malbrán, Argentina comunicó el predominio de EPEC y EAEC (MSAL 2012; Rivas *et al.*, 2010).

En coincidencia con la presente tesis, el patotipo EPEC fue prevalente en casos de diarrea de China, Uruguay, Chile, Venezuela, Dinamarca, Israel, Estados Unidos, Nigeria, Tanzania y Burkina Faso (Franzolin *et al.*, 2005; Vidal *et al.*, 2005; Varela *et al.*, 2007; Moyo *et al.*, 2007; Nweze *et al.*, 2010; Qu *et al.*, 2014; Onanuga *et al.*, 2014; Tobías *et al.*, 2015; Tian *et al.*, 2016; Michelli *et al.*, 2016; Hebbelstrup Jensen *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2017; Stockmann *et al.*, 2017; Konate *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2018).

A diferencia de lo hallado, ETEC y STEC fueron observados con mayor frecuencia en Irán, México, India y Egipto (Bhan *et al.*, 1989; Flores-Abuxapqui *et al.*, 1994; Rao *et al.*, 2003; Qadri *et al.*, 2005; Haghi *et al.*, 2013; Miri *et al.*, 2017). Más aún, EAEC se halló en mayor proporción en India y sudeste asiático, México, Paraguay, Perú y Bolivia (Nguyen *et al.*, 2006; Ochoa *et al.*, 2008; Rajendran *et al.*, 2010; Tilak *et al.*, 2012; Dutta *et al.*, 2013; Gonzales *et al.*, 2013; Canizalez-Roman *et al.*, 2016; Canata *et al.*, 2016).

En esta investigación, la clasificación de los aislamientos DEC mediante métodos serológicos y moleculares presentó diferencias y la correspondencia entre ambos métodos fue baja. Los antígenos O no están restringidos a una única categoría DEC y, por lo tanto, el mismo serogrupo podría observarse en patotipos distintos. En 1987, la OMS reportó los 12 serogrupos principales de EPEC (O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142 y O158). Más aún, estudios posteriores han demostrado que dichos serogrupos pueden observarse en otras categorías de DEC, principalmente EAEC (Giammanco *et al.*, 1996; Trabulsi *et al.*, 2002; Campos *et al.*, 2004; Kozub-Witkowski *et al.*, 2008; Lluque *et al.*, 2010; Tilak *et al.*, 2012). Asimismo, un trabajo sobre EAEC demostró que la mitad de los aislamientos no pudieron ser serotipificados (Weintraub *et al.*, 2007). De igual modo, una amplia revisión sobre el tema reveló que los serogrupos O86, O111, O125 y O127 pueden ser detectados en EPEC y EAEC, que el serogrupo O126, puede observarse en EPEC y ETEC y que los serogrupos O26, O55, O111, O119, O126 y O128 pueden hallarse tanto en EPEC como en STEC (do Valle *et al.*, 1997; Rodríguez Ángeles *et al.*, 2002).

Un extenso trabajo realizado en más de 3.000 cepas DEC de origen asiático, previamente identificadas por métodos serológicos, reveló la presencia de genes de virulencia solamente en 65% de los casos (Tamura *et al.*, 1996). En contraposición, varios autores han reportado discrepancias entre ambas metodologías. Por ejemplo, un amplio trabajo sobre aislamientos clínicos de EPEC desarrollado en Alemania reveló que solamente 27% de las cepas pudieron ser identificadas por serología y PCR. Sumado a ello, el 32% de las cepas catalogadas como patógenas por serología no presentó ningún factor de virulencia y además, se recuperaron 16 cepas, con genes de virulencia típicos de EPEC que presentaron serotipos asociados a EHEC (Kozub-Witkowski *et al.*, 2008). Otro estudio sobre cepas de *E. coli* diarreigénica realizado en Taiwán informó que solamente 11% de las cepas serotipificadas fueron confirmadas por métodos moleculares (Yang *et al.*, 2007). Resultados similares (13% a 18%) se observaron en aislamientos de Perú y de Japón (Lluque *et al.*, 2010; Tamaki *et al.*, 2005).

En Argentina, Ruttler (2005) analizó el patrón de adherencia celular y detección de genes de virulencia de 87 aislamientos de *E. coli* previamente

clasificados como EPEC. La autora halló 25% de adherencia localizada (patrón típico de EPEC), 32% con adherencia agregativa/difusa y 42% sin adherencia, mientras que los métodos moleculares revelaron la heterogeneidad de los factores de virulencia, concluyendo una correlación de 19,5% entre los métodos utilizados. En resumen, la categorización de los aislamientos de *E. coli* mediante métodos serológicos y moleculares presenta diferencias. El tamizaje serológico de las cepas EPEC es un método utilizado en los laboratorios de diagnóstico. Sin embargo, varios investigadores han reportado la emergencia de nuevos serogrupos no incluidos en los paneles comerciales y las diferencias entre métodos inmunológicos y moleculares, limitando el uso del serodiagnóstico como tamizaje para clasificación de las cepas diarreigénicas de *E. coli* (do Valle *et al.*, 1997; Campos *et al.*, 2004; Tamaki *et al.*, 2005; Blanco *et al.*, 2006; Kozub-Witkowski *et al.*, 2008).

En la presente tesis, la frecuencia de infección con EPEC en niños de Tandil fue cercana a 27%. En el mundo, la infección con dicho patotipo fue altamente variable. En países africanos y del Medio Oriente se observaron valores entre 4% y 26% (Youssef *et al.*, 2000; Al-Gallas *et al.*, 2007; Moyo *et al.*, 2007; Jafari *et al.*, 2009; Nweze *et al.*, 2010; Schilling 2010; Haghi *et al.*, 2013; Onanuga *et al.*, 2014; Tobías *et al.*, 2015; Langendorf *et al.*, 2015; Darbandi *et al.*, 2016; Miri *et al.*, 2017; Konaté *et al.*, 2017; Schilling *et al.*, 2017). Valores similares fueron hallados en el Sudeste Asiático (2% a 30%), mientras que, en China, la frecuencia de EPEC fue menor a 5% (Nguyen *et al.*, 2005; Anvikar *et al.*, 2008; Rajendran *et al.*, 2010; Tilak *et al.*, 2012; Dutta *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2015; Tian *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2017; Ramya Raghavan *et al.*, 2017; Shrivastava *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2018).

En Latinoamérica, la frecuencia de infección con EPEC presentó amplias diferencias según el país. Los valores más bajos fueron hallados en México (1%), Bolivia (6%) y Brasil (9%). Frecuencias mayores a 10% fueron observadas en Chile (11%), Perú (15%), Paraguay (15%), Venezuela (17%) y Uruguay (27%) (Torres *et al.*, 2001; Vidal *et al.*, 2005; Varela *et al.*, 2007; Ochoa *et al.*, 2008; Gonzales *et al.*, 2013; Canizalez-Roman *et al.*, 2016; Michelli *et al.*, 2016; Weiler *et al.*, 2017).

En Argentina, las menores frecuencias de infección con EPEC fueron reportadas en La Plata (6%), Corrientes (6%) y Misiones (9%) (Quiroga *et al.*, 2000; Giugno *et al.*, 2010; Esquivel *et al.*, 2010; Medina *et al.*, 2010). Los valores más elevados fueron detectados en estudios de tipo hospitalario de Mendoza (20%) y Rosario (25%) (Notario *et al.*, 1996; Rüttler 2005). La frecuencia hallada en esta investigación fue mayor a lo reportado en poblaciones de las provincias de Buenos Aires, Corrientes y Misiones, pero estuvo en concordancia con los resultados hallados en Mendoza y Santa Fe.

El 91% de todas las infecciones por EPEC fueron halladas en niños menores de 5 años, siendo más frecuente en los lactantes que en niños preescolares. Numerosas investigaciones sobre diarreas en población pediátrica han observado que EPEC constituye el patotipo DEC más frecuentemente detectado en pediatría (Nweze *et al.*, 2010; Langendorf *et al.*, 2015; Tobías *et al.*, 2015; Shrivastava *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2018). Además, la mayoría de los trabajos han reportado que los lactantes estuvieron más infectados con EPEC que los niños preescolares. Dichos autores plantearon que la menor frecuencia de infección a mayor edad podría estar relacionada con la maduración de la respuesta inmune o con cierta protección inmune generada por las diversas reinfecciones en la infancia (Youssef *et al.*, 2000; Afset *et al.*, 2003; Moyo *et al.*, 2007; Anvikar *et al.*, 2008; Rajendran *et al.*, 2010; Dutta *et al.*, 2013; Shrivastava *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2018).

Los patógenos entéricos hallados en diarreas agudas, prolongadas y persistentes constituyen un grupo diverso. En esta tesis, EPEC fue prevalente en los niños con diarrea, independientemente de la duración temporal del cuadro. Además, uno de cada tres niños con DPO y DPE estuvo infectado por EPEC. La infección intestinal con este patógeno induce cambios histopatológicos que alteran el normal funcionamiento del enterocito y podrían estar involucrados en la perpetuación del cuadro (Bhutta 2006). Por ejemplo, un estudio australiano demostró que los pacientes infectados con EPEC tuvieron cuadros diarreicos de mayor duración que los causados por otros patógenos entéricos (Santona *et al.*,

2015). Sumado a ello, EPEC también se halló como patógenos frecuente entre los niños con diarrea persistente en Australia (43%) y Noruega (22%) (Afset *et al.*, 2003; Nguyen *et al.*, 2006; Ochoa *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2015).

EPEC es una causa frecuente de diarrea acuosa que se encuentra presente en forma endémica en la mayoría de los países en desarrollo (Qadri *et al.*, 2005; Croxen *et al.*, 2013). En esta investigación, los niños con diarrea presentaron una frecuencia de infección con EPEC cercana a 3%. Una amplia revisión de estudios poblacionales mostró que EPEC fue el agente etiológico hallado en alrededor de 13% de los casos de diarrea (Croxen *et al.*, 2013). Valores de infección con EPEC menores fueron reportados en Irán (1%), Perú (7%), Estados Unidos (7%), India (12%) y Brasil (12%), mientras que frecuencias superiores fueron informadas en Bangladesh (18%), Etiopía (23%), Egipto (30%), México (33%) y Nicaragua (38%) (Cravioto *et al.*, 1990; Santosham *et al.*, 1995; Sommerfelt *et al.*, 1996; Paniagua *et al.*, 1997; Albert *et al.*, 1999; Rao *et al.*, 2003; Qadri *et al.*, 2005; Miri *et al.*, 2017).

En Argentina, dos grupos de trabajo han investigado la infección con EPEC. Un estudio de cohorte realizado en niños menores de dos años de Misiones reportó que la infección por este patógeno estuvo presente en 13% a 16% de los casos (Viboud *et al.*, 1999). Asimismo, otro trabajo realizado en niños con diarrea de Corrientes reportó una frecuencia de 8% de infección con EPEC (Medina *et al.*, 2010). Los niños de Tandil presentaron una menor frecuencia de infección con EPEC que los estudios previos en el país. No obstante, la discrepancia podría deberse a diferencias en la edad de los casos analizados o en el sesgo de selección de las muestras fecales. El estudio sobre EPEC de Misiones evaluó la presencia de esta bacteria en el grupo etario con mayor prevalencia (niños menores de 2 años) mientras que en esta tesis se estudiaron todos los niños menores de 15 años. Por otro lado, el estudio correntino solamente realizó la pesquisa de EPEC en las heces de los niños con diarrea cuyos coprocultivos habían sido negativos para *S. enterica* y *Shigella* spp. mientras que, en esta tesis se analizaron todas las heces de los niños incluidos en el estudio.

Los aislamientos de ETEC mostraron un predominio de ETEC-LT (83%) y menor proporción de ETEC-ST, con ausencia de aislamientos productores de ambas toxinas. Los perfiles de las toxinas de ETEC son variables y difieren en diferentes regiones geográficas y poblaciones (Qadri *et al.*, 2005). Una revisión sistemática de la literatura en 35 países reveló que 40% de las cepas de ETEC expresaron ST, el 27% expresaron LT y 33% expresaron LT+ST (Croxen *et al.*, 2013). Estudios de cohorte realizados en niños de Bangladesh, Egipto y Guinea han hallado un predominio de ETEC-ST. Por ejemplo, el estudio global multicéntrico de patógenos entéricos (GEMS) también informó que ETEC con ST-positivo fue un importante contribuyente a la diarrea infantil (Croxen *et al.*, 2013). En contraposición a los estudios anteriores, una extensa investigación que incluyó más de 17.000 cepas de ETEC reportó que la toxina LT fue hallada con mayor frecuencia (60%) (Isidean *et al.*, 2011).

Las cepas ETEC-LT fueron prevalentes en estudios de México (41%), India (41%) y Perú (72%), mientras que las cepas productoras de ST fueron predominantes en Bangladesh (50%), Egipto (53%), Jordán (60%), Colombia (67%), España (68%) y Tanzania (100%) (Vargas *et al.*, 1998; Youssef *et al.*, 2000; Qadri *et al.*, 2005; Moyo *et al.*, 2007). Por último, el porcentaje de aislamientos de ETEC que produjeron ambas toxinas varió entre 7% y 57% (Quiroga *et al.*, 2000; Qadri *et al.*, 2005). En Argentina, el predominio de cepas ETEC con LT o ST fue evaluado en dos estudios tempranos. Los resultados fueron contrapuestos, un trabajo reportó predominio de aislamientos ETEC-ST y el otro, de ETEC-LT (Binsztein *et al.*, 1991; Viboud *et al.*, 1999). Asimismo, dos trabajos posteriores observaron un predominio de cepas ETEC-LT (70%) (Quiroga *et al.*, 2000; Medina *et al.*, 2010).

En esta investigación se observó un solo aislamiento de ETEC-ST, cuya toxina termoestable presentó la variante STp. Este factor de virulencia fue hallado en aislamientos de ETEC provenientes de numerosos países como Egipto, Japón, Guatemala, Indonesia, China, Bangladesh, Mozambique y Kenia (Tobías *et al.*, 2016). No obstante, la variante STh en fue reportada en Colombia, Brasil, Bolivia y Chile (Guerra *et al.*, 2014).

ETEC es un agente etiológico de diarrea frecuente en niños menores de dos años. En Tandil, uno de cada dos niños infectados con ETEC perteneció a dicho grupo etario. En Egipto y en Bangladesh, este patotipo produjo entre 70% y 90% de los episodios de diarrea en los lactantes (Qadri *et al.*, 2005). El predominio de infecciones por ETEC también fue observado en niños de Irán y de comunidades tribales de India (Anvikar *et al.*, 2008; Haghi *et al.*, 2013). En Argentina, un estudio de cohorte sobre casos de diarrea por ETEC señaló que los niños menores de 2 años presentaron el mayor riesgo de infección con dicho patógeno (Viboud *et al.*, 1999). La disminución de las infecciones por ETEC según se incrementa la edad podría deberse al desarrollo de la inmunidad adquirida, a determinantes genéticos individuales o a factores ambientales (Isidean *et al.*, 2011).

El patógeno ETEC causa diarrea acuosa leve a severa cuya presentación clínica suele ser aguda, aunque puede prolongarse más de una semana (Pakalniskiene *et al.*, 2009). En esta investigación, la mayoría de los niños con diarrea por ETEC presentaron cuadros agudos, hallándose casos prolongados en menor proporción. Diversos autores han indicado que la duración y gravedad de la diarrea por ETEC podría estar relacionada a una suma de factores como la edad del niño o la virulencia de la cepa involucrada en el cuadro (Qadri *et al.*, 2005; Croxen *et al.*, 2013; Hebbelstrup Jensen *et al.*, 2017). Un extenso estudio de casos y controles sobre niños con diarrea reportó que la infección por ETEC fue hallada en cuadros agudos, prolongados y persistentes (Schilling *et al.*, 2017). De modo similar, investigaciones realizadas en niños de la India revelaron la presencia de ETEC en DAG y DPE (Moyo *et al.*, 2007; Rajendran *et al.*, 2010).

EAEC es un patotipo de *E. coli* detectado con frecuencia en cuadros diarreicos de niños menores de 5 años de países en desarrollo (Croxen *et al.*, 2013). En los niños estudiados, la infección con EAEC fue hallada en 5% de los casos y ocupó el segundo lugar en frecuencia detrás de EPEC.

Frecuencias de infección con EAEC menores a 10% han sido comunicadas en Suecia (2%), Irán (3%), Dinamarca (7%) y Vietnam (9%). Por el contrario, valores más elevados han sido reportados en India (15%), Israel (26%) y Egipto (31%) (Porat *et al.*, 1998; Vargas *et al.*, 1998; Svenungsson *et al.*, 2000; Hien *et al.*, 2008; Rajendran *et al.*, 2010; Kaur *et al.*, 2010; Haghgi *et al.*, 2013; Ali *et al.*, 2014; Tobías *et al.*, 2015; Moshtagian *et al.*, 2016; Hebbelstrup Jensen *et al.*, 2017).

Numerosos estudios africanos sobre EAEC han señalado que dicho patógeno es frecuente en cuadros diarreicos (Okeke *et al.*, 2009). En particular, dos relevamientos sobre dicho patógeno, efectuados de Tanzania y Gabón presentaron frecuencias de infección de 21% y 38%, respectivamente (Presterl *et al.*, 2003; Ali *et al.*, 2012). En Latinoamérica, EAEC fue detectada en población con diarrea aguda de Nicaragua (4%), Uruguay (7%), Bolivia (11%), Panamá (13%), Brasil (16%) y México (24%) (Gonzales *et al.*, 2013; Becker-Dreps *et al.*, 2014; Jiménez Gutiérrez *et al.*, 2014; Amaral *et al.*, 2015; Patzi-Vargas *et al.*, 2015; Varela *et al.*, 2015).

En Argentina, las diarreas causadas por EAEC no son eventos de notificación obligatoria, por lo tanto, se desconocen las frecuencias de infección entérica por este patógeno. En la presente tesis, la frecuencia de infección con EAEC observada presentó un valor intermedio entre los hallados en las provincias de Mendoza, Corrientes y Misiones (3% a 11%) (Quiroga *et al.*, 2000; Ruttler *et al.*, 2002; Medina *et al.*, 2010; Esquivel *et al.*, 2010). La disparidad en los valores reportados entre los estudios mencionados y esta investigación podría deberse a diferencias en el grupo etario estudiado, el sesgo en la selección de las muestras, el método diagnóstico utilizado, los factores de virulencia amplificados o el diseño del estudio, entre otros factores. En principio, la diferencia con el estudio de niños mendocinos fue que en dicho trabajo se utilizaron 87 aislamientos de *E. coli*, seleccionados positivamente mediante métodos serológicos y provenientes de casos de diarrea en lactantes, para estimar la frecuencia de infección con EAEC. Asimismo, uno de los estudios de Corrientes seleccionó niños y adultos con diarrea y pesquisó mediante PCR solamente el 50% de los coprocultivos negativos, lo cual impidió la detección de coinfecciones

entéricas, mientras que el segundo estudio realizado en la misma provincia seleccionó pacientes con diarrea provenientes de barrios humildes. Sumado a ello, el estudio de Misiones presentó un diseño longitudinal sobre DEC en 44 niños asintomáticos con múltiples muestras fecales en cada caso de diarrea.

EAEC es un patógeno detectado con frecuencia en población pediátrica (Croxen *et al.*, 2013). En Tandil, todos los cuadros diarreicos por EAEC fueron detectados en niños menores de 5 años y se distribuyeron en proporciones similares entre lactantes y niños preescolares. Al respecto, relevamientos realizados en diversos países reportaron la preponderancia de este patotipo en niños menores de 5 años (Nguyen *et al.*, 2005; Al-Gallas *et al.*, 2007; Nweze *et al.*, 2010; Darbandi *et al.*, 2016). Sumado a ello, varios autores han comparado la frecuencia de infección con este patógeno entre lactantes y niños preescolares. Sin embargo, dichos estudios no han obtenido resultados concluyentes, algunos investigadores señalaron el predominio de EAEC en lactantes, otros en preescolares, mientras que un tercer grupo reportó infección similar en ambos grupos etarios (Moyo *et al.*, 2007; Anvikar *et al.*, 2008; Dutta *et al.*, 2013; Ali *et al.*, 2014; Ramya Raghavan *et al.*, 2017; Shrivastava *et al.*, 2017).

El patotipo EAEC fue hallado en niños con cuadros agudos, prolongados y persistentes. La presencia de este patógeno en niños con diarrea del cuadro está en coincidencia con numerosas investigaciones (Nguyen *et al.*, 2006; Al-Gallas *et al.*, 2007; Okeke *et al.*, 2009; Jafari *et al.*, 2009; Rajendran *et al.*, 2010; Kaur *et al.*, 2010; Kermani *et al.*, 2010; Croxen *et al.*, 2013; Hebbelstrup Jensen *et al.*, 2014; Tobías *et al.*, 2015; Tian *et al.*, 2016; Schilling *et al.*, 2017; Rogawski *et al.*, 2017). Más aún, estudios realizados en Mongolia, India, Brasil, Nigeria, Israel, Venezuela y Congo han identificado el patotipo EAEC como un patógeno frecuente en cuadros agudos, prolongados y persistentes de la infancia (Okhuysen *et al.*, 2010; Robins-Browne *et al.*, 2016).

Escherichia coli productor de toxina Shiga (STEC) ha sido reconocido como agente causal de diarrea sanguinolenta y SHU. La frecuencia de infección

pediátrica con STEC fue cercana a 1% de los niños estudiados. Islam *et al.* (2007) determinaron la presencia de dicho patotipo en niños con diarrea de Bangladesh hallando una frecuencia de 1,9% en población de un asentamiento urbano y 0,5% en niños hospitalizados. De modo similar, investigadores de México, Perú, Kenia, Tailandia y Arabia Saudita reportaron la presencia de STEC entre 0,3% y 1,3% en niños con diarrea (Leelaporn *et al.*, 2003; Ochoa *et al.*, 2008; Sang *et al.*, 2012; Canizalez-Roman *et al.*, 2016; Sharaf *et al.*, 2016). A diferencia de lo hallado en esta investigación, en relevamientos de Buenos Aires, Misiones y Corrientes, las frecuencias de STEC observadas variaron entre 1,9% y 7% (Medina *et al.*, 2010; Esquivel *et al.*, 2010; Rivas *et al.*, 2010; Irurtia *et al.*, 2013).

En la presente tesis, el serotipo de STEC prevalente fue O157:H7 (67%). Más aún, se detectó por primera vez el serotipo O145:H28 (33%) en la población con diarrea atendida en el hospital DBV. Los métodos fenotípicos permiten la identificación presuntiva de STEC O157, pero dichos métodos no tienen la capacidad de detectar los otros serotipos de STEC. Por ende, el aislamiento no-O157 solamente pudo ser detectado en el laboratorio mediante la utilización de métodos moleculares.

Estos hallazgos estuvieron en concordancia con la bibliografía (Wahl *et al.*, 2011; Croxen *et al.*, 2013). Los serotipos no-O157 como O26, O103, O111 y O145 han sido asociados con patología intestinal (Wahl *et al.*, 2011; Delannoy *et al.*, 2013). La frecuencia de infecciones humanas por serotipos STEC no-O157 varía entre 30% y 60% en el mundo (Eklund *et al.*, 2001; Sonntag *et al.*, 2004; Delannoy *et al.*, 2013). Un extenso estudio alemán detectó el serotipo O145:H28 en 6% de 460 aislamientos clínicos de STEC (Beutin *et al.*, 2004). Sumado a ello, un estudio noruego reportó un brote de diarrea por STEC O145:H28 que afectó a 16 niños menores de 5 años (Wahl *et al.*, 2011).

Varios estudios realizados en Argentina informaron que los serotipos de STEC hallados con mayor frecuencia fueron O157:H7 (60-76%) y O145:NM (13-29%) en infecciones humanas (Rivas *et al.*, 2003; Rivas *et al.*, 2008; MSAL 2015; Oderiz *et al.*, 2018).

En esta investigación, los aislamientos de STEC presentaron los genes de virulencia: toxina shiga (*stx2*), intimina (*eae*) y enterohemolisina (*ehxA*). Las toxinas Shiga (Stx1 y Stx2) constituyen el principal factor de virulencia de STEC (Lopardo *et al.*, 2016). Las cepas de STEC que producen Stx1 o Stx2 han sido reportadas en estudios de numerosos países como Alemania, Francia, Irán, Suecia, Uruguay, Brasil y Nueva Zelanda, mientras que la presencia de aislamientos de STEC productores de ambas toxinas (Stx1 y Stx2) fue informada en niños con diarrea de Irán, Túnez y Francia (Pradel *et al.*, 2000; Al-Gallas *et al.*, 2007; Beutin *et al.*, 2007; Jafari *et al.*, 2009; Abbasi *et al.*, 2014; Jaros *et al.*, 2014; Bai *et al.*, 2018). En Argentina, los reportes oficiales indicaron que los principales factores de virulencia de STEC asociados a infección humana fueron *stx2*, *eae* y *ehxA* (Malbrán 2014; Lopardo *et al.*, 2016). De igual modo, diversos estudios clínicos de cepas STEC aisladas de niños con diarrea de la Provincia de Buenos Aires reportaron que los genes de virulencia *stx2*, *eae* y *ehxA* fueron hallados con mayor frecuencia (Gómez *et al.*, 2010; Zotta *et al.*, 2015; Oderiz *et al.*, 2018).

La electroforesis en gel de campo pulsado o PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis), es el procedimiento de subtipificación más utilizado para diferenciar cepas bacterianas que causan brotes de infección comunitarios. Ante la sospecha de un brote, se enviaron las cepas STEC al Servicio de Fisiopatogenia del ANLIS-Malbrán, donde se analizaron dos aislamientos entéricos de STEC O157:H7 recuperados al mismo tiempo en áreas geográficas distanciadas, una proveniente de un niño de Tandil y otra detectada en un niño de la provincia de Santa Fe. Ambas cepas STEC presentaron los mismos factores de virulencia y el mismo patrón PFGE. En Argentina, la mayoría de los brotes epidémicos y casos esporádicos de SHU se han asociado con cepas STEC del serotipo O157:H7. Los patrones de XbaI-PFGE obtenidos de cepas STEC circulantes en Argentina demostraron una alta diversidad genética, siendo frecuente el patrón PFGE AREHX01.0011 (Rivas *et al.*, 2006; Gómez *et al.*, 2010; Rivas *et al.*, 2010; Rivas *et al.*, 2011).

Los tres niños de Tandil con infección por STEC presentaron menos de 5 años. En Argentina, las infecciones por STEC son registradas mediante el Sistema Nacional de Vigilancia de Salud y la notificación de dichos casos tiene carácter obligatorio e individualizado a partir del año 2000. Respecto a la distribución de casos según la edad, los niños argentinos menores de 5 años abarcaron el 84% de las notificaciones (Rivas *et al.*, 2011; MSAL 2012).

Diversos autores han demostrado que la presentación clínica de la infección con cepas STEC O157 y no-O157 presenta diferencias en cuanto a severidad y duración del cuadro (Rivas *et al.*, 2006; Hedican *et al.*, 2009). Dos niños tandilenses infectados por cepas STEC O157 presentaron cuadros clínicos de SHU, mientras que el niño infectado con la cepa O145:H28 (no-O157) desarrolló una diarrea sanguinolenta de curso prolongado. Respecto de la presentación clínica, un extenso relevamiento hospitalario sobre 28.000 casos de diarrea reportó que los casos infectados con STEC O157 presentaron diferencias significativas en frecuencia de diarrea sanguinolenta, hospitalización y SHU en comparación con los casos de diarrea infectados con STEC no-O157. Además, en dicho trabajo se reportó que todos los casos de SHU fueron producidos por aislamientos STEC pertenecientes al serotipo O157 (Hedican *et al.*, 2009). Resultados similares fueron hallados niños con STEC de Noruega, los cuales estuvieron infectados con serotipos no-O157 y ninguno desarrolló SHU (Afset *et al.*, 2003). De igual modo, un estudio prospectivo basado en niños con diarrea demostró que la duración media de la diarrea fue significativamente mayor en niños infectados por cepas no-O157 (Klein *et al.*, 2002).

En el período estudiado no se detectaron aislamientos de *E. coli* del serogrupo O104. Este patógeno STEC no-O157 ha sido responsable de un brote de diarrea sanguinolenta y síndrome urémico hemolítico ocurrido en Alemania, diversos países de Europa, Estados Unidos y Canadá, causando 3.332 casos de infección por STEC, incluyendo 818 casos de SHU y 36 muertes (Scheutz *et al.*, 2011; Robins-Browne *et al.*, 2016).

La morbilidad y mortalidad asociadas a las infecciones entéricas por *Shigella* spp. constituyen un problema relevante de salud en el mundo (Kotloff *et al.*, 2013). En los niños de Tandil, la frecuencia de infección por *Shigella* spp. fue cercana a 5%. Las especies halladas fueron *S. flexneri* (90%) y *S. sonnei* (10%).

Las especies de *Shigella* presentan una distribución geográfica heterogénea. Kahsay y Muthupandian (2016) realizaron una extensa revisión sobre cuadros de diarrea causados por *Shigella* en países de Asia, África y Sudamérica durante el período 2001-2014. Dichos autores hallaron un predominio de *S. flexneri* en niños menores de 15 años de Etiopía, Kenia, Eritrea, Ghana, Pakistán, China, Irán, Nepal, India y Brasil.

En India, diversos estudios de shigelosis reportaron que la especie más frecuente fue *S. flexneri* (60%), seguido por *S. sonnei* (24%), *S. dysenteriae* (10%) y *S. boydii* (6%) (Pazhani *et al.*, 2005; Mandal *et al.*, 2012). No obstante, el predominio casi absoluto de la especie *S. flexneri* en pacientes con shigelosis fue reportado por varios autores. En India, un extenso relevamiento quinquenal realizado por Mamatha y Rithuparna (2012) demostró que dicha especie alcanzó 95% de los aislamientos de *Shigella* spp. Resultados similares (91%) fueron reportados en otro estudio de pacientes indios con dicha infección (Mandal *et al.*, 2012). En China, Yang *et al.* (2013) observaron la preponderancia anual de la especie *S. flexneri* (84%) en la población con diarrea investigada durante los siete años del estudio.

En Latinoamérica, el predominio de *S. flexneri* en cuadros diarreicos fue reportado en Brasil, Bolivia, Uruguay, Chile, México y Paraguay (Torres *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2008; Rolfo *et al.*, 2012; Zaidi *et al.*, 2013; Baca *et al.*, 2014). En Argentina, los reportes oficiales señalaron que *S. flexneri* ha sido reconocida como el principal agente causal de diarreas bacterianas que afectan a los niños menores de cinco años (MSAL 2012; Lopardo *et al.*, 2016). Sumado a ello, dicha especie fue hallada con mayor frecuencia en pacientes con diarrea atendidos en hospitales públicos de La Plata, Santa Fe, Capital Federal, Corrientes, General Roca, Rosario y Córdoba (Merino *et al.*, 2004; Balbachan *et al.*, 2007; Giugno y

Oderiz 2010; Cortes *et al.*, 2010; Landolt *et al.*, 2010; Rolfo *et al.*, 2012; Durany *et al.*, 2014; Casabonne *et al.*, 2016; Molinari *et al.*, 2018)

El patógeno *Shigella* spp. fue hallado en niños de todos los grupos etarios, sin embargo, el 70% de los aislamientos correspondió a niños menores de 5 años. En el contexto mundial, siete de cada diez casos de shigelosis se produjeron en este grupo etario (Kotloff *et al.*, 2013). Ejemplos de esta situación fueron reportados en Brasil, China, Eritrea y Nepal (Kahsay *et al.*, 2015; Tian *et al.*, 2016). Asimismo, dos estudios de hospitales de Argentina señalaron el predominio de shigelosis en niños menores de 5 años y fueron concordantes con lo publicado en otros países (Guigno y Oderiz 2010; Rolfo *et al.*, 2012)

Respecto a la edad, *Shigella* spp. fue detectada en niños con cuadros diarreicos agudos y prolongados. En 2017, Schilling *et al.* realizaron un extenso relevamiento de cuatro años sobre la duración de la diarrea en niños de Kenia enrolados en el Estudio Entérico Global Multicéntrico (GEMS). Los autores de este estudio detectaron a dicho patógeno en la población con cuadros agudos, prolongados y persistentes. En 2013, Becker *et al.* condujeron una revisión sobre desórdenes digestivos persistentes causados por agentes infecciosos. En dicho estudio, se mencionó a *Shigella* spp. como un patógeno capaz de causar cuadros diarreicos agudos, disentéricos y persistentes. Otra revisión sistemática sobre niños con diarrea de nueve países en desarrollo indicó que dicha bacteria fue hallada entre 2% y 5% de los cuadros de mayor duración (Abba *et al.*, 2009). Dicha observación también ha sido señalada por otros autores (Ahmed *et al.*, 2001; Bhutta 2006; Giannatasio *et al.*, 2016). Según Thapar y Sanderson (2004), la prolongación del cuadro diarreico por *Shigella* spp. podría deberse a la invasión de la mucosa colónica y la inducción de una respuesta inflamatoria que perpetúa el cuadro intestinal.

Ocho de los diez aislamientos de *Shigella* spp. presentaron resistencia a uno o varios antimicrobianos (ATM). La resistencia bacteriana a los betalactámicos alcanzó 70% de los aislamientos, mientras que dicho fenómeno fue relativamente menor (10%) para fluoroquinolonas e inhibidores de vía de los

folatos. Al respecto, cinco estudios realizados en población con diarrea de India durante los últimos 20 años reportaron amplias variaciones en la susceptibilidad de *Shigella* spp. frente a los distintos ATM. Los autores de dichos trabajos hallaron frecuencias de aislamientos resistentes a Ampicilina (AMN) entre 42% y 100%, Trimetoprima-sulfametoxazol (TMS) entre 55% y 100%, Ácido Nalidíxico (NAL), Ciprofloxacina (CIP) y Cefalosporinas de tercera generación (C3G) entre 0% y 100% (Dutta *et al.*, 2002; Taneja *et al.*, 2007; Patil *et al.*, 2012; Anandan *et al.*, 2017). Por el contrario, en China, Yang *et al.* (2013) reportaron frecuencias de resistencia mayores a 80% para AMN, TMS y NAL en aislamientos clínicos de *Shigella* spp. y menores a 28% para CIP y C3G. Resultados similares fueron hallados por los autores de un estudio longitudinal iraní sobre 270 aislamientos clínicos de *Shigella* spp. (Aminshahidi *et al.*, 2017)

Con respecto a las fluoroquinolonas, una extensa revisión sistemática realizada por Gu *et al.* (2012) sobre susceptibilidad de *Shigella* spp. en cuatro continentes reveló frecuencias de cepas resistentes variables según la región. Por ejemplo, en Asia y África, el porcentaje de resistencia fue 34% para NAL y 5% para CIP. Sin embargo, dichos valores sufrieron incrementos progresivos anuales con aumentos hasta 64% de los valores previamente observados. A diferencia de ello, en Europa y América, los porcentajes de resistencia fueron menores a 6% para ambos ATM.

En Argentina, la resistencia de *Shigella* spp. a los ATM mostró amplias variaciones. Por ejemplo, Manera *et al.* (2017) estudiaron el perfil de resistencia de dicha bacteria en la población con diarrea atendida en el Hospital de Córdoba durante 2010-2015. Los autores reportaron resistencias bacterianas de 53% a AMN y de 40% a TMS, con ausencia de cepas resistentes a C3G, CIP y Fosfomicina. Otro estudio realizado en Buenos Aires con pacientes atendidos en un centro de salud privado informó valores de resistencia a AMN entre 67% y 73% y a TMS entre 43% y 49% durante el período 2005-2011 (Bajuk *et al.*, 2016). Más aún, otro trabajo reciente desarrollado por Molinari *et al.* (2018) en niños con diarrea de la misma provincia detectó una frecuencia de *Shigella* spp. resistente a TMS cercano a 15%.

Un extenso estudio sobre aislamientos de *Shigella* spp. provenientes de centros de salud realizado por la Red WHONET de Argentina reportó los valores de resistencia más elevados para AMN, TMS y cloranfenicol, mientras que la resistencia a fosfomicina, C3G y nitrofurantóina fueron muy bajos o nulos. Sumado a ello, el estudio temporal de dicha información durante 1994-2009, presentó una marcada tendencia decreciente en la resistencia a TMS para la especie *S. flexneri* y un incremento de dicho fenómeno para AMN en *S. sonnei* (Galas *et al.*, 2010). Asimismo, dicha red nacional informó la amplia variabilidad geográfica de los resultados y emergencia de nuevos perfiles de resistencia, destacando la necesidad de vigilancia antimicrobiana continua.

Por último, una exhaustiva revisión sistemática sobre el tratamiento de shigelosis ha incluido estudios clínicos controlados y aleatorizados de los últimos 40 años, concluyendo que la administración de antimicrobianos (ATM) en esta infección reduce la duración del episodio diarreico (Niyogi *et al.*, 2007). Una segunda conclusión de este trabajo fue que la elección del fármaco debe estar claramente sustentada por los patrones de sensibilidad a los ATM locales, periódicamente actualizados a partir de los aislamientos bacteriológicos de *Shigella* spp. (Niyogi *et al.*, 2007; Christopher *et al.*, 2010).

La frecuencia de infección intestinal por *Salmonella* No tifoidea (SNT) fue cercano a 3%. En coincidencia con la bibliografía, el grupo bacteriano OMA fue prevalente, mientras que el OMB se halló en menor proporción (Chiappini *et al.*, 2002; Maraki *et al.*, 2003; Jafari *et al.*, 2008; Nunes *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2015). Todos los niños con salmonelosis presentaron enfermedad diarreica intestinal (Caffer *et al.*, 2001). En cumplimiento con las recomendaciones vigentes, en la presente tesis, no se realizaron estudios de sensibilidad en los aislamientos intestinales de *S. enterica*. Dicho consenso sobre las pruebas de sensibilidad antibacteriana en *Enterobacteriaceae*, ha indicado que, solamente debe realizarse el estudio de sensibilidad a los ATM en casos de infección por *Salmonella enterica* serovar Typhi y de SNT provenientes de aislamientos extraintestinales (CLSI 2015; Murray 2014; Lopardo *et al.*, 2016; WHONET 2017).

S. enterica es una de las cuatro causas principales de enfermedades diarreicas a nivel mundial. Estudios realizados en diversos países han reportado frecuencias de infección de SNT entre 2% y 11% en población con diarrea de China, Italia, Brasil, Irán y Grecia (Chiappini *et al.*, 2002; Maraki *et al.*, 2003; Jafari *et al.*, 2008; Nunes *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2015). Valores más elevados fueron reportados en India y África. Por ejemplo, en Calcuta, Saha *et al.* (2001) estudiaron niños con diarrea detectando una frecuencia de salmonelosis intestinal en 15% de los casos. Asimismo, Im *et al.* (2016) realizaron un estudio sobre la prevalencia de dicho patógeno en alrededor de dos mil habitantes de Guinea-Bissau y Senegal, hallando prevalencias de infección hasta 24%. Resultados similares de salmonelosis por SNT fueron reportados por Wei *et al.* (2016) en niños con diarrea de Shanghái.

En Argentina, los reportes oficiales señalaron que SNT ha sido reconocida como el tercer agente causal de diarreas bacterianas que afectan a los niños menores de 5 años, detrás de *Shigella* spp. y de EPEC (MSAL 2012). Al respecto, un estudio multicéntrico realizado por Binsztein *et al.* (1999) abarcó población pediátrica de siete localidades del país durante un sexenio. Dichos autores estudiaron más de 4.300 niños y hallaron una frecuencia de infección por SNT en 4,6% de los cuadros diarreicos agudos. Asimismo, la frecuencia de aislamiento de dicha bacteria varió entre 1,2% y 5,2% en pacientes con diarrea atendidos en hospitales públicos de Buenos Aires, Corrientes, Rosario, Córdoba, La Plata y Santa Fe (Notario *et al.*, 1996; Gambandé *et al.*, 2006; Balbachan *et al.*, 2007; Giugno y Oderiz 2010; Medina *et al.*, 2010; Cortes *et al.*, 2010; Landolt *et al.*, 2010). En contraposición, valores más elevados (10%) fueron reportados en niños con diarrea de Santa Fe y Chaco (Aro *et al.*, 2013; García Saito *et al.*, 2017).

El patógeno SNT fue hallado en lactantes mayores y preescolares con similar proporción en ambos grupos. No se observaron infecciones por dicho patógeno en niños de mayor edad. Esta distribución etaria de los niños con salmonelosis fue similar a lo reportado por autores de diversos países. Un estudio temprano realizado por Kazemi *et al.* (1974) en Canadá halló la mayor frecuencia de infecciones por SNT en niños entre 1 y 3 años. En 2016, Tian *et al.* estudiaron

los patógenos entéricos en niños menores de 5 años con diarrea provenientes de seis provincias de China. Dichos autores reportaron que dicha bacteria fue más frecuente en niños preescolares que en lactantes. Asimismo, Chung *et al.* (2017) demostraron que SNT fue el agente etiológico de diarreas más frecuente en niños menores de 5 años de Taiwán. Además, los autores informaron que la mayor frecuencia de infección fue hallada en niños entre 2 y 3 años de vida, con una disminución marcada luego de esa edad. El predominio de esta bacteria en preescolares sobre los lactantes también fue reportado en otro estudio de dicho país (Chen *et al.*, 2013).

La salmonelosis intestinal aguda representó 83% de los casos, mientras que un niño de edad preescolar presentó un cuadro de diarrea por SNT cuya duración fue de 10 días. Este patógeno entérico suele producir gastroenteritis aguda que no requiere terapia antimicrobiana, sin embargo, puede causar un amplio espectro clínico, desde la colonización intestinal (estado portador) hasta la enfermedad fatal (Fierer *et al.*, 2001).

La duración temporal de la gastroenteritis por SNT en población menor de 15 años ha sido estudiada en Canadá por Kazemi *et al.* (1974). Estos autores reportaron cuadros compatibles con DPO, con una duración promedio de 9 días de diarrea, y un rango entre 2 y 60 días de evolución. Además, la categorización en grupos etarios demostró que las salmonelosis entéricas en lactantes y preescolares presentaron cuadros compatibles con DPO y DPE. Del mismo modo, este patógeno fue hallado en niños con DAG, DPO y DPE de Kenia y en cuadros persistentes de diarrea en el Sudeste asiático. (Abba *et al.*, 2009; Schilling *et al.*, 2017). Sumado a ello, Marzel *et al.* (2016) estudiaron más de 48.000 aislamientos de SNT ocurridas en Israel durante 18 años, de los cuales cerca de 2,2% fueron infecciones persistentes. Los autores indicaron que el 65% de los niños infectados con dicha bacteria presentaron cuadros de diarrea recurrente durante la etapa de eliminación fecal del patógeno y postularon una presentación clínica diferente del estado de portador asintomático crónico.

La gastroenteritis aguda es una de las enfermedades más frecuentes en el mundo. En particular, los virus entéricos han sido reconocidos causas relevantes

de dicha enfermedad en la edad pediátrica (Wilhelmi *et al.*, 2003; Ruiz-Palacios *et al.*, 2006). En los niños estudiados, la frecuencia de infección por Rotavirus fue menor a 4%. Dicho valor fue menor al publicado por otros autores. Por ejemplo, Parashar *et al.* (2003) recopilaron información, publicada en el período 1986-2000 sobre la morbilidad mundial por Rotavirus en pediatría. Los autores hallaron que las infecciones por dicho virus representaron entre 8% y 21% de las diarreas en el período relevado. Asimismo, en países latinoamericanos como México, Venezuela y Uruguay, la frecuencia de Rotavirus varió entre 8% y 22% de los niños con diarrea (Flores-Abuxapqui *et al.*, 1994; Torres *et al.*, 2001; Cermeño *et al.*, 2008). Por el contrario, los valores más elevados de gastroenteritis por Rotavirus en pediatría fueron reportados en Europa occidental con frecuencias entre 25% a 63% (Ogilvie *et al.*, 2011). Similares resultados (16% a 61%) fueron observados en Oriente medio y África del norte (Khoury *et al.*, 2011).

La baja frecuencia de rotavirus en la población con diarrea atendida en el hospital de Tandil pudo deberse a la incorporación de la vacuna contra dicho virus al calendario nacional a partir de enero de 2015. En el mundo, la introducción de dicha vacuna ha mostrado una reducción significativa de las gastroenteritis y las hospitalizaciones por este agente causal (Ruiz-Palacios *et al.*, 2006; Curns *et al.*, 2010). En Argentina, la vacuna monovalente humana a virus atenuado Rotarix® se incluyó en el Calendario Nacional de Inmunizaciones durante 2015, con un esquema de dos dosis (2 y 4 meses). En el país, los estudios sobre Rotavirus en la era prevacunal reportaron que dicho virus fue el responsable de 13% a 26% de las diarreas en pacientes ambulatorios (Giordano *et al.*, 2001; García Roig *et al.*, 2013; Córdoba *et al.*, 2017; Areso *et al.*, 2018).

De igual modo, en 2013, Degiuseppe *et al.* realizaron un estudio de vigilancia epidemiológica sobre Rotavirus en el trienio 2009-2011. Los autores estimaron una frecuencia de infección anual cercana a 28% de los niños argentinos hospitalizados.

Recientemente, Neyro *et al.* (2017) describieron la situación epidemiológica de la diarrea aguda en niños de Argentina en el contexto de la vacunación contra Rotavirus. Los investigadores hallaron una reducción

significativa en la tasa de notificación de diarreas luego de la administración de la vacuna antedicha. Más aún, los autores reportaron que el mayor impacto de este fenómeno fue observado en los lactantes menores de las regiones Noreste y Centro del país. Además, Degiuseppe *et al.* (2017) estudiaron el impacto de la incorporación de la vacuna antirotavirus al Calendario Nacional en niños argentinos con diarrea aguda, hallando una disminución significativa del 50% en los casos reportados al SNVS-SIVILA respecto a años anteriores.

La mayor tasa de rotavirus estuvo asociada a niños en edad preescolar, mientras que la infección estuvo ausente en niños menores de 1 año. En Latinoamérica, un estudio de vigilancia de gastroenteritis por Rotavirus, durante la época prevacunal señaló que alrededor de la mitad de los casos fueron lactantes (Schaetti *et al.*, 2009). Sin embargo, un extenso trabajo realizado en Estados Unidos demostró una disminución significativa de la incidencia de Rotavirus en años posteriores a la introducción de la vacuna y una reducción cercana al 80% en la incidencia de la infección en los niños de menor edad (Gastañaduy *et al.*, 2013).

La infección aguda por Rotavirus representó 88% de los casos, mientras que un lactante presentó un cuadro de DPO. Al respecto, Becker *et al.* (2013) señalaron que diversos virus entéricos, incluido Rotavirus, son capaces de causar desórdenes digestivos que lesionan la mucosa digestiva y perduran en el tiempo. Dichos resultados coinciden con una revisión sistemática realizada por Abba *et al.* (2008). Los autores revelaron que dicho virus ha sido responsable de 2% a 12% de los cuadros persistentes en niños del Sudeste asiático y del continente americano.

La vigilancia epidemiológica de laboratorio de Argentina (Sistema de Vigilancia de Laboratorio-SIVILA/SNVS) señaló a Rotavirus como el principal agente etiológico de diarreas agudas (Areso *et al.*, 2018). Sin embargo, en esta investigación, dicha infección viral se observó en baja frecuencia. Este resultado podría deberse a un menor número de consultas médicas porque los casos fueron más leves o totalmente asintomáticos. Al respecto, el Comité europeo de

Rotavirus pediátrico investigó el impacto de la enfermedad en niños menores de 5 años. Dicho comité indicó que prácticamente la totalidad de los niños sufrirá una o más infecciones por este virus, independientemente de la presentación clínica de la infección. Al respecto, un ensayo clínico de vacuna en niños finlandeses halló que solamente uno de cada siete niños presentó una infección sintomática y que alrededor de 28% de los casos sintomáticos fueron atendidos en el hogar (PROTECT 2006). Dicho grupo de investigación señaló que los datos disponibles sobre la carga de la enfermedad por Rotavirus muestran una gran variabilidad en el diseño del estudio y la definición de casos. Asimismo, reportó la limitada información sobre los casos de diarrea por rotavirus tratados en el hogar o en otros entornos de salud, destacando la necesidad de estudios de vigilancia estandarizados que aborden la carga de la enfermedad por Rotavirus y sus determinantes para los diferentes entornos de la atención sanitaria, así como estudios económicos sobre los costos médicos y no médicos de la infección (PROTECT 2006).

La frecuencia de infección con parásitos entéricos en niños sintomáticos con diarrea fue menor a 6%. Estos resultados están en coincidencia con los publicados por Fletcher *et al.* (2013a). Dichos autores realizaron una extensa revisión sistemática con meta-análisis de 60 artículos y demostraron que los parásitos entéricos fueron reportados en una baja proporción de los cuadros diarreicos. De igual modo, dos estudios prospectivos europeos presentaron frecuencias de infección parasitaria entre 1% y 8% en niños con diarrea (Uhnoo *et al.*, 1986; Svenungsson *et al.*, 2000). Frecuencias menores a 10% fueron observadas en niños con diarrea provenientes de Dinamarca, Pakistán, Estados Unidos, Nigeria, Jordán, Palestina, Uruguay, China y Etiopía (Youssef *et al.*, 2000; Torres *et al.*, 2001; Adamu *et al.*, 2006; Klein *et al.*, 2006; Adnan *et al.*, 2008; Ejiófor *et al.*, 2011; Stensvold *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2016).

Por el contrario, diversos estudios argentinos han reportado mayores frecuencias de parásitos intestinales en la población. (Borda *et al.*, 1996; Costamagna *et al.*, 1999; Costamagna *et al.*, 2002; Soriano *et al.*, 2005; Menghi *et al.*, 2007; Basualdo *et al.*, 2007; Milano *et al.*, 2007; Zonta *et al.*, 2010; Molina *et al.*,

2011, Molina *et al.*, 2014; Socías *et al.*, 2014; Grenóvero *et al.*, 2014; Basualdo *et al.*, 2015; Basualdo *et al.*, 2016; Molina *et al.*, 2016; Del Cocco *et al.*, 2017).

La frecuencia de infección por los protozoos *Cryptosporidium* spp., *Blastocystis* spp. y *G. intestinalis* fue baja y no se hallaron helmintos intestinales en los niños con diarrea. Al respecto, una extensa revisión sistemática sobre cuadros diarreicos en Bangladesh, India, Brasil, Guatemala, México, Tailandia, Camboya y Zambia realizada por Abba *et al.* (2009) documentó la presencia de *G. intestinalis*, *Cryptosporidium* spp. y *E. histolytica* con frecuencias de infección menores a 10% en la población pediátrica con síntomas gastrointestinales. Valores similares fueron reportados en la población que se atendió en hospitales de India y Etiopía (Mukherjee *et al.*, 2009; Firdu *et al.*, 2014).

Mayores frecuencias de infección protozoaria en niños con diarrea han sido observadas en otros estudios. Por ejemplo, Alegría y Ramos (2015) condujeron un estudio transversal retrospectivo en un hospital rural en el sur de Etiopía durante 2007-2012. Los autores incluyeron más de 13.000 niños etíopes con diarrea aguda, de los cuales, 26% presentaron infección parasitaria, siendo *G. intestinalis* el protozoo aislado con mayor frecuencia. De igual modo, Kaur *et al.* (2002) investigaron la diarrea de origen parasitario en 130 niños de India y comunicaron que *Cryptosporidium* spp. y *G. intestinalis*, los patógenos hallados con mayor frecuencia. En Kenia, un estudio multicéntrico realizado en niños menores de 5 años con diarrea reveló que los parásitos más frecuentes fueron *G. intestinalis* y *Cryptosporidium* spp. (Schilling *et al.*, 2017). Asimismo, una revisión de 27 estudios, realizados en población de África Subsahariana, señaló que los principales agentes parasitarios productores de diarrea fueron *Cryptosporidium* spp., *Cyclospora* spp., *Entamoeba* spp. y *Blastocystis* spp (Fletcher *et al.*, 2013b).

El rol de *Blastocystis* spp. en los cuadros de gastroenteritis es controversial, sin embargo, diversos reportes han establecido su asociación con dolor abdominal, DPE y síndrome de intestino irritable (Dogruman-Al *et al.*, 2009; Stark *et al.*, 2007; Jiménez-González *et al.*, 2011). Al respecto, un estudio danés realizado por Stensvold *et al.* (2011) halló *Blastocystis* spp. en 6% de la población con diarrea. De modo similar, Svenungsson *et al.* (2000) condujeron un estudio

de cohorte prospectivo en pacientes sintomáticos con diarrea y hallaron que la población infectada con *Blastocystis* spp. presentó diferencias significativas frente al grupo control. Valores más elevados de infección por dicho parásito han sido reportados en otros estudios de Argentina. Por ejemplo, un estudio realizado por Grossi *et al.* (2017) en población sintomática con diarrea del conurbano bonaerense reportó una frecuencia de *Blastocystis* spp. cercana a 20%. Sin embargo, los autores no reportaron la presencia de otros patógenos entéricos que pudieron haber influido en la presentación clínica del cuadro.

Una extensa revisión bibliográfica de los últimos 20 años reveló la presencia de *Blastocystis* spp. en 33% de la población. Sin embargo, todos los estudios incluidos utilizaron un diseño de tipo comunitario, sin considerar la presencia de manifestaciones clínicas intestinales por lo que se desconoce la frecuencia de dicho parásito en la población sintomática (Molina *et al.*, 2016).

En los niños con diarrea de Tandil no se hallaron helmintos intestinales. En Argentina, las helmintiasis presentan una distribución geográfica heterogénea, con áreas de alta prevalencia en el noreste y noroeste del país, y diversos focos localizados en diversas provincias del país (Costamagna *et al.*, 2002; Soriano *et al.*, 2005; Menghi *et al.*, 2007; Milano *et al.*, 2007; Zonta *et al.*, 2010; Saboyá *et al.*, 2011; Socías *et al.*, 2014).

La ausencia de dichos parásitos en los niños con diarrea de Tandil pudo deberse a diversos factores. En primer lugar, las manifestaciones clínicas de una helmintiasis intestinal están en clara dependencia con la carga parasitaria, la infección entérica con un bajo número de ejemplares suele cursar asintomática. Sumado a ello, dichos parásitos se distribuyen en forma heterogénea en la población, una proporción reducida de individuos concentran un gran número de ejemplares, mientras que el resto de la población puede estar infectada con baja carga parasitaria y permanecer asintomática (Bundy *et al.*, 1992; Mirdha *et al.*, 2002; Okello *et al.*, 2017). Por otro lado, la ausencia de helmintos podría deberse a factores climáticos adversos (Knopp *et al.*, 2009; Juárez y Rajal 2013). Diversos estudios han demostrado que las variables climáticas pueden afectar la prevalencia, intensidad y distribución geográfica de los helmintos (Schär *et al.*,

2013). Una revisión sistemática reciente que incluyó información de Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Colombia, Ecuador, Guayana Francesa, Guyana, Paraguay, Perú, Surinam, Uruguay y Venezuela demostró la asociación significativa de los helmintos con la temperatura y las precipitaciones. Además, los autores del estudio señalaron que las temperaturas ambientales extremas ejercieron un efecto negativo sobre el desarrollo de larvas parasitarias, lo que provocaría una disminución de la infección entérica en regiones con variables climáticas adversas (Chammartin *et al.*, 2013).

Las diferencias en las frecuencias de infección por protozoos en comparación con estudios publicados por otros investigadores pudieron estar asociadas a diversos factores. En principio, una amplia revisión sistemática indicó que las consultas médicas en los cuadros de diarrea varían alrededor de 35% (Lamberti *et al.*, 2012). Por ejemplo, Das *et al.* (2013) reportaron que las principales causas de la baja frecuencia de atención fueron la percepción materna de enfermedad leve y el costo elevado de la medicación. Page *et al.* (2011) indicaron que la distancia a recorrer y el costo económico fueron aspectos limitantes al momento de decidir el traslado del niño al centro asistencial. Según Firdu *et al.* (2014), la discrepancia en los valores reportados en los distintos estudios podría deberse a variaciones en las prácticas higiénicas o las condiciones de vida de los niños con diarrea. Asimismo, Schilling *et al.* (2017), hallaron una relación significativa entre la infección por *Cryptosporidium* spp. y ciertas características como el suministro inadecuado de agua potable o la incorrecta eliminación de excretas.

La baja frecuencia de parasitosis intestinal en niños de Tandil respecto a otros autores, también podría deberse a diferencias en el tipo de diseño (comunitario, a demanda), en los criterios de inclusión de los participantes (asintomáticos, sintomáticos, toda la población), en el grupo etario (niños, escolares, adultos), en el tipo de recolección de las heces (una muestra fecal, recolección seriada), en el período de recolección, en los métodos de diagnóstico utilizados (microscopía, coloraciones permanentes, detección de antígenos

parasitarios, detección de larvas, amplificación de ácidos nucleicos), en las características sanitarias de la población estudiada (excretas, agua potable), en el tipo de suelo, en la estacionalidad o en los factores climáticos del área en estudio (temperatura, humedad relativa, precipitaciones).

En relación a los aspectos metodológicos, en esta investigación se recolectó una única muestra de heces priorizando la oportunidad diagnóstica y la vigilancia activa de las infecciones intestinales. La recolección fecal seriada ha sido recomendada para incrementar la detección parasitaria. Sin embargo, la muestra única de heces frescas para la detección conjunta de bacterias, virus y parásitos entéricos, en niños con diarrea que concurren al hospital, ha sido utilizada por numerosos estudios prospectivos de Brasil, China, Estados Unidos, Etiopía, India, Irán, Jordania, Kenia, México, Sudáfrica, Uruguay y Venezuela, entre otros (Flores-Abuxapqui *et al.*, 1994; Torres *et al.*, 2001; Klein *et al.*, 2006; Nguyen *et al.*, 2006; Anvikar *et al.*, 2008; Cermeño *et al.*, 2008; Moore *et al.*, 2010; Kermani *et al.*, 2010; Huruy *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2016; Shrivastava *et al.*, 2017; Operario *et al.*, 2017; Schilling *et al.*, 2017). Asimismo, un extenso estudio multicéntrico de casos y controles sobre patógenos en 12.000 niños con diarrea utilizó la recolección de una única muestra de heces frescas para la detección de bacterias, virus y parásitos intestinales (Levine *et al.*, 2012; Panchaginlam *et al.*, 2012).

En esta investigación, la infección entérica por un único patógeno fue más frecuente y la mayoría de las coinfecciones fueron causadas por dos bacterias patógenas. Este hallazgo estuvo en concordancia con diversos estudios que señalaron frecuencias de coinfección variable entre 3% y 65% (Giugno y Oderiz 2010; Moore *et al.*, 2010; Huruy *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2016; Andersson *et al.*, 2018). La presencia de coinfección de dos bacterias patógenas en cuadros diarreicos fue señalada por autores de diversas regiones. Por ejemplo, dos estudios realizados en India hallaron un predominio de dichas coinfecciones en la población pediátrica (Kahali *et al.*, 2004; Rajendran *et al.*, 2010). Hallazgos similares de coinfección bacteriana fueron reportados por investigadores de Tanzania, Túnez, Nepal, Bolivia y Paraguay (Moyo *et al.*, 2007; Al-Gallas *et al.*, 2007; Gonzales *et al.*, 2013; Khan *et al.*, 2014; Weiler *et al.*, 2017).

A diferencia de ello, las coinfecciones entéricas producidas por bacterias y virus fueron prevalentes en otros estudios. Dos extensos trabajos realizados en regiones de China reportaron que la infección conjunta de Rotavirus y DEC fue la combinación más frecuente en niños con gastroenteritis aguda (Wang *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2016). Resultados similares de coinfección bacteriana y viral en niños con diarrea fueron reportados en India y en Burkina Faso (Nitiema *et al.*, 2011; Shrivastava *et al.*, 2017).

En esta investigación, la mayoría de los niños con cuadros diarreicos se observó en el eje urbano norte-noroeste-noreste de Tandil (región periférica). Un exhaustivo estudio realizado por Lan (2011) sobre la distribución socio-espacial de dicha ciudad indicó que la región periférica está constituida por un aglomerado urbano con alta exclusión territorial, con barrios informales, deficientes condiciones materiales de las viviendas, escasa o ausente infraestructura de red cloacal, gas o agua corriente, situación precaria del ambiente doméstico, baja cobertura en salud, alta frecuencia de hogares con necesidades básicas insatisfechas y dificultades en el acceso a la atención primaria de la salud, las escuelas y el transporte público de pasajeros. De modo similar, Fernández y Ramos (2013) demostraron que el sector norte y noroeste de la ciudad está mayormente conformado por conjuntos habitacionales promovidos por el Estado y viviendas unifamiliares de menor calidad edilicia, con escasa dotación de servicios públicos, la ausencia de espacios verdes y la mayor distancia al centro urbano.

En el mundo se estima que alrededor de 3.500 millones de casos de diarrea anuales pueden ser atribuidos a la insalubridad del agua y a deficiencias de saneamiento y de higiene (OMS 2007). Diversos trabajos han reportado la relación entre las inadecuadas condiciones higiénico-sanitarias y la elevada frecuencia de diarrea. En Etiopía, Beyene *et al.* (2018) investigaron la distribución espacial de las diarreas. Los autores hallaron una asociación significativa de la diarrea en niños de tres áreas geográficas con factores ambientales como calidad del agua de consumo y contacto con animales domésticos y de granja.

En Ghana, Osei y Stein (2017) estudiaron los patrones geográficos y las áreas de alta densidad de diarreas durante cuatro años. Los autores informaron una asociación significativa entre la frecuencia de cuadros diarreicos y la falta de urbanización, señalando una mayor presencia de dichos cuadros en áreas periurbanas con deficiencias en los servicios sanitarios. De igual modo, las condiciones insalubres de las letrinas, el hacinamiento y la acumulación de residuos peri-domiciliarios se asociaron significativamente con los episodios de diarrea aguda en los barrios marginales de Brasil, India, Etiopía, Jordania, Bangladesh, Libia, Ruanda, Sudáfrica y Nigeria (von Schirnding *et al.*, 1991; Gupta *et al.*, 1998; Kumar *et al.*, 2011; Adane *et al.*, 2017; Shrivastava *et al.*, 2017; Mokomane *et al.*, 2018).

En Tandil, los niños con diarrea presentaron una distribución espacial en conglomerados (*clusters*), con un marcado predominio geográfico en la región periférica de la ciudad. Asimismo, se logró la geolocalización del 98% de las viviendas de los niños con diarrea. Dicho porcentaje se encuentra comprendido dentro del valor mínimo permitido (93%) para los estudios de distribución espacial de los eventos de salud en la población (Cromley y McLafferty, 2002).

La distribución de cuadros diarreicos en conglomerados ha sido reportada en varios estudios. Por ejemplo, Bogale *et al.* (2017) exploraron el patrón espacial de la diarrea infantil en Etiopía durante la última década. Con el fin de diseñar programas de intervención para las diarreas, los autores estudiaron alrededor de 30.000 niños, hallando un agrupamiento espacial y temporal de los casos en todas las regiones del país. En Tailandia, Chaikaew *et al.* (2009) estudiaron la distribución geográfica de las diarreas durante un sexenio, hallando un patrón en conglomerados en áreas con limitada provisión de agua potable y escasa infraestructura sanitaria. Los autores indicaron que la elevada densidad de casos de diarrea en ciertas regiones del país estuvo significativamente asociada a factores sociodemográficos, ambientales y climáticos.

La distribución espacial en conglomerados ha sido reportada por Aramayo *et al.* (2009). Dichos autores analizaron la distribución geográfica de las enfermedades gastrointestinales en la población de la ciudad de Salta y hallaron cinco áreas urbanas con mayor concentración de casos, demostrando un patrón espacial en conglomerados. Asimismo, señalaron que los factores ambientales asociados a la mayor densidad de casos fueron las limitaciones en suministro de agua y la ausencia de saneamiento ambiental.

Los agentes etiológicos de diarrea infecciosa presentaron perfiles temporales diferentes durante el período de estudio. El primer perfil estuvo constituido por cuatro bacterias, EPEC, ETEC, EAEC y *S. enterica*, que se observaron en cuadros diarreicos en todas las estaciones del año.

Las infecciones gastrointestinales pueden ser adquiridas mediante diversas vías, como el consumo de agua o alimentos contaminados con desechos fecales o el contacto directo con personas o animales portadores de los patógenos entéricos (Onozuka y Hashizume, 2011; Ghazani *et al.*, 2018). Diversos estudios han sugerido que la transmisión por agua sería el mecanismo epidemiológico prevalente para los patógenos sin periodicidad estacional (Birkhead y Vogt, 1989; Colford *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2018). En Irán, Pirsahab *et al.* (2017) demostraron que la incidencia de infecciones intestinales estuvo asociada a la calidad microbiológica del agua potable en áreas urbanas y rurales. Asimismo, Olds *et al.* (2018) hallaron evidencias de un aumento del riesgo de enfermedad entérica en áreas urbanas luego de lluvias intensas. Dichos autores señalaron que los niveles de contaminación de las aguas residuales estuvieron directamente relacionados con la cantidad de urbanización y con la densidad de las superficies impermeables en las cuencas hidrográficas. Además, Denno *et al.* (2009) demostraron que las actividades acuáticas recreativas constituyen un factor de riesgo de infecciones bacterianas en la infancia.

La presencia de los patotipos EPEC, ETEC y EAEC en cuadros diarreicos durante todo el año ha sido reportada en diversos estudios de Argentina, Bangladesh, Bolivia, Egipto, Irán y Túnez (Rao *et al.*, 2003; Qadri *et al.*, 2005; Al-

Gallas *et al.*, 2007; Giugno y Oderiz, 2010; Gonzales *et al.*, 2013; Abbasi *et al.*, 2014; Darbandi *et al.*, 2016). La transmisión por agua de *E. coli* diarregénica ha sido demostrada en diversas publicaciones. Un extenso estudio coreano realizado por Lee *et al.* (2012) reportó que 13% de las infecciones transmitidas por agua se debieron a dicho patógeno, de las cuales, EPEC y ETEC representaron el 70% de los casos. Más aún, otro estudio reciente ha reportado un brote de infección múltiple con tres patotipos distintos (EPEC, EAEC y STEC) que afectó cerca de 200 niños coreanos (Park *et al.*, 2018).

En Taiwán, Chung *et al.* (2017) investigaron la epidemiología de *S. enterica* en niños con diarrea. Los autores señalaron que dicha bacteria presentó características endémicas no estacionales asociadas a la transmisión de persona a persona a través de la ruta fecal-oral y mediante el consumo de agua contaminada. El incremento de las precipitaciones fue propuesto como factor de riesgo por Ravel *et al.* (2010). Este último modo de transmisión también fue señalado por Afema *et al.* (2016) debido a que los autores hallaron la presencia de *S. entérica* en una elevada proporción (60%) de las aguas residuales y de alcantarillas públicas de Uganda.

Por último, un exhaustivo estudio de series temporales sobre estacionalidad de los patógenos en Inglaterra reveló que *S. entérica* exhibió un comportamiento bimodal, algunos serotipos bacterianos presentaron estacionalidad marcada mientras que otros fueron hallados de forma independiente de la estación del año (Cherrie *et al.*, 2018).

Los patógenos *Shigella* spp., STEC, Rotavirus, *G. intestinalis*, *Cryptosporidium* spp. y *Blastocystis* spp., mostraron perfiles estacionales diversos durante el período de estudio. Estos resultados están en coincidencia con numerosos reportes sobre la asociación de las enfermedades diarreicas con la estacionalidad (Santosham *et al.*, 1995; Kovatz *et al.*, 2004; Tam *et al.*, 2006; Fisman *et al.*, 2007; Naumova *et al.*, 2007; Chaikaew *et al.*, 2009; Hall *et al.*, 2011b; Pardhan-Ali *et al.*, 2012; Alexander *et al.*, 2013; Kotloff *et al.*, 2013; Azage *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2015). Por ejemplo, en 2018, Ghazani *et al.* examinaron la relación

entre las enfermedades gastrointestinales y las variables climáticas en Escocia, Australia, Japón, Suiza, Estados Unidos, Micronesia, Vietnam y China. Los autores hallaron un aumento de la incidencia de diarrea bacteriana con el incremento de la temperatura, mientras que la humedad relativa y las precipitaciones mostraron resultados variables frente a dicho cuadro. De igual modo, dos estudios realizados en Irán y China señalaron que la mayor incidencia de casos fue hallada en verano y otoño, asociada significativamente a variables climáticas (Tang *et al.*, 2014; Aminharati *et al.*, 2017). En Japón, Ozonuka y Hagihara (2015) estudiaron la relación entre la morbilidad por gastroenteritis infecciosa y factores climáticos. Los autores analizaron alrededor de 13 millones de casos durante diez años y señalaron que el impacto de la temperatura ambiental sobre la diarrea infecciosa puede ser modificado por numerosos factores socioeconómicos, ambientales, geográficos y de comportamiento humano.

Los niños con diarrea infecciosa causada por *Shigella* spp. fueron hallados en las estaciones más cálidas. La mayoría de los estudios han indicado que las infecciones entéricas por *Shigella* spp. presenta un patrón estacional. Al respecto, en China, Zhao *et al.* (2016) realizaron un estudio ecológico para analizar la incidencia de shigelosis en relación al clima semiárido de la región. Los autores hallaron un incremento de casos en la estación cálida, con una asociación positiva a la temperatura y humedad, e inversamente proporcional a la intensidad y duración de la radiación solar. En Túnez, Al-Gallas *et al.* (2007) investigaron las diarreas agudas causadas por *Shigella* spp. en niños menores de 15 años y reportaron un pico de estacionalidad asociado al período estival. Similares resultados fueron publicados por Shah *et al.* (2010) en Kenia. En dicho estudio, los autores demostraron que la mayor presencia de diarrea por *Shigella* spp. en niños atendidos en hospital fue detectada durante la estación cálida y seca. Por el contrario, un estudio sobre patrones temporales asociados con shigelosis en Vietnam señaló que la estacionalidad de dicho patógeno fue heterogénea según el área estudiada. En varias regiones, la bacteria fue hallada con frecuencias similares durante todo el período, mientras que, en otras regiones, *Shigella* spp.

mostró un perfil estacional con predominio de casos en los meses cálidos con abundantes precipitaciones (Kelly-Hope *et al.*, 2008)

En Argentina, los reportes oficiales sobre casos positivos de diarrea por *Shigella* spp. informaron que dicho patógeno fue notificado durante todo el año, con un patrón estacional más marcado en el período estival (MSAL 2012). De igual modo, Giugno y Oderiz (2010) estudiaron los cuadros de shigelosis en niños que se atendieron en un hospital de La Plata. Los autores informaron la presencia de dicho cuadro durante todo el año, con mayor presencia en verano y otoño.

La infección con STEC fue hallada solamente en verano. Estos hallazgos son concordantes con la bibliografía. Por ejemplo, estudios realizados en Holanda, Inglaterra, Canadá y Estados Unidos informaron el aumento de casos de infección con dicha bacteria en el período estival (van Duynhoven *et al.*, 2008; Lal *et al.*, 2012; Germinario *et al.*, 2016; Philipsborn *et al.*, 2016). Asimismo, en Nigeria, la mayor frecuencia de infecciones por STEC estuvo asociada a la estación seca y cálida (Onanuga *et al.*, 2014). En Italia, Acquaotta *et al.* (2017) investigaron la relación de factores climáticos con la frecuencia de STEC. El estudio puso de relieve una estrecha correlación temporal entre la infección por dicha bacteria y el número, la duración y la frecuencia de las olas de calor.

Las infecciones por Rotavirus presentaron un perfil estacional restringido a la época primaveral. La evidencia publicada ha señalado que las infecciones por dicho virus son más frecuentes en las estaciones frías y con baja humedad (Nitiema *et al.*, 2011; Montenegro *et al.*, 2014; Eze *et al.*, 2014; Gazhani *et al.*, 2018). En Asia del Sur, Jagai *et al.* (2012) estudiaron la influencia de la temperatura en la incidencia del rotavirus. Los autores mostraron que el descenso en la temperatura anual y las precipitaciones aumentan la frecuencia de infección por Rotavirus. En Bangladesh, Hasan *et al.* (2018) exploraron la distribución temporal de las diarreas por Rotavirus mediante la recolección de datos de registros hospitalarios. Los autores concluyeron que el ciclo viral estuvo fuertemente influenciado por el clima seco y frío. En Gran Bretaña, Atchison *et al.* (2010)

indagaron la dependencia de la temperatura con la infección de dicho virus, señalando que el aumento de temperatura ambiental produjo una disminución de la tasa de infección. Un resultado similar se encontró en Australia donde las admisiones de diarrea por Rotavirus se asociaron con temperaturas más bajas y menor humedad (D'Souza *et al.*, 2008).

Todos los casos de diarrea por Rotavirus se observaron en primavera, mostrando un corrimiento del pico de estacionalidad respecto a la era prevacunal (época invernal). La marcada estacionalidad observada en los niños con rotavirus fue reportada por investigaciones de diversos países. En Argentina, dos estudios recientes reportaron el corrimiento del pico de estacionalidad viral en la población pediátrica luego de la introducción de la vacuna contra Rotavirus (Areso *et al.*, 2018; Treviño *et al.*, 2018). De modo similar, estudios realizados en Estados Unidos señalaron el corrimiento en la incidencia de dicha infección luego de la introducción de la vacuna obligatoria y demostraron un retraso temporal de varias semanas en la aparición de las diarreas por Rotavirus, hallándose una mayor frecuencia de casos en primavera (Tobías *et al.*, 2015).

Las infecciones por *Cryptosporidium* spp. y *Blastocystis* spp. fueron detectadas en estaciones más cálidas, mientras que *G. intestinalis* fue identificada en invierno y primavera. Las diferencias en la estacionalidad de los tres protozoos pudieron deberse a factores parasitarios y ambientales. Al respecto, Cherrie *et al.* (2018) estudiaron la relación de los patógenos entéricos con variables climáticas y señalaron que las diarreas causadas por *Cryptosporidium* spp. y *G. intestinalis* mostraron una asociación positiva con la humedad relativa, mientras que en el caso de *Blastocystis* spp., la infección estuvo relacionada con la temperatura ambiental. Más aún, en China, Zhang *et al.* (2016) realizaron un estudio de casos y controles sobre protozoos entéricos y estacionalidad de diarreas agudas en pacientes de cuatro hospitales centinela. Los autores reportaron la infección intestinal con *Cryptosporidium* spp. en la estación húmeda, mientras que la diarrea por *Blastocystis* spp. fue observada en ambas estaciones climáticas.

En 2009, Jagai *et al.* examinaron los patrones estacionales de la criptosporidiosis. Los autores analizaron 60 estudios epidemiológicos y concluyeron que los aumentos en la temperatura y las precipitaciones fueron predictores positivos de la infección. Una revisión sistemática sobre enfermedades protozoarias fue realizada por Lal *et al.* (2012). Entre ellas, la criptosporidiosis mostró una estacionalidad definida, con predominio en primavera-verano en Nueva Zelanda y verano-otoño en Estados Unidos y Canadá (Naumova *et al.*, 2000; Callaghan *et al.*, 2009; Snel *et al.*, 2009). En Irlanda, Lake *et al.* (2009) observaron un aumento de casos de criptosporidiosis durante primavera y verano. En Túnez, Al-Gallas *et al.* (2007) investigaron las diarreas causadas por *G. intestinalis* en población menor de 15 años. Los autores reportaron un incremento de casos asociado a primavera y verano. Por el contrario, la giardiasis presentó un patrón menos definido, con un pico otoñal (Odoi *et al.*, 2003; Espelage *et al.*, 2010). A diferencia de los estudios antedichos, en India, Mukherjee *et al.* (2009) realizaron un estudio retrospectivo sobre diarrea por *G. intestinalis* y *Cryptosporidium* spp. basado en registros hospitalarios. Los patrones estacionales de ambos protozoos fueron diferentes, el primero presentó una frecuencia constante durante todo el año, mientras que el segundo mostró un pico estacional marcado durante el verano. De modo similar, en Burkina Faso, Nitiema *et al.* (2011) analizaron los cuadros de diarrea en niños menores de 5 años y hallaron un predominio de giardiasis en la estación lluviosa y cálida.

Los factores de riesgo de infección con *G. intestinalis* y *Cryptosporidium* spp. incluyen el tipo de suministro de agua y la natación en piscinas (Lake *et al.*, 2009). La transmisión por agua ha sido reportada en diversos estudios. En Estados Unidos, Shields *et al.* (2004) hallaron *G. intestinalis* y *Cryptosporidium* spp. en el 8% de las aguas recreacionales. Asimismo, en Canadá, Valcour *et al.* (2016) hallaron un incremento de casos de giardiasis en primavera. Los autores indicaron que la giardiasis no siguió el patrón clásico (verano-otoño) observado en otros estudios y que podría deberse a eventos climáticos extremos como inundaciones en la región estudiada (Odoi *et al.*, 2003; Mohamed *et al.*, 2014). En Argentina, los quistes parasitarios fueron hallados en aguas de consumo y ambientales (Basualdo *et al.*, 2000; Costamagna *et al.*, 2005; Molina 2009; Molina *et al.*, 2011).

Los patrones periódicos recurrentes indican una fuerte influencia ambiental directa sobre la epidemiología de los parásitos, tanto a nivel del reservorio como de las vías de transmisión y las interacciones entre patógenos y hospedadores (Singh *et al.*, 1995; Altizer *et al.*, 2006; D'Souza *et al.*, 2008; Febriani *et al.*, 2010). Entre los factores que pudieron influir en la asociación de diarrea y clima se mencionaron el tipo de patógeno, las temperaturas ambientales máximas y mínimas, la radiación solar, las precipitaciones, la latitud geográfica, el consumo de agua, las prácticas higiénicas, la permanencia en espacios cerrados, el hacinamiento, el grado de contaminación en los sistemas de suministro y distribución de alimentos, adaptación humana a las condiciones climáticas locales (Valcour *et al.*, 2002; Mathieu *et al.*, 2004; Kovatz *et al.*, 2004; Tam *et al.*, 2006; Hall *et al.*, 2011; Lal *et al.*, 2012; Ozonuka y Hagihara 2015; Carlton *et al.*, 2016; Ghazani *et al.*, 2018).

La diarrea persistente (DPE) ha sido definida como el cuadro diarreico que perdura entre dos y cuatro semanas (Shane *et al.*, 2017). En esta investigación, la frecuencia de DPE representó el 7% de todos los episodios de diarrea. En concordancia con dicho valor, la mayoría de los estudios realizados sobre DPE han comunicado frecuencias de presentación menores a 10% (Ketema *et al.*, 1997; Andrade *et al.*, 2000; Lima *et al.*, 2000; Bhutta 2006; Moyo *et al.*, 2007; Moore *et al.*, 2010; Schilling 2010; Islam *et al.*, 2018). Sin embargo, algunos autores han comunicado hasta 28% de DPE (Fraser *et al.*, 1998; Fagundes-Neto *et al.*, 2000; Moore *et al.*, 2011; Lamberti *et al.*, 2012).

En Tandil, ocho de cada diez niños con DPE tuvieron menos de 5 años. En particular, el grupo que integran los lactantes fue el que contribuyó con la mayor cantidad de casos y coincidió con diversos estudios sobre el tema (Bhan *et al.*, 1989; Fang *et al.*, 1994; Ketema *et al.*, 1997; Meremikwu *et al.*, 1997; Lima *et al.*, 2000; Moyo *et al.*, 2007; Kermani *et al.*, 2010; Moore *et al.*, 2010; Hebbelstrup Jensen *et al.*, 2017; Durairaj *et al.*, 2017).

En esta investigación, la frecuencia de infección entérica en niños con DPE fue cercana a 45%. Este resultado fue similar al publicado por Fagundes-Neto *et al.* (2000) en población pediátrica de Brasil. Diversos autores han mostrado a la infección intestinal en cuadros persistentes, con frecuencias que oscilaron entre 11% y 91% (Bhan *et al.*, 1989; Fang *et al.*, 1994; Lima *et al.*, 2000; Ochoa *et al.*, 2004; Mukhopadhyay *et al.*, 2007; Moyo *et al.*, 2007; Kermani *et al.*, 2010; Vithayasai *et al.*, 2014; Mahfuz *et al.*, 2017). Múltiples factores pueden haber contribuido a la variabilidad de los resultados entre los distintos estudios. Kermani *et al.* (2010) indicaron que las causas de la baja detección de patógenos en cuadros persistentes podrían ser la inclusión de pacientes con tratamiento antimicrobiano en curso, la imposibilidad de detección de *Campylobacter* spp. y *C. difficile*, o la presencia de DPE no infecciosas. Mahfuz *et al.* (2017) postularon que el porcentaje de DPE sin patógenos documentados puede estar asociado al algoritmo metodológico de diagnóstico utilizado que no contempló la detección de los patotipos DEC ni de virus entéricos. Asimismo, Bhan *et al.* (1989) señalaron que la menor frecuencia de positividad pudo deberse a la ausencia de pesquisa de ciertos patógenos como *Aeromonas* spp. o *Cryptosporidium* spp. De igual modo, Afset *et al.* (2003) indicaron que la frecuencia de patógenos en cuadros persistentes podría estar afectado por el sesgo de selección de los niños con diarrea que enviaron las heces para diagnóstico etiológico.

Los agentes infecciosos hallados en la población con DPE fueron EPEC, EAEC y *Blastocystis* spp. Numerosos investigadores han señalado que EPEC y EAEC constituyen los patógenos bacterianos más frecuentes en las infecciones entéricas persistentes, especialmente en la población infantil (Newman *et al.*, 1994; Sang *et al.*, 1997; Lima *et al.*, 2000; Fagundes-Neto *et al.*, 2000; Bhutta 2006; Afset *et al.*, 2004; Ochoa *et al.*, 2004; Nguyen *et al.*, 2006; Moyo *et al.*, 2007; Mor *et al.*, 2009; Pawlowski *et al.*, 2009; Abba *et al.*, 2009; Becker *et al.*, 2013).

En la última década, varios estudios de casos y controles han identificado a EPEC como una causa relevante de DPE en países en desarrollo (Andrade *et al.*, 1998; Donnenberg *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2015). La importancia de dicho patógeno en cuadros persistentes ha sido señalada en dos estudios sobre población pediátrica con diarrea de Brasil. El primero de ellos, un trabajo realizado por

Fagundes-Neto *et al.* (1995) demostró la persistencia del cuadro diarreico en la infección entérica con EPEC. De igual modo, el estudio publicado por de Andrade *et al.* (2011) señaló que una de cada tres infecciones por EPEC evolucionó a DPE, mientras que para otros patógenos intestinales, dicha progresión fue significativamente menor.

El patotipo EAEC ha sido señalado como patógeno frecuente de cuadros persistentes de diarrea (Steiner *et al.*, 1998; Ochoa *et al.*, 2004; Abba *et al.*, 2009; Becker *et al.*, 2013). En India, Bhan *et al.* (1989) informaron por primera vez la asociación entre la infección por EAEC y la enfermedad diarreica persistente en pediatría. En años posteriores, la relación entre dicho patotipo y la DPE ha sido comunicada en numerosos estudios (Cravioto *et al.*, 1991; Lima *et al.*, 1992; Chan *et al.*, 1994; Fang *et al.*, 1995; Sang *et al.*, 1997; Huppertz *et al.*, 1997; Geyid *et al.*, 1998; Cohen *et al.*, 2005; Araujo *et al.*, 2007; Guerrant *et al.*, 2008; Opintan *et al.*, 2010).

La presencia de *Blastocystis* spp. en población con cuadros persistentes de diarrea ha sido reportada en diversas revisiones sistemáticas (Bhutta 2006; Fletcher *et al.*, 2013a). En 2017, un estudio realizado en Brasil por Seguí *et al.* detectó que 41% de los niños escolares con DPE y dolor abdominal presentaban infección por *Blastocystis* spp. Más aún, dos estudios realizados en Irán y en Suecia, reportaron el aislamiento de dicho parásito en la población con cuadros persistentes (Svenungsson *et al.*, 2000; Kermani *et al.*, 2010). Sin embargo, el significado clínico de la infección por *Blastocystis* spp. aún es materia de debate (Del Coco *et al.*, 2017). Diversos estudios han sugerido una asociación entre el subtipo parasitario y la presentación clínica. Al respecto, una investigación realizada por Alfellani *et al.* (2013) reportó que los subtipos ST1 y ST3 fueron detectados con mayor frecuencia en infecciones persistentes y en individuos sintomáticos. Por el contrario, Roberts *et al.* (2014) hallaron una asociación significativa del ST2 con cuadros de diarrea. Estas diferencias ponen de relieve la necesidad de profundizar la investigación sobre la relación entre el subtipo parasitario y la presentación clínica de la infección.

En este estudio, siete de cada diez niños con diarrea fueron atendidos por guardia médica del hospital de Tandil. Este valor fue coincidente con los reportes

estadísticos de hospitales públicos de Río Negro, Misiones y Jujuy. Las estadísticas de salud de dichos nosocomios informaron que la atención médica por guardia hospitalaria pediátrica fue 41%, 58% y 65%, respectivamente. Más aún, la atención por guardia en niños menores de 5 años con diarrea alcanzó el 78% (Estadísticas Hospitalarias de Río Negro, Misiones y Jujuy). Por el contrario, frecuencias menores a 30% fueron reportados por hospitales municipales de la ciudad de Rosario al igual que en clínicas de medicina privada de Capital Federal (Estadísticas Hospitalarias de Rosario; ADEMP 2018).

La diarrea es una causa relevante de hospitalizaciones en pediatría. En esta investigación, tres de cada diez niños requirieron internación a causa del cuadro diarreico. Esta proporción fue similar para los cuadros agudos (37%) y persistentes (31%), siendo menor para niños con cuadros prolongados (19%). La frecuencia de hospitalización a causa del cuadro diarreico en niños atendidos en Tandil fue superior al promedio del país. En Argentina, la mayor carga de enfermedad por diarrea se produce en los niños menores de 5 años y genera entre 7% y 14% de las internaciones (Degiuseppe *et al.*, 2017). Por ejemplo, las estadísticas oficiales de dos importantes hospitales de Capital Federal, el Hospital de Niños Pedro de Elizalde y el Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez informaron frecuencias de hospitalización por cuadros de diarrea/gastroenteritis de presunto origen infeccioso entre 6% y 7% (Estadísticas Hospitalarias de Hospital Elizalde y Hospital Gutierrez). La frecuencia de hospitalización a causa del cuadro diarreico en niños atendidos en el hospital municipal de Tandil fue superior al promedio del país. La mayor demanda de internación de los niños con diarrea en el hospital DBV pudo estar basada en la consideración médica de los diversos factores de riesgo que predisponen a resultados desfavorables, como prematurez del niño con diarrea, edad joven de la madre, imposibilidad de seguimiento del paciente y otros factores sociales, económicos o culturales (Kosek *et al.*, 2003; Granado-Villar *et al.*, 2012; Lamberti *et al.*, 2012; Shane *et al.*, 2017).

En esta tesis, los tres agentes etiológicos hallados en DPE fueron EPEC, EAEC y *Blastocystis* spp. Estos patógenos pueden transmitirse por la vía fecal oral mediante el consumo de alimentos y agua contaminados con desechos fecales,

el contacto con animales o la higiene inadecuada (Huang *et al.*, 2006; Onozuka y Hashizume, 2011; Ghazani *et al.*, 2018). Sin embargo, la investigación en salud pública, y en particular, la vigilancia epidemiológica de las diarreas, requiere considerar los contextos espaciales y temporales de la infección (Parkes *et al.*, 2003; Hunter *et al.*, 2005; Eisenberg *et al.*, 2007). Por lo tanto, desde una perspectiva geoespacial, los niños tandilenses con DPE exhibieron un patrón geográfico disperso, en forma de casos de diarrea aislados y sin evidencia de áreas de alta densidad (*hotspots*). Con respecto a la estacionalidad, en esta tesis, la mayor frecuencia de casos de DPE se observó durante la estación cálida y fue coincidente con el incremento de casos totales de diarrea. El incremento de cuadros agudos y persistentes durante el período estival ha sido concordante con lo reportado por diversos autores (Ahmed *et al.*, 2009; Strand *et al.*, 2012).

5. Conclusiones

El presente trabajo de tesis permitió demostrar:

- ✓ La existencia de cuadros agudos, prolongados y persistentes en los niños con diarrea de Tandil.
- ✓ Los niños menores de 5 años representaron la población prevalente en cuadros de diarrea atendidos en el Hospital Debilio Blanco Villegas.
- ✓ La frecuencia de casos positivos de diarrea y la edad del niño con el cuadro diarreico presentaron una asociación significativa.
- ✓ Los patógenos bacterianos hallados fueron *Escherichia coli* diarreigénica (DEC), *S. flexneri*, *S. sonnei* y *S. entérica* (no tifoidea).
- ✓ Los patógenos bacterianos fueron prevalentes en los cuadros de diarrea independientemente de la duración temporal del cuadro clínico.
- ✓ La inclusión de métodos moleculares en el estudio de cuadros diarreicos permitió incrementar la frecuencia de detección de patógenos y la identificación de cuatro patotipos de *Escherichia coli* diarreigénica: EPEC, EAEC, ETEC y STEC.
- ✓ El patógeno aislado con mayor frecuencia fue EPEC.
- ✓ Se aislaron tres niños con STEC, dos de ellos, con cuadros agudos causados por el serotipo O157:H7 y el tercero, con diarrea prolongada que involucró el serotipo O145:H28.
- ✓ La mayor tasa de detección de Rotavirus estuvo asociada a niños en edad preescolar y la infección estuvo ausente en lactantes menores. Asimismo, todos los casos de diarrea por dicho virus se observaron en las semanas epidemiológicas 42 a 47, correspondientes a la primavera.
- ✓ Las diarreas parasitarias fueron causadas por los protozoos entéricos *G. intestinalis*, *Cryptosporidium* spp y *Blastocystis* spp. No se hallaron helmintos intestinales en los niños con diarrea.
- ✓ Los niños con diarrea de Tandil presentaron una distribución espacial en conglomerados con marcado predominio geográfico de casos en la región periférica de la ciudad.

- ✓ Los agentes etiológicos de diarrea presentaron perfiles temporales diferentes durante el período del estudio. Los patógenos EPEC, ETEC, EAEC y *S. enterica* fueron hallados durante todo el año, mientras que el resto de los patógenos mostraron una estacionalidad diversa.
- ✓ La frecuencia de diarrea persistente (DPE) alcanzó 7% de la población estudiada y ocho de cada diez niños tuvieron menos de 5 años.
- ✓ La frecuencia de infección entérica en cuadros de DPE alcanzó 45% y los patógenos hallados fueron EPEC, EAEC y *Blastocystis* spp.
- ✓ Los cuadros de DPE se distribuyeron en forma aleatoria en la ciudad de Tandil, demostrando la relevancia de diversos factores, personales y clínicos y señalando la relativa independencia de dicho cuadro frente a factores de tipo ambiental.

Esta investigación constituye el primer estudio sobre la etiología infecciosa de la diarrea persistente en Argentina. En este trabajo se demuestra la presencia de dicho cuadro clínico en la población pediátrica con diarrea y la existencia de EPEC, EAEC y *Blastocystis* spp., como patógenos entéricos relacionados con los cuadros diarreicos persistentes.

La aplicación de métodos moleculares constituye una herramienta valiosa en el estudio de las diarreas en pediatría. Este estudio es el primero que ha detectado los factores de virulencia de aislamientos diarreigénicos *de E. coli* en la población pediátrica con diarrea que se atiende en el HDBV de Tandil.

Por último, la aplicación de un enfoque espacial y temporal en las diarreas pediátricas permitió la detección de áreas con alta densidad de episodios y el conocimiento de la distribución geográfica de las poblaciones vulnerables a los patógenos entéricos en la ciudad de Tandil.

Bibliografía

- Abba K, Sinfield R, Hart C, Garner P. Pathogens associated with persistent diarrhoea in children in low- and middle-income countries: systematic review. *BMC Infect Dis.* 2009; 9: 88-103.
- Abbasi P, Kargar M, Doosti A, Mardaneh J, Ghorbani-Dalini S, Dehyadegari M. Characterization of Shiga-toxin producing *E. coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) using multiplex Real-Time PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*. *Iran J Microbiol.* 2014; 6(3): 169-74.
- Acquaotta F, Ardissino G, Fratianni S, Perrone M. Role of climate in the spread of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection among children. *Int J Biometeorol.* 2017; 61(9): 1647-55.
- Adamu H, Endeshaw T, Teka T, Kifle A, Petros B. The prevalence of intestinal parasites in pediatric diarrheal and non-diarrheal patients in Addis Ababa Hospitals, with special emphasis on opportunistic parasitic infections and with insight into the demographic and socio-economic factors. *The Ethiop J Health Develop.* 2006; 20(1): 45-52.
- Adane M, Mengistie B, Kloos H, Medhin G, Mulat W. Sanitation facilities, hygienic conditions, and prevalence of acute diarrhea among under-five children in slums of Addis Ababa, Ethiopia: Baseline survey of a longitudinal study. *PLoS One.* 2017; 12(8): e0182783.
- ADEMP. Estadísticas: Informe de auditores. *Rev ADEMP* 2018, 140: 16-19. http://www.ademp.com.ar/revistas/pdf_revistas/ademp140.pdf
- Adnan I, Hindi A, Aboud E. Occurrence of gastrointestinal parasites among preschool children, Gaza, Palestine. *J Islam Univ.* 2008; 16(1): 125-30.
- Afema JA, Byarugaba DK, Shah DH, Atukwase E, Nambi M, Sicho WM. Potential Sources and Transmission of *Salmonella* and Antimicrobial Resistance in Kampala, Uganda. *PLoS ONE.* 2016; 11(3): e0152130.
- Afset J, Bevanger L, Romundstad P, Bergh K. Association of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* with prolonged diarrhoea. *J Med Microbiol.* 2004; 53: 1137-44.

- Afset JE, Bergh K, Bevanger L. High prevalence of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in Norwegian children with diarrhoea. *J Med Microbiol.* 2003; 52: 1015-9.
- Ahmed F, Ansaruzzaman M, Haque E, Rao MR, Clemens JD. Epidemiology of postshigellosis persistent diarrhea in young children. *Pediatr Infect Dis J.* 2001; 20(5): 525-30.
- Ahmed F, Farheen A, Ali I, Thakur M, Muzaffar A, Samina M. Management of Diarrhea in Under-fives at Home and Health Facilities in Kashmir. *Int J Health Sci (Qassim).* 2009; 3(2): 171-5.
- Ahmed T, Begum B, Badiuzzaman, Ali M, Fuchs G. Management of severe malnutrition and diarrhea. *Indian J Pediatr.* 2001; 68(1): 45-51.
- Alam NH, Faruque AS, Dewan N, Sarker SA, Fuchs GJ. Characteristics of children hospitalized with severe dehydration and persistent diarrhoea in Bangladesh. *J Health Popul Nutr.* 2001; 19(1): 18-24.
- Albert MJ, Faruque AS, Faruque SM, Sack RB, Mahalanabis D. Case-control study of enteropathogens associated with childhood diarrhea in Dhaka, Bangladesh. *J Clin Microbiol.* 1999; 37: 3458-64.
- Alegria I, Ramos JM. Intestinal parasites among children with diarrhea younger than 5 years of age in rural Ethiopia. *The Pediatr Infect Dis J.* 2015; 34(2): 226-7.
- Alexander KA, Carzolio M, Goodin D, Vance E. Climate change is likely to worsen the public health threat of diarrheal disease in Botswana. *Int J Environ Res Public Health.* 2013; 10(4): 1202-30.
- Alfellani MA, Stensvold CR, Vidal-Lapiedra A, Onuoha ES, Fagbenro-Beyioku AF, Clark CG. Variable geographic distribution of *Blastocystis* subtypes and its potential implications. *Acta Trop.* 2013; 126(1): 11-8.
- Al-Gallas N, Bahri O, Bouratbeen A, Ben Haasen A, Ben Aissa R. Etiology of Acute Diarrhea in Children and Adults in Tunis, Tunisia, with Emphasis on Diarrheagenic *Escherichia coli*. Prevalence, Phenotyping, and Molecular Epidemiology. *Am J Trop Med Hyg.* 2007; 77(3): 571-82.

- Ali MM, Mohamed ZK, Klena JD, Ahmed SF, Moussa TA, Ghenghesh KS. Molecular Characterization of Diarrheogenic *Escherichia coli* from Libya. *Am J Trop Med Hyg.* 2012; 86(5): 866-71.
- Altizer S, Dobson A, Hosseini P, Hudson P, Pascual M, Rohani P. Seasonality and the dynamics of infectious diseases. *Ecology Letters.* 2006; 9: 467-84.
- Amaral MS, Estevam GK, Penatti M, Lafontaine R, Lima IC, Spada PK, Gabbay YB, Matos NB. The prevalence of norovirus, astrovirus and adenovirus infections among hospitalised children with acute gastroenteritis in Porto Velho, state of Rondonia, western Brazilian Amazon. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015; 110(2): 215-21.
- Aminharati F, Soltan Dallal M, Ehrampoush M, Dehghani-Tafti A, Yaseri M, Memariani M, Rajabi Z. The effect of environmental parameters on the incidence of *Shigella* outbreaks in Yazd province, Iran. *Water Sci Technol.* 2017; 18(4): 1388-95.
- Aminshahidi M, Arastehfar A, Pouladfar G, Arman E, Fani F. Diarrheogenic *Escherichia coli* and *Shigella* with high rate of extended-spectrum beta-lactamase production: two predominant etiological agents of acute diarrhea in shiraz, Iran. *Microb Drug Resist.* 2017; 23(8): 1037-44.
- Anandan S, Muthuirulandi Sethuvel DP, Gajendiren R, Verghese VP, Walia K, Veeraraghavan B. Molecular characterization of antimicrobial resistance in clinical *Shigella* isolates during 2014 and 2015: trends in South India. *Germs.* 2017; 7: 115-22.
- Andersson M, Kabayiza J, Elfving K, Nilsson S, Msellem M, Mårtensson A, Björkman A, Bergström T, Lindh M. Coinfection with Enteric Pathogens in East African Children with Acute Gastroenteritis. Associations and Interpretations. *Am J Trop Med Hyg.* 2018; 98(6): 1566-70.
- Andrade J, Moreira C, Fagundes-Neto U. Persistent diarrhea. *J Pediatr (Rio J)* 2000; 76 (Supl): S119-26.
- Andrade JA, Gomes T, Fagundes Neto U. Letalidade em lactentes hospitalizados com diarreia persistente: fatores de risco associados ao óbito. *Arq Gastroenterol.* 1998; 35: 62-8.

- Anthony R, Rutitzky L, Urban JF J, Stadecker M, Gause W. Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nat Rev Immunol*. 2007; 7(12): 975-87.
- Anvikar A, Dolla C, Dutta S, Rao V, Gadge VS, Shukla GP, Rao S, Karforma C. Role of *Escherichia coli* in acute diarrhoea in tribal preschool children of central India. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 2008, 22: 40-6.
- Anvikar AR, Dolla C, Dutta S, Rao VG, Gadge VS, Shukla GP, Rao S, Karforma C. Role of *Escherichia coli* in acute diarrhoea in tribal preschool children of central India. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 2008; 22(1): 40-6.
- Aramayo CF, Gil JF, Cruz MC, Poma HR, Last MS, Rajal VB. Diarrhea and parasitosis in Salta, Argentina. *J Infect Develop Ctries*. 2009; 3(2):105-11.
- Araujo JM, Tabarelli GF, Aranda K, Fabbriotti SH, Fagundes-Neto U, Mendes CM, Scaletsky IC. Typical enteroaggregative and atypical enteropathogenic types of *Escherichia coli* are the most prevalent diarrhea-associated pathotypes among Brazilian children. *J Clin Microbiol*. 2007; 45: 3396-99.
- Areso MS, Pedernera MC, Juárez M, Stupka J, Degiuseppe J, Gentile A. Impacto de la vacunación para Rotavirus: ¿cuál es el rol de los Calicivirus humanos? *Rev. Hosp. Niños (B. Aires)*. 2018; 60(268): 90-5.
- Aro C, Ochoteco M, Zurbriggen M, Blesa M, Theill L, Nepote A, Mayoral C, Baroni M. Diarreas bacterianas: estudio retrospectivo en el hospital de niños "Dr Orlando Alassia" de la ciudad de Santa Fe. 15º Encuentro Nacional de Investigación Pediátrica. Resumen O23. 2013. Jujuy, Argentina
- Artis D, Grecis RK. The intestinal epithelium: sensors to effectors in nematode infection. *Nature*. 2008; 1(4): 252-64.
- Ashida H, Toyotome T, Nagai T, Sasakawa C. *Shigella* chromosomal IpaH proteins are secreted via the type III secretion system and act as effectors. *Mol Microbiol*. 2007; 63(3): 680-93.
- Atchison CJ, Tam CC, Hajat S, Van Pelt W, Cowden JM, Lopman BA. Temperature-dependent transmission of rotavirus in Great Britain and The Netherlands. *Proceed Royal Soc B*. 2010; 277: 933-42.
- Azage M, Kumie A, Worku A, Bagtzoglou AC. Childhood Diarrhea Exhibits Spatiotemporal Variation in Northwest Ethiopia: A SaTScan Spatial Statistical Analysis. *PLoS ONE*. 2015; 10(12): e0144690.

- Baca C, Yupanqui L, Canales J, Zamudio M, Quispe M, Tamariz J. Serotipos y susceptibilidad antimicrobiana de *Shigella* aisladas en un instituto de salud pediátrico de Lima, Perú, enero y julio 2013. Rev Med Hered. 2014; 25: 73-9.
- Bai X, Mernelius S, Jernberg C, Einemo I, Monecke S, Ehricht R, Löfgren S, Matussek A. Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infection in Jönköping County, Sweden: Occurrence and Molecular Characteristics in Correlation With Clinical Symptoms and Duration of stx Shedding. Front Cell Infect Microbiol. 2018; 8: 125-33.
- Bajuk M, Serruto G, Acevedo F, Barrangú E, Carnevale C, Zaracho J, Zarate M. Susceptibilidad Antimicrobiana en aislados de *Salmonella* spp y *Shigella* spp en un Centro de Buenos Aires. XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología. Resumen 0053. 2016. Santa Fe, Argentina.
- Balbachan S, Merino L, Merino D, Balbachan M, Miranda O. Resistencia antimicrobiana de bacterias causantes de diarreas en niños de Corrientes, Argentina. Rev Cubana Med Trop. 2007; 59(3): 213-7.
- Banda Noriega R, Ruiz A, Barranquero R, Díaz A, Miguel E, Rodríguez C. Caracterización de cargas contaminantes generadas en Tandil y su implicancia en el recurso hídrico. Buenos Aires, Argentina. II Congreso Internacional sobre gestión y tratamiento integral del agua. Resumen 451. 2008. Córdoba, Argentina.
- Banda Noriega, Díaz A. Estimación de Cargas Contaminantes del Arroyo Langueyú. Tandil. Buenos Aires. Ciencia. 2010; 5(20): 157. Disponible en <http://www.exactas.unca.edu.ar/revista/v200/pdf/ciencia20-12.pdf>
- Barranquero RS. Análisis hidrogeológico y evaluación de cargas contaminantes en la cuenca del arroyo Langueyú. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de La Pampa. La Pampa. 2009
- Bartelt LA, Lima AAM, Kosek M, Peñataro Yori P, Lee G, Guerrant RL. Barriers to Child Development and Human Potential: The Case for Including the Neglected Enteric Protozoa (NEP) and Other Enteropathy-Associated Pathogens in the NTDs. PLoS Negl Trop Dis. 2013; 7(4): e2125.

- Basualdo J, Cordoba A, De Luca M, Ciarmela M, Pezzani B, Minvielle M. Intestinal parasitoses and environmental factors in a rural population of Argentina. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2007; 49: 251-5.
- Basualdo J, Molina N, Grenóvero S, De Gracia L, Bertucci E. Prevalencia, frecuencia y quimioterapia preventiva de los geohelminetos. ¿Denuncia obligatoria? Simposio: Situación epidemiológica de las Geohelmintiasis en la Argentina: problemas, avances y desafíos. VII Congreso Argentino de Parasitología. 2015. Bariloche, Argentina.
- Basualdo J, Pezzani B, De Luca M, Córdoba A, Apezteguía M. Screening of the municipal water system of La Plata, Argentina, for human intestinal parasites. *Int J Hyg Environ Health*. 2000; 203: 177-82.
- Basualdo JA, Grenóvero MS, Bertucci, E, Molina NB. Bibliometric analysis of scientific literature on intestinal parasites in Argentina during the period 1985-2014. *Rev Arg Microbiol*. 2016; 48(2): 171-9.
- Becker S, Vogt J, Knopp S, Panning M, Warhurst D, Polman K, Marti H, von Müller L, Yansouni C, Jacobs J, Bottieau E, Sacko M, Rijal S, Meyanti F, Miles M, Boelaert M, Lutumba P, van Lieshout L, N'Goran E, Chappuis F, Utzinger J. Persistent digestive disorders in the tropics: causative infectious pathogens and reference diagnostic tests. *BMC Infect Dis*. 2013; 13: 37-58.
- Becker-Dreps S, Bucardo F, Vilchez S, Zambrana LE, Liu L, Weber D, Pena R, Barclay L, Vinje J, Hudgens M, Nordgren J, Svensson L, Morgan D, Espinoza F, Paniagua M. Etiology of childhood diarrhea after rotavirus vaccine introduction: a prospective, population based study in Nicaragua. *Pediatr Infect Dis J*. 2014; 33(11): 1156-63.
- Bellido Blasco JB. Epidemiología de las gastroenteritis agudas víricas. Aspectos Actuales. Ed: EMISA. España. 2007
- Berendes D, Kirby A, Clennon J, Agbemabiese C, Ampofo J, Armah G, Baker K, Liu P, Reese H, Robb K, Wellington N, Yakubu H, Moe C. Urban sanitation coverage and environmental fecal contamination: Links between the household and public environments of Accra. *PLoS ONE*. 2018; 13: e0199304.
- Bernaola G, Bada C, Carreazo N, Rojas R. Probiotics for treating persistent diarrhoea in children. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013; 8: CD007401.

- Bernier C, Gounon P, Bouguenec CL. Identification of an aggregative adhesion fimbria (AAF) type III-encoding operon in enteroaggregative *Escherichia coli* as a sensitive probe for detecting the AAF-encoding operon family. *Infect Immun*. 2002; 70: 4302-11.
- Beutin L, Krause G, Zimmermann S, Kaulfuss S, Gleier K. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period. *J Clin Microbiol*. 2004; 42(3):1099-108.
- Beutin L, Miko A, Krause G, Pries K, Haby S, Steege K, Albrecht N. Identification of human-pathogenic strains of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from food by a combination of serotyping and molecular typing of Shiga toxin genes. *Appl Environ Microbiol*. 2007; 73(15): 4769-75.
- Beyene H, Deressa W, Kumie A, Grace D. Spatial, temporal, and spatiotemporal analysis of under-five diarrhea in Southern Ethiopia. *Trop Med Health*. 2018; 46: 18-30.
- Bhan MK, Bhandari N, Sazawal S, Clemens J, Raj P, Levine MM, Kaper JB. Descriptive epidemiology of persistent diarrhoea among young children in rural northern India. *Bull WHO*. 1989; 67: 281-8.
- Bhutta Z. Persistent Diarrhea in Developing Countries. *Ann Nestle* 2006; 64: 39-48.
- Bielaszewska M, Mellmann A, Zhang W, Köck R, Fruth A, Bauwens A, Peters G, Karch H. Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. *Lancet Infect Dis*. 2011; 11: 671-6.
- Binsztein N, Jouve M, Viboud G, Lopez Moral L Rivas M, Orskov I, Ahren C, Svennerholm A. Colonization factors of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from children with diarrhea in Argentina. *J Clin Microbiol*. 1991; 29: 1893-8.
- Birkhead G, Vogt R. Epidemiologic surveillance for endemic *Giardia lamblia* infection in Vermont the roles of waterborne and person-to-person transmission. *Am J Epidemiol* 1989; 129(4): 762-8.
- Black RE. Persistent diarrhea in children of developing countries. *Pediatr Infect Dis J*. 1993; 12: 751-61.

- Blake MR, Raker JM, Whelan K. Validity and reliability of the Bristol Stool Form Scale in healthy adults and patients with diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther.* 2016; 44: 693-703.
- Blanco M, Blanco JE, Dahbi G, Alonso MP, Mora A, Coira MA, Madrid C, Juárez A, Bernárdez MI, González EA, Blanco J. Identification of two new intimin types in atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Int Microbiol.* 2006; 9: 103-10.
- Bogale GG, Gelaye KA, Degefie DT, Gelaw YA. Spatial patterns of childhood diarrhea in Ethiopia: data from Ethiopian demographic and health surveys (2000, 2005, and 2011). *BMC Infect Dis.* 2017; 17(1): 426-35.
- Borda E, Rea M, Rosa J, Maidana C. Parasitismo intestinal en San Cayetano, Corrientes, Argentina. *Bol Oficina Sanit Panam.* 1996; 120: 110-6.
- Brandt KG, Antunes MM, Alves Pontes da Silva G. Acute diarrhea: evidence-based management. *J Pediatr (Rio J).* 2015; 91(Suppl 1): S36-43.
- Bruzzese E, Giannattasio A, Guarino A. Antibiotic treatment of acute gastroenteritis in children. *F1000Res.* 2018; 7: 193-203.
- Bryce J, Boschi-Pinto C, Shibuya K, Black RE; WHO Child Health Epidemiology Reference Group. WHO estimates of the causes of death in children. *Lancet.* 2005; 365(9465): 1147-52.
- Brzuszkiewicz E, Thürmer A, Schuldes J, Leimbach A, Liesegang H, Meyer F-D, Boelter J, Petersen H, Gottschalk G, Daniel R. Genome sequence analyses of two isolates from the recent *Escherichia coli* outbreak in Germany reveal the emergence of a new pathotype: entero-aggregative-haemorrhagic *Escherichia coli* (EAHEC). *Arch. Microbiol.* 2011; 193: 883-91.
- Bundy D, Hall A, Medley G, Savioli L. Evaluating measures to control intestinal parasitic infections. *Rapp trim statist sanit mond.* 1992; 45: 168-80.
- Buzai G, Ruiz E. Geotecnósfera. Tecnologías de la información geográfica en el contexto global del sistema mundo. *Geogr Cult Educ.* 2012; 4: 6068-77.
- Caffer MI, Terragno R. Manual de procedimientos para la caracterización de *Salmonella*. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, INEI, ANLIS. Buenos Aires, Argentina. 2001.

- Callaghan M, Cormican M, Prendergast M, Pelly H, Cloughley R, Hanahoe B, O'Donovan D. Temporal and spatial distribution of human cryptosporidiosis in the west of Ireland 2004–2007. *Int J Health Geogr.* 2009; 8: 64-73.
- Campo Polanco L, Gutiérrez L, Cardona Arias. Infección por *Strongyloidesstercoralis*. metanálisis sobre evaluación de métodos diagnósticos convencionales (1980-2013). *Rev Esp Salud Pública.* 2014; 88(5): 581-600.
- Campos LC, Franzolin MR, Trabulsi LR. Diarrheagenic *Escherichia coli* Categories among the Traditional Enteropathogenic *E. coli* O Serogroups - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004; 99: 545-52.
- Canata MG, Navarro R, Velázquez G, Rivelli S, Rodríguez F, Céspedes A, Espínola C, Canese J, Guillén R. Caracterización molecular de factores de virulencia de aislados *Escherichia coli* obtenidas de heces de niños con gastroenteritis del Hospital Central de Instituto de Previsión Social en 2012. *Pediatría (Asunción).* 2016; 43(1): 13-17.
- Canizalez-Roman A, Flores-Villaseñor HM, Gonzalez-Nuñez E, Velazquez-Roman J, Vidal JE, Muro-Amador S, Alapizco-Castro G, Díaz-Quiñonez JA and León-Sicairos N. Surveillance of Diarrheagenic *Escherichia coli* Strains Isolated from Diarrhea Cases from Children, Adults and Elderly at Northwest of Mexico. *Front Microbiol.* 2016; 7: 1924-35.
- Carbonari CC, Deza N, Flores M, Gasparini A, Manfredi E, Rivas M. First isolation of enteroaggregative *Escherichia coli* O104:H4 from a diarrhea case in Argentina. *Rev Argent Microbiol.* 2014; 46(4): 302-306
- Carlton EJ, Woster AP, DeWitt P, Goldstein RS, Levy K. A systematic review and meta-analysis of ambient temperature and diarrhoeal diseases. *Int J Epidemiol.* 2016; 45(1): 117-30.
- Carreazo NY, Ugarte K, Huicho L. Leucocitos Fecales en Niños con Diarrea Aguda: ¿Momento de Reconsiderar la Utilidad Clínica de la Prueba? *Rev Gastroenterol Perú.* 2011; 31: 216-23.
- Casabonne C, González A, Aquili V, Balagué C. Prevalence and virulence factors of *Shigella* spp. isolated from patients with diarrhea in Rosario, Argentina. *Jpn J Infect Dis.* 2016; 69: 477-81.

- Cermeño J, Hernandez I, Camaripano M, Medina N, Guevara A, Hernandez C. Etiología de diarrea aguda en niños menores de 5 años, Ciudad Bolívar, Venezuela. *Rev Soc Ven Microbiol*. 2008; 28(1): 1-7.
- Chaikaew N, Tripathi NK, Souris M. Exploring spatial patterns and hotspots of diarrhea in Chiang Mai, Thailand. *Int J Health Geographics*. 2009; 8: 36-47.
- Chammartin F, Scholte RG, Guimarães LH, Tanner M, Utzinger J, Vounatsou P. Soil-transmitted helminth infection in South America: a systematic review and geostatistical meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2013; 13(6): 507-18.
- Chan KN, Phillips AD, Knutton S, Smith H, Walker-Smith J. Enterocolitis: *Escherichia coli*: another cause of acute and chronic diarrhoea in England? *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1994; 18: 87-91.
- Chang C, Chen P, Huang F. Epidemiology of diarrhea among young children: a questionnaire-based study in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect*. 2009; 42: 265-70.
- Chen S, Ni Y, Chen H, Chang M. Microbial etiology of acute gastroenteritis in hospitalized children in Taiwan. *J Formos Med Assoc*. 2006; 105(12): 964-70.
- Cherrie MP, Nichols G, Iacono GL, Sarran C, Hajat S, Fleming LE. Pathogen seasonality and links with weather in England and Wales: a big data time series analysis. *BMC Public Health*. 2018; 18: 1067-80.
- Chiappini E, Galli L, Pecile P, Vierucci A, de Martino M. Results of a 5-year prospective surveillance study of antibiotic resistance among *Salmonella enterica* isolates and ceftriaxone therapy among children hospitalized for acute diarrhea. *Clin Therapeutics*. 2002; 24(10): 1585-94.
- Chiyangi H, Muma JB, Malama S, Manyahi J, Abade A, Kwenda G, Matee MI. Identification and antimicrobial resistance patterns of bacterial enteropathogens from children aged 0-59 months at the University Teaching Hospital, Lusaka, Zambia: a prospective cross sectional study. *BMC Infect Dis*. 2017; 17(1): 117-26.
- Christopher P, David K, John S, Sankarapandian V. Antibiotic therapy for *Shigella* dysentery. *Cochrane Datab System Rev*. 2010, Issue 8: CD006784.
- Chung N, Wang S, Shen C, Kuo F, Ho T, Hsiung C, Mu J, Wu F, Huang L, Huang YC, Huang Y, Chi H, Lin HC, Liu C; Taiwan Pediatric Infectious Disease Alliance.

- Clinical and epidemiological characteristics in hospitalized young children with acute gastroenteritis in southern Taiwan: According to major pathogens. *J Microbiol Immunol Infect.* 2017; 50: 915-22.
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI: Wayne, PA. 2015. Disponible en www.clsi.org
- Cohen MB, Nataro JP, Bernstein DI, Hawkins J, Roberts N, Staat MA. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in acute childhood enteritis: a prospective controlled study. *J Pediatr.* 2005; 146: 54-61.
- Cohen SA: Use of nitazoxanide as a new therapeutic option for persistent diarrhea: a pediatric perspective. *Curr Med Res Opin.* 2005; 21(7): 999–1004.
- Colford J, Roy S, Beach M, Hightower A, Shaw S, Wade T. A review of household drinking water intervention trials and an approach to the estimation of endemic waterborne gastroenteritis in the United States. *J Water Health.* 2006; 4(2): 71-88.
- Córdoba P. Genotipos G de rotavirus durante 10 años en niños con diarrea aguda de la ciudad de La Rioja, Argentina. Implicancias en la vacunación. *Rev Fac Ciencias Médicas.* 2017; 74(4): 345-9.
- Cortes P, Dichiara D, Contreras V, Huerta V, Caffer M. Etiología de la diarrea bacteriana aguda en pacientes pediátricos de la ciudad de Córdoba. *Rev Arg Microbiol.* 2010; 42(suppl 1): 162.
- Costamagna SR, García S, Visciarelli E, Casas N. Epidemiología de las parasitosis en Bahía Blanca (provincia de Buenos Aires) Argentina, 1994-1999. *Parasitol Latinoam.* 2002; 57: 103-10.
- Costamagna SR, García S, Visciarelli E, Casas N. Epidemiología de las parasitosis en Bahía Blanca (Provincia de Buenos Aires) Argentina - 1994/1999. *Parasitol Latinoam.* 2002; 57: 103-10.
- Costamagna SR, Visciarelli E, Lucchi L, Basualdo JA. Parásitos en aguas del arroyo Naposta, aguas de recreación y de consumo en la ciudad de Bahía Blanca (Provincia de Buenos Aires, Argentina). *Parasitol Latinoam.* 2005; 60: 122-6.
- Cotton JA, Beatty JK, Buret AG. Host parasite interactions and pathophysiology in *Giardia* infections. *Int J for Parasitol.* 2011; 41: 925-33.

- Craig P, Ito A. Intestinal cestodes. *Curr Op Infect Dis.* 2007; 20(5): 524-32.
- Cravioto A, Reyes RE, Trujillo F, Uribe F, Navarro A, De La Roca JM, Hernández JM, Pérez G, Vázquez V. Risk of diarrhea during the first year of life associated with initial and subsequent colonization by specific enteropathogens. *Am. J. Epidemiol.* 1990; 131: 886-904.
- Cromley EK, McLafferty SL. *GIS and Public Health.* Second edition. The Guilford Press. New York, EEUU. 2012. Disponible en www.guilford.com
- Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 2013; 26(4): 822-80.
- Curns A, Steiner C, Barrett M, Hunter K, Wilson E, Parashar UD. Reduction in Acute Gastroenteritis Hospitalizations among US Children After Introduction of Rotavirus Vaccine: Analysis of Hospital Discharge Data from 18 US States. *The J Infect Dis.* 2010; 201(11): 1617-24.
- Czeczulin JR, Balepur S, Hicks S, Phillips A, Hall R, Kothary MH, Navarro-Garcia F, Nataro JP. Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 1997; 65: 4135-45.
- D'Souza R, Hall G, Becker N. Climatic factors associated with hospitalizations for rotavirus diarrhoea in children under 5 years. *Epidemiol Infect.* 2008; 136: 56-64.
- Darbandi A, Owlia P, Bouzari S, Saderi H. Diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes frequency in Khuzestan province of Iran. *Iran J Microbiol.* 2016; 8(6): 352-8.
- Das SK, Faruque AS, Chisti MJ, Malek MA, Salam MA, Sack DA. Changing trend of persistent diarrhoea in young children over two decades: observations from a large diarrhoeal disease hospital in Bangladesh. *Acta Paediatr.* 2012; 101(10): 452-7.
- Das SK, Nasrin D, Ahmed S, Wu Y, Ferdous F, Farzana F, Khan S, Malek M, El Arifeen S, Levine M, Kotloff K, Faruque A. Health care-seeking behavior for childhood diarrhea in Mirzapur, rural Bangladesh. *Am J Trop Med Hyg.* 2013; 89(Suppl): 62-8.

- Davidson GP, Barnes GL. Structural and functional abnormalities of the small intestine in infants and young children with rotavirus enteritis. *Acta Paediatr Scand.* 1979; 68: 181-6.
- de Andrade JA, Fagundes-Neto U. Persistent diarrhea: still an important challenge for the pediatrician. *J Pediatr.* 2011; 87(3): 199-205.
- De Elia E, Elorza C, Horlent N, Lamaro A, Lanfri M, Lanfri S, Otero J, Pons D, Porcasi Gomez X, Rotela C, Scavuzzo C, Torrusio S. *Epidemiología Panorámica Introducción al uso de herramientas geoespaciales aplicadas a la Salud Pública.* Primera edición. Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Comisión Nacional de Actividades Espaciales; Ministerio de Planificación Federal Inversión Pública y Servicios. Ministerio de Salud de la Nación. Dirección de Epidemiología, 2014.
- De T, Kondekar S, Rathi S. Hospital Based Prospective Observational Study to Audit the Prescription Practices and Outcomes of Paediatric Patients (6 months to 5 years age group) Presenting with Acute Diarrhea. *J Clin Diagn Res.* 2016; 10(5): 1-5.
- Degiuseppe JI, Giovacchini C, Stupka JA, Red Nacional de Vigilancia de Gastroenteritis Virales. Vigilancia epidemiológica de rotavirus en la Argentina: 2009-2011. *Arch Argent Pediatr.* 2013; 111(2): 148-54.
- Degiuseppe JI. Trends in hospital discharges for intestinal infectious disease in infants in Argentina, 2005-2013. *Arch Argent Pediatr.* 2017; 115(4): 350-6.
- Del Coco VF, Molina NB, Basualdo JA, Cordoba M. *Blastocystis* spp.: avances, controversias y desafíos futuros. *Rev Arg Microbiol.* 2017; 49: 110-8.
- Delannoy S, Beutin L, Fach P. Discrimination of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) from Non-EHEC Strains Based on Detection of Various Combinations of Type III Effector Genes. *J Clin Microbiol.* 2013; 51(10): 3257-62.
- Deng W, Puente JL, Gruenheid S, Li Y, Vallance BA, Vázquez A, Barba J, Ibarra JA, O'Donnell P, Metalnikov P, Ashman K, Lee S, Goode D, Pawson T, Finlay BB. Dissecting virulence: systematic and functional analyses of a pathogenicity island. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101: 3597-602.

- Denno DM, Keene WE, Hutter CM, Koepsell JK, Patnode M, Flodin-Hursh D, Stewart LK, Duchin JS, Rasmussen L, Jones R, Tarr PI. Tri-County Comprehensive Assessment of Risk Factors for Sporadic Reportable Bacterial Enteric Infection in Children. *J Infect Dis.* 2009; 199: 467-76.
- Denoeud F, Roussel M, Noel B, Wawrzyniak I, Da Silva C, Diogon M, Viscogliosi E, Brochier-Armanet C, Couloux A, Poulain J, Segurens B, Anthouard V, Texier C, Blot N, Poirier P, Ng C, Tan K, Artiguenave F, Jaillon O, Aury J, Delbac F, Wincker P, Vivarès C, El Alaoui H. Genome sequence of the stramenopile *Blastocystis*, a human anaerobic parasite. *Gen Biol* 2011, 12: 29-64.
- Derby K, Lucien M, Leshem E, Steenland M, Juin S, Joseph G, Katz M. Hospitalizations and deaths caused by diarrhea in children five years old and younger at four hospitals in Haiti, 2010-2012. *Am J Trop Med Hyg.* 2014; 90: 291-3.
- Dey S, Parande MV, Parande AM, Lakkannavar SL, Rathore PK, Mantur BG, Kholkute SD, Roy S. Twin Outbreak of Cholera in Rural North Karnataka, India. *Indian J Med Res.* 2014; 140: 420-6.
- Di Genova BM, Tonelli RR. Infection Strategies of Intestinal Parasite Pathogens and Host Cell Responses. *Front Microbiol.* 2016; 7:256-272.
- do Valle G, Gomes T, Irino K, Trabulsi L. The traditional enteropathogenic *Escherichiacoli* (EPEC) serogroup O125 comprises serotypes which are mainly associated with the category of enteroaggregative *E. coli*. *FEMS Microbiol Lett.* 1997; 152: 95-100.
- Dogruman-Al F, Simsek Z, Boorum K, Ekici E, Sahin M, Tuncer C, Kustimur S, Altinbas A. Comparison of Methods for Detection of *Blastocystis* Infection in Routinely Submitted Stool Samples, and also in IBS/IBD Patients in Ankara, Turkey. *PLoS ONE.* 2010; 5(11): 15484-95.
- Donnenberg M, Finlay B. Combating enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) infections: the way forward. *Trends Microbiol.* 2013; 21(7): 317-9.
- Durairaj P, Raju S, Thirumalaikumarasamy S. Clinical profile and risk factors for persistent diarrhoea in children under five years of age in an urban referral centre. *Int J Contemp Pediatr.* 2017; 4(6): 1986-94.

- Durany DA, Pavan J. Gastroenteritis por *Shigella* spp. en la comunidad de General Roca, Río Negro. XV Jornada de Investigación Científica. Resumen 144. 2014. Córdoba, Argentina.
- Dutta S, Guin S, Ghosh S, Pazhani G, Rajendran K, Bhattacharya M, Takeda Y, Nair G, Ramamurthy T. Trends in the prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* among hospitalized diarrheal patients in Kolkata, India. PLoS One. 2013; 8(2): e56068.
- Eck JE, Chainey S, Cameron JG, Leitner M, Wilson RE. Mapping Crime: Understanding Hot Spots. U.S. Department of Justice. National Institute of Justice. Special Report. 2005. Disponible en <http://www.ojp.usdoj.gov/nij>
- Effler PV, Holman RC, Parashar UD, Glass RI. Diarrhea-associated hospitalizations among children in Hawaii. Hawaii Med J. 2000; 59(9): 362-5.
- Eisenberg J, Brookhart M, Rice G, Brown M, Colford J. Disease transmission models for public health decision making: analysis of epidemic and endemic conditions caused by waterborne pathogens. Environ Health Perspect. 2002; 110: 783-90.
- Ejiofor OS, Onyire NB, Ofomata JA. The prevalence of *Giardia lamblia* in children presenting with diarrhoea at secondary health facility in Awka, South-East Nigeria. Eur J Sci Res. 2011; 57(4): 529-32.
- Eklund M, Scheutz F, Siitonen A. Clinical isolates of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes, virulence characteristics, and molecular profiles of strains of the same serotype. J Clin Microbiol. 2001; 39(8): 2829-34.
- Else KJ, Finkelman FD, Maliszewski CR, Grecis RK. Cytokine-mediated regulation of chronic intestinal helminth infection. J Exp Med. 1994; 179: 347-51.
- Espelage W, der Heiden M, Stark K, Alpers K. Characteristics and risk factors for symptomatic *Giardia* infections in Germany. BMC Public Health. 2010; 10: 41-50.
- Esquivel P, Lifschitz V, Losch L, Medina MG, Pato AM, Cacciamani A, Merino Luis A. Caracterización molecular de asilamientos de *Escherichia coli* productores de diarrea en niños y adultos de la ciudad de Corrientes, Argentina. Rev Panam Infectol. 2010; 12(3): 17-21.

Estadísticas Hospitalarias de de Hospitales provinciales de Misiones:
<https://salud.misiones.gob.ar/wp-content/uploads/2017/12/Hospitalaria2016.pdf>

Estadísticas Hospitalarias de Hospitales provinciales de Jujuy:
<http://salud.jujuy.gob.ar/wp-content/uploads/sites/14/2018/01/ANUARIOEstHosp2016.pdf>

Estadísticas Hospitalarias de Hospitales provinciales de Rio Negro:
<https://salud.rionegro.gov.ar/biblioteca/documentos/estadistica/Publicacion%20Estadistica%20Ministerio%20de%20Salud.%20A%20C%20B1o%202013.pdf>

Estadísticas Hospitalarias del Hospital Municipal de Rosario. Disponible en
<https://www.rosario.gov.ar/mr/epidemiologia/estadisticas-de-salud/resumenannual/Indicadores%20Año%202013.pdf> at download/file

Estadísticas Hospitalarias del Hospital Pedro Elizalde. Disponibles en
[:http://www.buenosaires.gob.ar/salud/estadisticasa-para-la-salud/informe-estadistico-de-hospitalizacion-internacion](http://www.buenosaires.gob.ar/salud/estadisticasa-para-la-salud/informe-estadistico-de-hospitalizacion-internacion)

Estadísticas Hospitalarias del Hospital Ricardo Gutierrez. Disponible en:
<http://www.buenosaires.gob.ar/salud/movimiento-hospitalario-ano2017-0>

Eze JI, Scott EM, Pollock KG, Stidson R, Miller CA, Lee D. The association of weather and bathing water quality on the incidence of gastrointestinal illness in the west of Scotland. *Epidemiol. Infec.* 2014; 142: 1289-99.

Fagundes-Neto U, Scaletsky I. The gut at war: the consequences of enteropathogenic *Escherichia coli* infection as a factor of diarrhea and malnutrition. *Sao Paulo Med J.* 2000; 118(1): 21-9.

Fagundes-Neto U. Persistent Diarrhea: Still a Serious Public Health Problem in Developing Countries. *Curr Gastroenterol Rep.* 2013; 15: 345-52.

Famiglietti A, Quinteros M, Vázquez M, Marín M, Nicola F, Radice M, Galas M, Pasterán F, Bantar C, Casellas J, Kovensky Pupko J, Couto E, Goldberg M, Lopardo H, Gutkind G, Soloaga R. Consenso sobre las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en Enterobacteriaceae. *Rev Arg Microbiol.* 2005, 37: 57-66.

- Fang GD, Lima AA, Martins CV, Nataro JP, Guerrant RL. Etiology and Epidemiology of Persistent Diarrhea in Northeastern Brazil: A Hospital-Based, Prospective, Case-Control Study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1995; 21: 137-44.
- Farfán-García AE, Ariza-Rojas SC, Vargas-Cárdenas FA, Vargas-Remolina LV. Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena. *Rev Chil Infectol.* 2016; 33(4): 438-50.
- Febriani Y, Levallois P, Gingras S, Gosselin P, Majowicz SE, Fleury MD. The association between farming activities, precipitation, and the risk of acute gastrointestinal illness in rural municipalities of Quebec, Canada: a cross-sectional study. *BMC Public Health.* 2010; 10: 48-54.
- Feldman RE, Guardis M. Diagnóstico coproparasitológico. 1990.
- Fernández G, Ramos AG. El crecimiento urbano de Tandil: ¿modelo territorial de la ciudad difusa? *Rev Geo Dig* 2013; 10(20): 1-12.
- Fierer J, Guiney DG. Diverse virulence traits underlying different clinical outcomes of *Salmonella* infection. *J Clin Invest.* 2001; 107(7): 775-80.
- Finkelman FD, Shea-Donohue T, Goldhill J, Sullivan CA, Morris SC, Madden KB, Gause WC, Urban JF. Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes: lessons from studies with rodent models. *Annu Rev Immunol.* 1997; 15: 505-33.
- Firdu T, Abunna F, Girma M. Intestinal Protozoal Parasites in Diarrheal Children and Associated Risk Factors at Yirgalem Hospital, Ethiopia: A Case-Control Study. *Int Sch Res Notices.* 2014; 2014: 357126-14.
- Fisman D. Seasonality of Infectious Diseases. *Ann Rev Public Health.* 2007; 28: 127-43.
- Fletcher SM, McLaws ML, Ellis JT. Prevalence of gastrointestinal pathogens in developed and developing countries: systematic review and meta-analysis. *J Public Health Res.* 2013a; 2(1): 42-53.
- Fletcher SM, Stark D, Ellis J. Prevalence of gastrointestinal pathogens in Sub-Saharan Africa: systematic review and meta-analysis. *J Public Health Africa.* 2013b; 2: 30-41.
- Flores-Abuxapqui J, Suarez-Hoil G, Puc-Franco M, Heredia-Navarrete MR, Puerto-Manzano F, Gonzalez-Losa M, Puerto-Solis M, Polanco-Marin G, Puerto-

- Cortes B. Etiology of acute diarrhea in hospital in-patient mexican children. *Rev Biomed.* 1994; 5: 117-25.
- Fontoura VM, Graepp-Fontoura I, Santos FS, Santos Neto M, Tavares HS, Bezerra MO, Oliveira Feitosa M, Figuerêdo Neves A, Melo de Moraes J, Costa Nascimento L. Socio-environmental factors and diarrheal diseases in under five-year old children in the state of Tocantins, Brazil. *PLoS ONE* 2018; 13(5): e0196702.
- Frank C, Werber D, Cramer JP, Askar M, Faber M, der Heiden M, Bernard H, Fruth A, Prager R, Spode A, Wadl M, Zoufaly A, Jordan S, Kemper MJ, Follin P, Müller L, King LA, Rosner B, Buchholz U, Stark K, Krause G. Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. *N Engl J Med.* 2011; 365: 1771-80.
- Franzolin MR, Barbosa Alves RC, Keller R, Tardelli Gomes TA, Beutin L, Lima Barreto M, Milroy C, Strina A, Ribeiro H, Trabulsi LR. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005; 100(4): 359-63.
- Fraser D, Dagan R, Porat N, el-On J, Alkrinawi S, Deckelbaum RJ, Naggan L. Persistent diarrhea in a cohort of Israeli Bedouin infants: role of enteric pathogens and family and environmental factors. *J Infect Dis.* 1998; 178(4): 1081-8.
- Fratamico P, DebRoy C, Liu Y, Needleman D, Baranzoni G, Feng P. Advances in Molecular Serotyping and Subtyping of *Escherichia coli*. *Front Microbiol.* 2016; 7: 644-52.
- Fuller JA, Clasen T, Heijnen M, Eisenberg JNS. Shared Sanitation and the Prevalence of Diarrhea in Young Children: Evidence from 51 Countries, 2001–2011. *Am J Trop Med Hyg.* 2014; 91(1): 173-80.
- Galas M, Lucero C, Tuduri E, Vazquez M, Soloaga R, Red WHONET Argentina, Corso A. Resistencia a los antimicrobianos en *Shigella* spp. en Argentina. XII Congreso Argentino de Microbiología. Resumen 632. 2010. Argentina.
- Gambandé T, Damiano M, Borda N, Notario R, Aita J. Prevalence of the bacteria causing diarrhea in a Rosario Hospital, Argentina. *Rev Fac Ciencias Medicas. Univ Nac Cordoba.* 2006; 63(3): 36-8.

- García Roig C, Larre N, Pastene H, Gutierrez G, Vaccaro J, Sciarrota J, Lepetic A, Moreno C, Ellis A. Epidemiological and clinical characteristics of acute gastroenteritis according to their etiology (rotavirus or other) in children younger than 5 years old treated in a private institution in the city of Buenos Aires. *Arch Argent Pediatr*. 2013; 111(3): 218-23.
- García Saito V, Gariboglio Vázquez M, Zaloff Dakoff A, Álvarez Estigarribia M, Sucin M, Moreira G, Lösch L, Merino L. Prevalencia de bacterias enteropatógenas en niños que asisten a un hospital pediátrico en Resistencia, Chaco, Argentina. *Rev Fac Med UNNE*. 2017; XXXVII (1): 15-20.
- García V, Chávez L, Coello R, González J, Aguilar BS. *Cryptosporidium* sp. in 300 children with and without diarrhea. *Arch Invest Med*. 1991; 22: 329-32.
- Gastañaduy P, Curns A, Parashar UD, Lopman B. Gastroenteritis hospitalizations in older children and adults in the united states before and after implementation of infant Rotavirus vaccination. *J Am Med Assoc*. 2013; 310(8): 851-3.
- GBD Diarrhoeal Diseases Collaborators. Estimates of global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoeal diseases: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet Infect Dis* 2017; 17: 909–948.
- Germinario C, Caprioli A, Giordano M, Chironna M, Gallone MS, Tafuri S, Minelli F, Maugliani A, Michelacci V, Santangelo L, Mongelli O, Montagna C, Scavia G; all participants of the Outbreak investigation team. Community-wide outbreak of haemolytic uraemic syndrome associated with Shiga toxin 2-producing *Escherichia coli* O26:H11 in southern Italy, summer 2013. *Euro Surveill* 2016; 21(38): 30343-52.
- Geyid A, Olsvik O, Ljungh A. Virulence properties of *Escherichia coli* isolated from Ethiopian patients with acute or persistent diarrhoea. *Ethiop Med J*. 1998; 36: 123-39.
- Ghazani M, FitzGerald G, Hu W, Toloo GS, Xu Z. Temperature Variability and Gastrointestinal Infections: A Review of Impacts and Future Perspectives. *Int J Environ Res Public Health*. 2018; 15(4). e766.

- Giammanco A, Maggio M, Giammanco G, Morelli R, Minelli F, Scheutz F, Caprioli A. Characteristics of *Escherichia coli* strains belonging to enteropathogenic *E. coli* serogroups isolated in Italy from child with diarrhea. J Clin Microbiol. 1996; 34: 689-94.
- Giannattasio A, Guarino A, Lo Vecchio A. Management of children with prolonged diarrhea. F1000Res. 2016; 5: 1-11.
- Giordano MO, Ferreyra LJ, Isa MB, Martinez LC, Yudowsky SI, Nates SV. The epidemiology of acute viral gastroenteritis in hospitalized children in Cordoba City, Argentina: an insight of disease burden. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2001; 43(4): 193-7.
- Giugno S, Oderiz S. Etiología bacteriana de la diarrea aguda en pacientes pediátricos. Acta Bioquím Clín Latinoam. 2010; 44: 63-9.
- Gomez D, Zotta C, Lavayen S, Chinen I, Carbonari C, Miliwebsky E, Rivas M, Monzani V, Nari C, Morvay L. Epidemiología molecular de cepas de *Escherichia coli* O157:H7 aisladas en diferentes localidades de la provincia de Buenos Aires. Documento INE. Resumen. 2010. Disponible en <http://www.ine.gov.ar/documentos/publicaciones/011.pdf>.
- Gonzales L, Joffre E, Rivera R, Sjoling A, Svennerholm AM, Iniguez V. Prevalence, seasonality and severity of disease caused by pathogenic *Escherichia coli* in children with diarrhoea in Bolivia. J Med Microbiol. 2013; 62: 1697-706.
- González Corona E, Cunil Romero S. Diagnóstico y tratamiento de la diarrea persistente en un Servicio de enfermedades diarreicas agudas. Medisan. 2002; 6(2): 42-49.
- González Corona E, Cunil S. Diagnóstico y tratamiento de la diarrea persistente en un servicio de enfermedades diarreicas agudas. Medisan. 2002; 6: 42-9.
- González Corona E. Diarrea aguda, prolongada y persistente en niños y su diferencia de la diarrea crónica. Rev Med Cuba. 2017; 21(9): 2047-61.
- González Corona EA. Diarrea aguda, prolongada y persistente en niños y su diferencia de la diarrea crónica. Medisan. 2017; 21(9): 2047-60.
- Granado-Villar D, Cunill-De Sautu B, Granados A. Acute Gastroenteritis. Pediatrics in Rev. 2012; 33: 487-98.

- Grenóvero S, Bertucci E, Molina NB, Basualdo J. Distribución espacial y prevalencia de geohelminthos en humanos de la región del Litoral Argentino. *Rev Arg Zoo Enf Infecc Emerg*. 2014, IX (2): 29-30.
- Grossi O, Mancini ML, Arias L, Racero L. Parasitosis en la población asistida en el HIGA "Evita" Lanús. Situación actual. *ByPC* 2017; 81(1): 41-7.
- Gu B, Cao Y, Pan S, Zhuang L, Yu R, Peng Z, Qian H, Wei Y, Zhao L, Liu G, Tong M. Comparison of the prevalence and changing resistance to nalidixic acid and ciprofloxacin of *Shigella* between Europe-America and Asia-Africa from 1998 to 2009. *Int J Antimicrob Agents*. 2012; 40(1): 9-17.
- Guarino A, Canani RB, Pozio E, Terracciano L, Albano F, Mazzeo M. Enterotoxic effect of stool supernatant of *Cryptosporidium*-infected calves on human jejunum. *Gastroenterology*. 1994; 106(1): 28-34.
- Guerra J, Romero-Herazo Y, Arzuza O, Gómez O. Phenotypic and Genotypic Characterization of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Clinical Isolates from Northern Colombia, South America. *Bio Med Res Int*. 2014; 23: 1-11.
- Guerrant R, Brush J, Ravdin J, Sullivan J, Mandell G. Interaction between *Entamoeba histolytica* and human polymorphonuclear leukocytes. *J Infect Dis*. 1981; 143: 83-93.
- Guerrant R, Oriá R, Moore S, Oriá M, Lima A. Malnutrition as an enteric infectious disease with long-term effects on child development. *Nutr Rev*. 2008; 66(9): 487-505.
- Gupta A, Sarker G, Rout A, Mondal T, Pal R. Risk correlates of diarrhea in children under 5 years of age in slums of Bankura, West Bengal. *J Glob Infect Dis*. 2015; 7(1): 23-9.
- Gupta P, Murali MV, Seth A. Epidemiology of diarrhea in urban slums. *Indian Pediatr*. 1998; 35(2): 147-51.
- Haghi F, Zeighami H, Hajiahmadi F, Khoshvaght H, Bayat M. Frequency and antimicrobial resistance of diarrhoeagenic *Escherichia coli* from young children in Iran. *J Med Microbiol*. 2014; 63: 427-32.
- Hall AJ, Rosenthal M, Gregoricus N, Greene S, Ferguson J, Henao O, Vinjé J, Lopman B, Parashar U, Widdowson M. Incidence of Acute Gastroenteritis

- and Role of Norovirus, Georgia, USA, 2004–2005. *Emerg Infect Dis*. 2011b; 17(8): 1381-8.
- Hall GV, Hanigan IC, Dear KB, Vally H. The influence of weather on community gastroenteritis in Australia. *Epidemiol Infect*. 2011a; 139: 927-36.
- Han A, Sleight A, Vince J, Danaya R, Ogle G. Persistent diarrhoea in children admitted to Port Moresby General Hospital. *Papua New Guinea Med J*. 1995; 38(4): 272-7.
- Haque R, Mondal D, Karim A, Hossain Molla I, Rahim A, Faruque AS, Ahmad N, Kirkpatrick B, Houpt E, Snider C, Petri WA. Prospective case-control study of the association between common enteric protozoal parasites and diarrhea in Bangladesh. *Clin Infect Dis*. 2009; 48: 1191-7.
- Hasan MA, Mouw C, Jutla A, Akanda AS. Quantification of rotavirus diarrheal risk due to hydroclimatic extremes over South Asia: Prospects of satellite-based observations in detecting outbreaks. *GeoHealth*. 2018; 2: 70-86.
- Hashmey R, Genta R, Clinton White A. Parasites and Diarrhea. II: Helminths and Diarrhea. *J Travel Med*. 1997; 4: 72-5.
- Hawash YA, Ismail KA, Almeahmadi M. High Frequency of Enteric Protozoan, Viral, and Bacterial Potential Pathogens in Community-Acquired Acute Diarrheal Episodes: Evidence Based on Results of Luminex Gastrointestinal Pathogen Panel Assay. *Korean J Parasitol*. 2017; 55(5): 513-21.
- Hebbelstrup Jensen B, Olsen KE, Struve C, Krogfelt KA, Petersen AM. Epidemiology and clinical manifestations of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*. 2014; 27(3): 614-30.
- Hebbelstrup Jensen B, Poulsen A, Hebbelstrup Rye Rasmussen S, Struve C, Engberg JH, Friis-Møller A, Boisen N, Jønsson R, Petersen RF, Petersen AM, Krogfelt KA. Genetic Virulence Profile of Enteroaggregative *Escherichia coli* Strains Isolated from Danish Children with Either Acute or Persistent Diarrhea. *Front. Cell Infect Microbiol*. 2017; 7: 230-45.
- Hebbelstrup Jensen B, Röser D, Andreassen BU, Olsen KE, Nielsen HV, Roldgaard BB, Schjørring S, Mirsepasi-Lauridsen HC, Jørgensen SL, Mortensen EM, Petersen AM, Krogfelt KA. Childhood diarrhoea in Danish day care centres

- could be associated with infant colic, low birth weight and antibiotics. *Acta Paediatr.* 2016; 105: 90-5.
- Hedican E, Medus C, Besser J, Juni B, Koziol B, Taylor C, Smith K. Characteristics of O157 versus Non-O157 Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* Infections in Minnesota, 2000–2006. *Clin Infect Dis.* 2009; 49: 358-64.
- Helmby H, Takeda K, Akira S, Grecis RK. Interleukin 18 (IL-18) promotes the development of chronic gastrointestinal helminth infection by downregulating IL-13. *J Exp Med.* 2001; 194(3): 355-64.
- Hernandez Chavarria F. *Strongyloides stercoralis*. Un parásito subestimado. *Parasitol día.* 2001; 25(1-2): 40-9.
- Hien B, Scheutz F, Cam P, Serichantalergs O, Huong T, Thu T, Dalsgaard A. Diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* strains isolated from children in a hospital case-control study in Hanoi, Vietnam. *J Clin Microbiol.* 2008; 46: 996-1004.
- Hu J, Torres AG. Enteropathogenic *Escherichia coli*: foe or innocent bystander?. *Clin Microbiol Infect.* 2015; 21(8): 729-34.
- Huang DB, Mohanty A, DuPont HL, Okhuysen PC, Chiang T. A review of an emerging enteric pathogen: enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Med Microbiol.* 2006; 55(10): 1303-11.
- Huerta V, Gonzalez P, Contreras V, Barcudi D, Diciara D, Cortes P. Etiología de la diarrea bacteriana aguda en pacientes pediátricos de la ciudad de Córdoba. Disponible en: <http://www.cobico.com.ar/wp-content/archivos/2014/02/Dra.-Huerta--noviembre2013-febrero.pdf>
- Hunter PR, Chalmers RM, Hughes S, Syed Q. Self-reported diarrhea in a control group: a strong association with reporting of low-pressure events in tap water. *Clin Infect Dis.* 2005; 40(4): e32-4.
- Huppertz HI, Rutkowski S, Aleksic S, Karch H. Acute and chronic diarrhoea and abdominal colic associated with enteroaggregative *Escherichia coli* in young children living in western Europe. *Lancet.* 1997; 349: 1660-2.
- Huruy K, Kassu A, Mulu A, Worku N, Fetene T, Gebretsadik S, Biadglegne F, Belyhun Y, Muche A, Gelaw A, Anagaw B, Yifru S, Wondie Y, Bekele A, Tiruneh M, Reissig D, Moges F. Intestinal parasitosis and shigellosis among diarrheal

- patients in Gondar teaching hospital, northwest Ethiopia. BMC Res Notes. 2011; 4: 472-80.
- Im J, Nichols C, Bjerregaard-Andersen M, Sow A, Løfberg S, Tall A, Pak G, Aaby P, Baker S, Clemens J, Espinoza LM, Konings F, May J, Monteiro M, Niang A, Panzner U, Park S, Schütt-Gerowitt H, Wierzba T, Marks F, von Kalckreuth V. Prevalence of *Salmonella* Excretion in Stool: A Community Survey in 2 Sites, Guinea-Bissau and Senegal. Clin Infect Dis. 2016; 62: 50-5.
- INDEC. Instituto Nacional de Estadística y Censos. Censo Nacional de Población, Hogares y Viviendas 2010. Disponible en www.indec.gov.ar.
- Irurtia M, Magdaleno M, Benitez E, Di Bella A, Montenegro G, Di Bartolomeo S. Detección de *Escherichia coli* productora de toxina shiga (STEC) y de *Escherichiacoli* enteropatógena (EPEC) por cultivo de materia fecal y por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). XIII Congreso Arg Microbiología. Resumen 87. 2013. Buenos Aires, Argentina
- Isidean S, Riddle M, Savarino S, Porter C. A systematic review of ETEC epidemiology focusing on colonization factor and toxin expression. Vaccine. 2011; 29(37): 6167-78.
- Islam MA, Heuvelink A, de Boer E, Sturm P, Beumer R, Zwietering M, Faruque AS, Haque R, Sack DA, Talukder K. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from patients with diarrhoea in Bangladesh. J Med Microbiol. 2007; 56: 380-5.
- Islam S, Ahmed T, Mahfuz M, Mostafa I, Alam M, Saqeeb K, Sarker S, Chisti M, Alam N. The management of persistent diarrhoea at Dhaka Hospital of the International Centre for Diarrhoeal Disease and Research: a clinical chart review. Paediatr Int Child Health. 2018; 38(2): 87-96.
- Jackson JA, Turner JD, Rentoul L, Faulkner H, Behnke J, Hoyle M, Grecis R, Else K, Kamgno J, Bradley J, Boussinesq M. Cytokine response profiles predict species-specific infection patterns in human GI nematodes. Int J Parasitol. 2004; 34(11): 1237-44.
- Jafari F, Hamidian M, Rezadehbashi M, Doyle M, Salmanzadeh-ahrabi S, Derakhshan F, Reza Zali M. Prevalence and antimicrobial resistance of

- diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* species associated with acute diarrhea in Tehran, Iran. *Can J Infect Dis Med Microbiol.* 2009; 20(3): 56-62.
- Jagai JS, Sarkar R, Castronovo D, Kattula D, McEntee J, Ward H, Kang G, Naumova EN. Seasonality of rotavirus in south asia: A meta-analysis approach assessing associations with temperature, precipitation, and vegetation index. *PLoS One.* 2012; 7(5): e38168.
- Jaros P, Cookson A, Campbell D, Duncan G, Prattley D, Carter P, Besser T, Shringi S, Hathaway S, Marshall J, French N. Geographic Divergence of Bovine and Human Shiga Toxin–Producing *Escherichiacoli* O157:H7 Genotypes, New Zealand. *Emerg Infect Dis.* 2014; 20(12): 1980-9.
- Jimenez Gutierrez E, Pineda V, Calzada JE, Guerrant RL, Lima Neto JB, Pinkerton RC, Saldana A. Enteric parasites and enteroaggregative *Escherichia coli* in children from Canazas County, Veraguas Province, Panama. *Am J Trop Med Hyg.* 2014; 91: 267-72.
- Jimenez-Gonzalez DE, Martinez-Flores WA, Reyes-Gordillo J, Ramirez-Miranda ME, Arroyo-Escalante S, Romero-Valdovinos M, Stark D, Souza-Saldivar V, Martinez-Hernandez F, Flisser A, Olivo-Diaz A, Maravilla P. Blastocystis infection is associated with irritable bowel syndrome in a Mexican patient population. *Parasitol Res.* 2012; 110(3): 1269-75.
- Juárez MM, Rajal VB. Parasitosis intestinales en Argentina: principales agentes causales encontrados en la población y en el ambiente. *Rev Arg Microbiol.* 2013; 45(3): 191-204.
- Jung HC, Eckmann L, Yang SK, Panja A, Fierer J, Morzycka-Wroblewska E, Kagnoff MF. A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J Clin Invest.* 1995; 95: 55-65.
- Kahali S, Sarkar B, Chakraborty S, Macaden R, Deokule JS, Ballal M, Nandy RK, Bhattacharya SK, Takeda Y, Ramamurthy T. Molecular epidemiology of diarrhoeagenic *Escherichia coli* associated with sporadic cases and outbreaks of diarrhoea between 2000 and 2001 in India. *Eur J Epidemiol.* 2004; 19(5): 473-9.

- Kahsay A, Muthupandian S. A review on Sero diversity and antimicrobial resistance patterns of *Shigella* species in Africa, Asia and South America, 2001–2014. BMC Res Notes. 2016; 9: 422-8.
- Kaur R, Rawat D, Kakkar M, Uppal B, Sharma V. Intestinal parasites in children with diarrhea in Delhi, India. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2002; 33: 725-9.
- Kazemi M, Gumpert G, Marks M. Clinical spectrum and carrier state of non-typhoidal *Salmonella* infections in infants and children. CMA J. 1974; 110: 1253-7.
- Kelly-Hope L, Alonso W, Thiem V, Canh D, Anh D, Lee H, Miller M. Temporal Trends and Climatic Factors Associated with Bacterial Enteric Diseases in Vietnam, 1991–2001. Environm Health Perspect. 2008; 116(1): 7-13.
- Kermani NA, Jafari F, Mojarad H, Hoseinkhan N, Zali MR. Prevalence and associated factors of persistent diarrhoea in Iranian children admitted to a paediatric hospital. East Mediterr Health J. 2010; 16(8): 830-6.
- Ketema L, Lulseged S. Persistent diarrhoea: socio-demographic and clinical profile of 264 children seen at a referral hospital in Addis Ababa. Ethiop Med J. 1997; 35(3): 161-8.
- Khan AI, Huq S, Malek MA, Hossain I, Talukder K, Faruque A, Salam M. Analysis of fecal leukocytes and erythrocytes in *Shigella* infections in urban Bangladesh. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2006 37(4): 747-54.
- Khanna V, Tilak K, Prakash P, Mukhopadhyay C. Modified agar plate culture method for culture of *Strongyloides*. Trop Parasitol. 2015; 5: 136-8.
- Khoury H, Ogilvie I, El Khoury AC, Duan Y, Goetghebeur MM. Burden of rotavirus gastroenteritis in the Middle Eastern and North African pediatric population. BMC Infect Dis. 2011; 11: 9-20.
- Kintz E, Brainard J, Hooper L, Hunter P. Transmission pathways for sporadic Shiga-toxin producing *E. coli* infections: A systematic review and meta-analysis. Int J Hyg Environm Health. 2017; 220(1): 57-67.
- Klein EJ, Boster DR, Stapp JR, Wells JG, Qin X, Clausen C, Swerdlow D, Braden C, Tarr P. Diarrhea etiology in a Children's Hospital Emergency Department: a prospective cohort study. Clin Infect Dis. 2006; 43(7): 807-13.

- Klein EJ, Stapp JR, Clausen CR, Boster DR, Wells JG, Qin X, Swerdlow DL, Tarr PI. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in children with diarrhea: a prospective point-of-care study. *J Pediatr*. 2002; 141(2): 172-7.
- Knopp S, Mohammed K, Simba Khamis I, Mgeni A, Stothard J, Rollison D, Marti H, Utzinger J. Spatial distribution of soil-transmitted helminths, including *Strongyloides stercoralis*, among children in Zanzibar. *Geospat Health*. 2008; 3: 47-56.
- Koletzko S, Osterrieder S. Acute Infectious Diarrhea in Children. *Dtsch Arztebl Int*. 2009; 106(33): 539-48.
- Konaté A, Dembélé R, Kagambèga A, Soulama I, Kaboré WAD, Sampo E, Cissé H, Sanou A, Serme S, Zongo S, Zongo C, Fody AM, Guessennd NK, Traoré AS, Gassama-Sow A, Barro N. Molecular Characterization of Diarrheogenic *Escherichia Coli* in Children Less Than 5 Years of Age with Diarrhea in Ouagadougou, Burkina Faso. *Eur J Microbiol Immunol*. 2017; 7(3): 220-8.
- Koneman EW, Winn WC, Allen SD, Janda WM, Procop GW, Schreckenberger PC, Woods GL. Diagnóstico microbiológico: texto y atlas color. 6 edición Editorial Medica Panamericana. 2008. Buenos Aires, Argentina.
- Kosek M, Bern C, Guerrant R. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. *Bull WHO*. 2003; 81: 197-204.
- Kotloff K, Nataro J, Blackwelder W, Nasrin D, Farag T, Panchalingam S, Wu Y, Sow S, Sur D, Breiman R, Faruque A, Zaidi A, Saha D, Alonso P, Tamboura B, Sanogo D, Onwuchekwa U, Manna B, Ramamurthy T, Kanungo S, Ochieng J, Omore R, Oundo J, Hossain A, Das S, Ahmed S, Qureshi S, Quadri F, Adegbola R, Antonio M, Hossain M, Akinsola A, Mandomando I, Nhampossa T, Acácio S, Biswas K, O'Reilly C, Mintz E, Berkeley L, Muhsen K, Sommerfelt H, Robins-Browne R, Levine M. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *Lancet*. 2013; 382(9888): 209-22.

- Kovatz RS, Edwards SJ, Hajat S, Armstrong BG, Ebi KL, Menne B. The effect of temperature on food poisoning: a time-series analysis of salmonellosis in ten European countries. *Epidemiol Infect.* 2004; 132: 443-53.
- Kozub-Witkowski E, Krause G, Frankel G, Kramer D, Appel B, Beutin L. Serotypes and virutypes of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichiacoli* strains from stool samples of children with diarrhoea in Germany. *J Appl Microbiol.* 2008; 104: 403-10.
- Kumar GS, Kar SS, Jain A. Health and Environmental Sanitation in India: Issues For Prioritizing Control Strategies. *Indian J Occup Environ Med.* 2011; 15: 93-6.
- Kuo HY, Chiang DH, Wang CC, Chen TL, Fung CP, Lin CP, Cho WV, Liu CY. Clinical significance of *Blastocystis hominis*. experience from a medical center in northern Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect.* 2008; 41: 222-6.
- Lagundoye SB. Disordered small bowel pattern in ascariasis. *Trop Geogr Med.* 1972; 24: 226-31.
- Laham NA, Elyazji M, Al-Haddad R, Ridwan F. Prevalence of enteric pathogen-associated community gastroenteritis among kindergarten children in Gaza. *The J Biomed Res.* 2015; 29(1): 61-8.
- Lake IR, Nichols G, Harrison FC, Bentham G, Sari Kovats R, Grundy C, Hunter PR: Using infectious intestinal disease surveillance data to explore illness aetiology; a cryptosporidiosis case study. *Health Place.* 2009; 15(1): 333-9.
- Lal A, Hales S, French N, Baker MG. Seasonality in Human Zoonotic Enteric Diseases: A Systematic Review. *PLoS ONE.* 2012; 7(4): e31883.
- Lamberti LM, Fischer Walker CL, Black RE. Systematic review of diarrhea duration and severity in children and adults in low- and middle-income countries. *BMC Public Health.* 2012; 12: 276-87.
- Lan D. Territorio, industria, trabajo: División territorial del trabajo y espacio producido en la industria de la ciudad de Tandil – Argentina. Tesis de Posgrado. Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación. Universidad Nacional de La Plata. 2011.
- Lanata C, Fischer-Walker C, Olascoaga A, Torres C, Aryee M, Black R for the Child Health Epidemiology Reference Group, World Health Organization and

- UNICEF. Global Causes of Diarrheal Disease Mortality in Children <5 Years of Age: A Systematic Review. PLoS ONE. 2013, 8(9): e72788.
- Landolt N, Baroni M, Ochoteco M, Zurbriggen M, Spada R, Virgolini M. Campylobacteriosis en pediatría. Rev Arg Microbiol. 2010; 42: 242-3.
- Langendorf C, Le Hello S, Moumouni A, Gouali M, Mamaty A, Grais R, Weill F, Page A. Enteric bacterial pathogens in children with diarrhea in Niger: diversity and antimicrobial resistance. PLoS One. 2015; 10(3): e0120275.
- Lee KS, Kang DS, Yu J, Chang Y, Park WS. How to Do in Persistent Diarrhea of Children?: Concepts and Treatments of Chronic Diarrhea. Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr. 2012; 15: 229-36.
- Leelaporn A, Phengmak M, Eampoklap B, Manatsathit S, Tritilanunt S, Siritantikorn S, Nagayama K, Iida T, Niyasoma C, Komolpit P. Shiga toxin- and enterotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from subjects with bloody and nonbloody diarrhea in Bangkok, Thailand. Diagn Microbiol Infect Dis. 2003; 46(3): 173-80.
- Lemus JD, Araguez y Oroz V, Lucioni MC. Epidemiología y Salud Comunitaria. 2008. Editorial: Corpus. Argentina.
- Levine AC, Munyanenza RM, Glavis-Bloom J, Redditt V, Cockrell HC, Kalimba B, Kabemba V, Musavuli J, Gakwerere M, Umurungi JP, Shah SP, Drobac PC. Prediction of Severe Disease in Children with Diarrhea in a Resource-Limited Setting. PLoS ONE. 2013; 8(12): e82386.
- Lima A, Moore S, Barboza M, Soares A, Schlepner M, Newman R, Sears C, Nataro J, Fedorko D, Wuhib T, Schorling J, Guerrant R. Persistent diarrhea signals a critical period of increased diarrhea burden and nutritional shortfalls: a prospective cohort study among children in northeastern Brazil. The J Infect Dis. 2000; 181(5): 1643-51.
- Lima AA, Guerrant RL. Persistent diarrhea in children: epidemiology, risk factors, pathophysiology, nutritional impact, and management. Epidemiol Rev. 1992; 14: 222-42.
- Linares S, Lan D. Análisis multidimensional de la segregación socioespacial en Tandil (Argentina) aplicando SIG. Invest geogr. 2007; 44: 149-66.

- Lluque A, Mercado E, Riveros M, Alvarado L, Carlos E, Colichón A, Salazar E, Ochoa T. Comparación entre el Diagnóstico Serológico y el Diagnóstico por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para *Escherichia coli* Enteropatógena (EPEC). Rev Gastroenterol Perú. 2010; 30: 121-5.
- Longstreth GF, Thompson WG, Chey WD, Houghton LA, Mearin F, Spiller RC. Functional bowel disorders. Gastroenterology. 2006; 130(5): 1480-91.
- Lopardo HA, Predari SC, Vay C (eds). Manual de Microbiología Clínica. Bacterias de Importancia Clínica. Ed. Asociación Argentina de Microbiología, 2016. Libro digital. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.
- Loyola E, Castillo-Salgado C, Nájera-Aguilar P, Vidaurre M, Mujica O, Martínez-Piedra R. Los sistemas de información geográfica como herramienta para monitorear las desigualdades de salud. Pan Am J Public Health. 2002; 12(6): 415-28.
- Macfarlane DE, Horner-Bryce J. Cryptosporidiosis in well-nourished and malnourished children. Acta Paediatr. 1987; 76: 474-7.
- Mahfuz M, Alam M, Islam S, Naila N, Chisti M, Alam N, Sarker S, Ahmed T. Treatment outcome of children with persistent Diarrhoea admitted to an Urban Hospital, Dhaka during 2012–2013. BMC Pediatr. 2017; 17: 142-52.
- Maizels R, Yazdanbakhsh M. Immune Regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. Nature Rev Imm. 2003; 3: 733-44.
- Malbrán. INEI-ANLIS. Detección y caracterización de *Escherichia coli* diarreigénico. Manual de procedimientos. 2014.
- Maltezou H, Zafiropoulou A, Mavrikou M, Bozavoutoglou E, Liapi G, Foustoukou M, Kafetzi D. Acute Diarrhoea in Children Treated in an Outpatient Setting in Athens, Greece. J Infect. 2001; 43: 122-7.
- Mamatha B, Rituparna C. Decreased susceptibility to antimicrobials among *Shigella flexneri* isolates in Manipal, South India - a 5 year hospital based study. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2012; 43: 1447-51.
- Mandal J, V G, Emelda J, S M, Parija SC. The recent trends of Shigellosis: A JIPMER perspective. J Clin Diagn Res. 2012; 6: 1474-7.

- Mandell, Douglas, and Bennett's. Principles and Practice of Infectious Diseases. Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ (eds). 7^a Ed. Elsevier Health Sciences, 2014. New York, United States.
- Manera C, Aimaretto C, Raimondi K. Prevalencia y resistencia antimicrobiana de *Shigella* en un hospital regional. COBICO. 2017. Disponible en <http://cobico.com.ar/wp-content/archivos/2017/02/prevalencia-y-resistencia-antimicrobiana-de-shigella-en-un-hospital-regional.pdf>
- Maraki S, Georgiladakis A, Tselentis Y, Samonis G. A 5-year study of the bacterial pathogens associated with acute diarrhea on the island of Crete, Greece, and their resistance to antibiotics. Eur J Epidemiol. 2003; 18: 85-90.
- Marzel A, Desai P, Goren A, Schorr Y, Nissan I, Porwollik S, Valinsky L, McClelland M, Rahav G, Gal-Mor O. Persistent Infections by Nontyphoidal Salmonella in Humans: Epidemiology and Genetics. Clin Infect Dis. 2016; 62(7): 879-86.
- Mathieu E, Levy D, Veverka F, Parrish M, Sarisky J, Shapiro N, Johnston S, Handzel T, Hightower A, Xiao L, Lee YM, York S, Arrowood M, Lee R, Jones JL. Epidemiologic and environmental investigation of a recreational water outbreak caused by two genotypes of *Cryptosporidium parvum* in Ohio in 2000. Am J Trop Med Hyg. 2004; 71: 582-9.
- Medina MG, Esquivel P, Lifschitz V, Medina M, Lösch L, Merino LA. Detección de *Escherichia coli* diarreogénicos en niños de barrios humildes de Corrientes, Argentina. Rev Cubana Med Trop. 2010; 62(1): 42-7.
- Mel EH. Measuring white blood cells in the stools is useful in the management of acute diarrhea. West J Med. 2000; 172: 414.
- Menghi C, Iuvaro F, Dellacasa M, Gatta C. Survey of intestinal parasites among aboriginal community in Salta. Medicina (B. Aires). 2007; 67: 705-8.
- Meremikwu MM, Asindi AA, Antia-Obong OE. The influence of breast feeding on the occurrence of dysentery, persistent diarrhoea and malnutrition among Nigerian children with diarrhoea. West Afr J Med. 1997; 16(1): 20-3.
- Merino LA, Hreňuk GE, Ronconi MC, Alonso JM. Resistencia a antibióticos y epidemiología molecular de *Shigella* spp. en el nordeste argentino. Rev Panam Salud Publica. 2004; 15(4): 219-24.

- Michelli E, Millán A, Rodulfo H, Michelli M, Luiggi J, Carreño N, de Donato M. Identificación de *Escherichia coli* enteropatógena en niños con síndrome diarreico agudo del Estado Sucre, Venezuela. *Biomédica*. 2016; 36: 118-27.
- Milano A, Oscherov E, Palladino A, Bar A. Enteroparasitosis infantil en un área urbana del nordeste argentino. *Medicina (B. Aires)*. 2007; 67: 238-42.
- Mirdha BR, Samantray JC. *Hymenolepis nana*: a common cause of paediatric diarrhoea in urban slum dwellers in India. *J Trop Pediatr*. 2002; 48:331-334.
- Miri S, Dashti A, Mostaan S, Kazemi F, Bouzari S. Identification of different *Escherichia coli* pathotypes in north and north-west provinces of Iran. *Iran J Microbiol*. 2017; 9(1): 33-7.
- Mitike G. Prevalence of acute and persistent diarrhoea in north Gondar zone, Ethiopia. *East Afr Med J*. 2001; 78(8): 433-8.
- Moe K, Hummelman E, Oo W, Lwin T, Htwe T. Hospital-Based Surveillance for Rotavirus Diarrhea in Children in Yangon, Myanmar. *The J Infect Dis*. 2005; 192: S111-3.
- Mohamed AS, Levine M, Camp JW, Lund E, Yoder JS, Glickman LT, Moore M. Temporal patterns of human and canine *Giardia* infection in the United States: 2003–2009. *Prev Vet Med*. 2014; 113: 249-56.
- Mokomane M, Kasvosve I, de Melo E, Pernica JM, Goldfarb DM. The global problem of childhood diarrhoeal diseases: emerging strategies in prevention and management. *Ther Adv Infect Dis*. 2017; 5(1): 29-43.
- Molina NB, Basualdo JA. *Giardia duodenalis*: new insights on an ancient parasite. *Int J Parasitol Res*. 2013, 5(1): 122-31.
- Molina NB, Bertucci E, Grenóvero M, Basualdo J. Prevalence of *Blastocystis* in Argentina: Review of scientific literature (1995-2014). *J Bacteriol Parasitol*. 2016; 7: 5.
- Molina NB, Grenóvero S, Bertucci E, Basualdo J. *Blastocystis* sp. una infección emergente en Argentina: Revisión de la literatura científica de los últimos 25 años. III Congreso Panamericano de Zoonosis. Resumen. 2014. Buenos Aires, Argentina.

- Molina NB, Pezzani B, Ciarmela M, Orden A, Rosa D, Apezteguia M, Basualdo J, Minvielle M. Intestinal parasites and genotypes of *Giardia intestinalis* in schoolchildren from Berisso, Argentina. *J Infect Dev Ctries*. 2011; 5: 527-34.
- Molina NB. Epidemiología molecular de *Giardia lamblia* en áreas urbanas y rurales de Buenos Aires y Mendoza, Argentina. Tesis de Maestría en Ciencias del Laboratorio Clínico. 2009. Universidad Nacional de La Plata. Argentina.
- Molinari C, Aversa T, Wenk G. Infección por *Shigella* spp. como causa de internación por diarrea sanguinolenta en pediatría. VII Congreso Internacional de Infectología Pediátrica y Vacunas. Resumen 113. 2018. Buenos Aires, Argentina.
- Mondal D, Haque R, Sack R, Kirkpatrick B, Petri W. Attribution of malnutrition to cause-specific diarrheal illness: evidence from a prospective study of preschool children in Mirpur, Dhaka, Bangladesh. *Am J Trop Med Hyg*. 2009; 80: 824-6.
- Montenegro S, Pineda S, Enríquez I, Enríquez N, Rivera N, Delgado C. Detección de norovirus en niños con diarrea adquirida en la comunidad o nosocomial en el Hospital Guillermo Grant Benavente de Concepción, Chile. *Rev chil infectol*. 2014; 31: 304-11.
- Moore SR, Lima NL, Soares AM, Oria RB, Pinkerton RC, Barrett LJ, Guerrant RL, Lima AM. Prolonged episodes of acute diarrhea reduce growth and increase risk of persistent diarrhea in children. *Gastroenterology*. 2010, 139: 1156-64.
- Moore SR. Update on prolonged and persistent diarrhea in children *Curr Opin Gastroenterol*. 2011; 27(1): 19-23.
- Mor SM, Tumwine JK, Naumova EN, Ndezi G, Tzipori S. Microsporidiosis and malnutrition in children with persistent diarrhea, Uganda. *Emerg Infect Dis*. 2009; 15(1): 49-52.
- Moshtagian F, Alipour M, Yahyapour Y. Prevalence of *Escherichia coli* Pathotypes Among Children With Diarrhea in Babol, Northern Iran. *Int J Enteric Pathog*. 2016; 4(3):e36326.
- Moyo SJ, Maselle SY, Matee MI, Langeland N, Mylvaganam H. Identification of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from infants and children in Dar es Salaam, Tanzania. *BMC Infect Dis*. 2007; 7: 92-101.

- MSAL, Plan de Abordaje Integral de la Enfermedad Diarreica Aguda y Plan de Contingencia de Cólera. 2011. Disponible en :www.msal.gob.ar
- MSAL. Ministerio de Salud de la Nación. Dirección de Epidemiología, Área de Vigilancia. Boletín Integrado de Vigilancia Epidemiológica N°129, 2012.
- MSAL. Ministerio de Salud de la República Argentina, Ministerio de Agroindustria, Gobierno de la Ciudad de Buenos Aires, Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica. Informe de la República Argentina en respuesta a la solicitud de datos sobre *Escherichia coli* productor de verocitotoxina (VTEC)/*E. coli* productor de toxina de Shiga (STEC). FAO/OMS. Call for data on verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC)/shigatoxigenic *E. coli* (STEC). 47ª reunión del Comité Codex de higiene de los alimentos (CX/FH 15/47/1). Estados Unidos, 2015
- Mukherjee AK, Chowdhury P, Bhattacharya MK, Ghosh M, Rajendran K, Ganguly S. Hospital-based surveillance of enteric parasites in Kolkata. BMC Res Notes. 2009; 2: 110-8.
- Mukhopadhyay C, Wilson G, Pradhan D, Shivananda PG. Intestinal protozoal infestation profile in persistent diarrhea in children below age 5 years in western Nepal. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2007; 38: 13-9.
- Murray P, Baron E, Jorgensen J, Landry M, Pfaller M (eds): Manual of Clinical Microbiology 9th edition. ASM Press, 2007. Washington, United States.
- Nataro J, Steiner T, Guerrant R. Enteroaggregative *Escherichia coli*. Emerg Infect Dis. 1998, 4: 251-61.
- Nataro, JP, Deng Y, Maneval DR, German AL, Martin WC, Levine MM. Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEp-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. Infect Immun 1992; 60: 2297-304.
- Naumova E, Chen J, Griffiths J, Matyas B, Estes-smargiassi S, Morris R. Use of passive surveillance data to study temporal and spatial variation in the incidence of giardiasis and cryptosporidiosis. Publ Health Rep. 2000; 115(5): 436-47.

- Naumova E, Jagai J, Matyas B, DeMaria A, MacNeill I, Griffiths JK. Seasonality in six enterically transmitted diseases and ambient temperature. *Epidemiol Infect.* 2007; 135: 281-92.
- Nelson. Tratado de Pediatría. Kliegman RM, Behrman RE, Jenson HB, Stanton BF. 18.ª ed. Elsevier, 2008. Barcelona, España.
- Newman RD, Moore S, Lima A, Nataro J, Guerrant R, Sears C. A longitudinal study of *Giardia lamblia* infection in Northeast Brazilian children. *Trop Med Int Health.* 2001; 6: 624-34.
- Newman RD, Zu SX, Wuhib T, Lima AA, Guerrant RL, Sears CL. Household epidemiology of *Cryptosporidium parvum* infection in an urban community in northeast Brazil. *Ann Intern Med.* 1994; 120(6): 500-5.
- Neyro S, Rancaño C, Juárez M, Pasinovich M, Katz N, Devoto S. Impacto de la estrategia de vacunación contra Rotavirus sobre las diarreas agudas en menores de 5 años en Argentina. VI Congreso Internacional de Infectología Pediátrica y Vacunas. Resumen 141. 2017, Buenos Aires. Argentina.
- Nguyen RN, Taylor LS, Tauschek M, Robins-Browne R. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* infection and prolonged diarrhea in children. *Emerg Infect Dis.* 2006; 12(4): 597-603.
- Nitiema LW, Nordgren J, Ouermi D, Dianou D, Traore AS, Svensson L, Simporé J. Burden of rotavirus and other enteropathogens among children with diarrhea in Burkina Faso. *Int J Infect Dis.* 2011; 15(9): 646-52.
- Niyogi SK. Increasing antimicrobial resistance-an emerging problem in the treatment of shigellosis. *Clin Microbiol Infect.* 2007; 13: 1141-3.
- Notario R, Borda N, Gambande T, Sutich E. Species and serovars of enteropathogenic agents associated with acute diarrheal disease in Rosario, Argentina. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1996; 38(1): 5-7.
- Nunes MR, Mendes EN, Nunes J, Magalhães P, Penna F. Prevalence of *Salmonella enterica* in children aged less than 5 years with acute diarrhea and controls in Teresina-PI. *Bras Patol Med Lab.* 2012; 48(2): 105-8.
- Nutman TB. Looking beyond the induction of Th2 responses to explain immunomodulation by helminths. *Parasite Immunol.* 2015; 37(6): 304-13.

- Nweze EI. Aetiology of diarrhoea and virulence properties of diarrhoeagenic *Escherichia coli* among patients and healthy subjects in southeast Nigeria. *J Health Popul Nutr.* 2010; 28(3): 245-52.
- O’Ryan M, Prado V, Pickering L. A millenium update on pediatric diarrheal illness in the developing world. *Pediatr Infect Dis.* 2005; 12: 125-36.
- Ochoa TJ, Barletta F, Contreras C, Mercado E. New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008; 102: 852-6.
- Ochoa TJ, Salazar-Lindo E, Cleary TG. Management of children with infection-associated persistent diarrhea. *Semin Pediatr Infect Dis.* 2004; 15(4): 229-36.
- Oderiz S, Leotta GA, Galli L. Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in children treated at an inter-zonal pediatric hospital in the city of La Plata. *Rev Argent Microbiol.* 2018; 50(4): 341-50.
- Odoi A, Martin S, Michel P, Holt J, Middleton D, Wilson J. Geographical and temporal distribution of human giardiasis in Ontario, Canada. *Int J Health Geogr.* 2003; 2: 5-12.
- Ogilvie I, Khoury H, El Khoury AC, Goetghebeur MM. Burden of rotavirus gastroenteritis in the pediatric population in Central and Eastern Europe: serotype distribution and burden of illness. *Hum Vaccin.* 2011; 7: 523-33.
- Ogunlesi T, Okeniyi J, Oseni S, Oyelami O, Njokanma F, Dedeké O. Parasitic etiology of childhood diarrhea. *The Indian J Pediatr.* 2006; 73 (12): 1081-4.
- Okeke IN. Diarrheagenic *Escherichia coli* in sub-Saharan Africa: status, uncertainties and necessities. *J Infect Dev Ctries.* 2009; 3(11): 817-42.
- Okello AL, Thomas LF. Human taeniasis: current insights into prevention and management strategies in endemic countries *Risk Manag Health Policy.* 2017; 10: 107-16.
- Okhuysen P, DuPont H. Enterohaggard *Escherichia coli* (EAEC): a cause of acute and persistent diarrhea of worldwide importance. *The J Infect Dis.* 2010; 202(4): 503-5.
- Olds H, Corsi S, Dila D, Halmo K, Bootsma M, McLellan S. High levels of sewage contamination released from urban areas after storm events: A quantitative

- survey with sewage specific bacterial indicators. PLoS Med. 2018; 15(7): e1002614.
- OMS. Lucha contra las enfermedades transmitidas por el agua en los hogares. Red internacional para la promoción del tratamiento y el almacenamiento seguro del agua doméstica. 2007. Disponible en http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/43757/9789243595221_spa.pdf?sequence=1.
- OMS. Persistent diarrhoea in children in developing countries: memorandum from WHO meeting. Bull World Health Organ. 1988; 66(6): 709-717.
- Onanuga A, Igbeneghu O, Lamikanra A. A study of the prevalence of diarrhoeagenic *Escherichia coli* in children from Gwagwalada, Federal Capital Territory, Nigeria. The Pan Afric Med J. 2014; 17: 146-55.
- Onozuka D, Hagihara A. Nationwide variation in the effects of temperature on infectious gastroenteritis incidence in Japan. Nature. 2015; 5: 12932-99.
- Onozuka D, Hashizume M. Weather variability and paediatric infectious gastroenteritis. Epidemiol Infect. 2011; 139(9): 1369-78.
- Opintan JA, Newman MJ, Ayeh-Kumi PF, Afrim R, Gepi-Attee R, Sevilleja JE, Roche JK, Nataro JP, Warren CA, Guerrant RL. Pediatric diarrhea in southern Ghana: etiology and association with intestinal inflammation and malnutrition. Am J Trop Med Hyg. 2010; 83: 936-43.
- Osei FB, Stein A. Spatial variation and hot-spots of district level diarrhea incidences in Ghana: 2010–2014. BMC Public Health. 2017; 17: 617-28.
- Ostfeld RS, Glass GE, Keesing F. Spatial epidemiology: an emerging (or re-emerging) discipline. Trends Ecol Evol. 2005; 20: 328-36.
- Page AL, Hustache S, Luquero FJ, Djibo A, Manzo ML, Grais RF. Health care seeking behavior for diarrhea in children under 5 in rural Niger: results of a cross-sectional survey. BMC Public Health. 2011; 11: 389-96.
- Page AL, Hustache S, Luquero FJ, Djibo A, Manzo ML, Grais RF. Health care seeking behavior for diarrhea in children under 5 in rural Niger: results of a cross-sectional survey. BMC Public Health. 2011; 11: 389-96.
- Pakalniskiene J, Falkenhorst G, Lisby M, Madsen SB, Olsen KE, Nielsen EM, Mygh A, Boel J, Mølbak K. A foodborne outbreak of enterotoxigenic *E. coli* and

- Salmonella* Anatum infection after a highschool dinner in Denmark, November 2006. *Epidemiol Infect.* 2009; 137: 396-401.
- Paniagua M, Espinoza F, Ringman M, Reizenstein E, Svennerholm A, Hallander H. Analysis of incidence of infection with enterotoxigenic *Escherichia coli* in a prospective cohort study of infant diarrhea in Nicaragua. *J Clin Microbiol.* 1997; 35: 1404-10.
- Paolino L, Sebillio M, Cringoli G. Geographical Information Systems and online GIServices for health data sharing and management. *Parassitologia.* 2005; 47: 171-75.
- Parashar UD, Hummelman EG, Bresee JS, Miller MA, Glass RI. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis.* 2003; 9(5): 565-72.
- Pardhan-Ali A, Berke O, Wilson J, Edge V, Furgal C, Reid-Smith R, Santos M, McEwen SA. A spatial and temporal analysis of notifiable gastrointestinal illness in the Northwest Territories, Canada, 1991-2008. *Int J Health Geogr.* 2012; 11: 11-7.
- Park J, Kim JS, Kim S, Shin E, Oh K, Kim Y, Kim C, Hwang M, Jin C, Na K, Lee J, Cho E, Kang B, Kwak H, Seong W, Kim J. A waterborne outbreak of multiple diarrhoeagenic *Escherichia coli* infections associated with drinking water at a school camp. *Int J Infect Dis.* 2018; 66: 45-50.
- Parkes M, Panelli R, Weinstein P. Converging paradigms for environmental health theory and practice. *Environ Health Perspect.* 2003; 111: 669-75.
- Patil DP, Lava R. Identification, characterisation and antibiotic susceptibility of *Shigella* species isolated from stool samples in children. *Int J Biol Med Res.* 2012; 3(2): 1640-43.
- Patzi-Vargas S, Zaidi M, Perez-Martinez I, Leon-Cen M, Michel A, Chaussabel D, Estrada T. Diarrheagenic *Escherichia coli* carrying supplementary virulence genes are an important cause of moderate to severe diarrhoeal disease in Mexico. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015; 9(3): e0003510.
- Pawlowski SW, Warren CA, Guerrant R: Diagnosis and treatment of acute or persistent diarrhea. *Gastroenterology.* 2009; 136(6): 1874-86.

- Pazhani GP, Ramamurthy T, Mitra U, Bhattacharya SK, Niyogi SK. Species diversity and antimicrobial resistance of *Shigella* spp. isolated between 2001 and 2004 from hospitalized children with diarrhoea in Kolkata (Calcutta), India. *Epidemiol Infect.* 2005; 133: 1089-95.
- Peel MC, Finlayson BL, McMahon TA. Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. *Hydrol Earth Syst Sci.* 2007; 11(5): 1633-44.
- Petri W, Chapman M, Snodgrass T, Mann B, Broman J, Ravdin J. Subunit structure of the galactose and N-acetyl-D-galactosamine-inhibitable adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *J Biol Chem.* 1989; 264: 3007-12.
- Philipsborn R, Ahmed S, Brosi B, Levy K. Climatic drivers of diarrheagenic *Escherichia coli* incidence: a systematic review and meta-analysis. *J Infect Dis.* 2016; 214(1): 6-15.
- Pirsaheb M, Sharafi K, Ahmadi E, Moradi M. Prevalence of the waterborne diseases (diarrhea, dysentery, typhoid, and hepatitis A) in West of Iran during 5 years (2006–2010). *Ann Trop Med Public Health.* 2017; 10: 1524-8.
- Porat N, Levy A, Fraser D, Deckelbaum R, Dagan R. Prevalence of intestinal infections caused by diarrheagenic *Escherichia coli* in Bedouin infants and young children in Southern Israel. *Pediatr Infect Dis J.* 1998; 17(6): 482-8.
- Pradel N, Livrelli V, De Champs C, Palcoux J, Reynaud A, Scheutz F, Sirot J, Joly B, Forestier C. Prevalence and characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle, food, and children during a one-year prospective study in France. *J Clin Microbiol.* 2000; 38(3): 1023-31.
- Presterl E, Zwick R, Reichmann S, Aichelburg A, Winkler S, Kreamsner P, Graninger W. Frequency and virulence properties of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Gabon. *Am J Trop Med Hyg.* 2003; 69(4): 406-10.
- PROTECT. The Pediatric ROTavirus European CommitTee. The paediatric burden of rotavirus disease in Europe. *Epidemiol Infect.* 2006; 134: 908-16.
- Qadri F, Svennerholm A, Faruque A, Sack R. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. *Clin Microbiol Rev.* 2005; 18: 465-83.
- Qu M, Zhang X, Qian H, Lyu B, Huang Y, Yan H, Liang Z, Jia L, Wang Q. Study on the genotype and epidemic characteristics of diarrheagenic *Escherichia coli*

- isolated from diarrheal patients in Beijing. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*. 2014; 35(10): 1123-6.
- Quiroga M, Oviedo P, Chinen I, Pegels E, Husulak E, Binztein N, Rivas M, Schiavoni L, Vergara M. Asymptomatic infections by diarrheagenic *Escherichia coli* in children from Misiones, Argentina, during the first twenty months of their lives. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2000; 42: 9-15.
- Rajendran P, Ajjampur SS, Chidambaram D, Chandrabose G, Thangaraj B, Sarkar R, Samuel P, Rajan DP, Kang G. Pathotypes of diarrheagenic *Escherichia coli* in children attending a tertiary care hospital in South India. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010; 68(2): 117-22.
- Ramya Raghavan P, Roy S, Thamizhmani R, Sugunan AP. Diarrheagenic *Escherichia coli* infections among the children of Andaman Islands with special reference to pathotype distribution and clinical profile. *J Epidemiol Glob Health*. 2017; 7(4): 305-8.
- Rao MR, Abu-Elyazeed R, Savarino SJ, Naficy AB, Wierzba TF, Abdel-Messih I, Shaheen H, Frenck RW Jr, Svennerholm AM, Clemens JD. High disease burden of diarrhea due to enterotoxigenic *Escherichia coli* among rural Egyptian infants and young children. *J Clin Microbiol*. 2003; 41: 4862-4.
- Ravel A, Smolina E, Sargeant JM, Cook A, Marshall B, Fleury MD, Pollari F. Seasonality in human salmonellosis: assessment of human activities and chicken contamination as driving factors. *Foodborne Pathog Dis*. 2010; 7(7): 785-94.
- Rinaldi L, Musella V, Biggeri A, Cringoli G. New insights into the application of geographical information systems and remote sensing in veterinary Parasitology. *Geospat Health*. 2006; 1: 33-47.
- Rivas M, Masana M. Síndrome Urémico Hemolítico en Argentina. En *Temas de Zoonosis V*. Basualdo J, Cacchione R, Durlach R, Martino P, Seijo A (Eds). 2011. Ed. Asociación Argentina de Zoonosis. Buenos Aires, Argentina.
- Rivas M, Miliwebsky E, Chinen I, Deza N, Leotta GA. Epidemiología del síndrome urémico hemolítico en Argentina. Diagnóstico del agente etiológico, reservorios y vías de transmisión. *Medicina (B Aires)*. 2006; 66 (Supl III): 27-32.

- Rivas M, Padola NL, Luchessi P, Masana M. Diarrheagenic *Escherichia coli* in Argentina. En: Pathogenic *Escherichia coli* in Latin America. Torres A (Edit) 2010. Bentham Books. USA.
- Rivas M, Sosa-Estani S, Rangel J, Caletti MG, Valles P, Mead P. Risk factors associated with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections, Argentina. A Case–Control Study. 5° International Symposium and Workshop on Shiga toxin (Verocytotoxin) Producing *Escherichia coli* Infections. Resumen 5. 2003, Edinburgh, Great Britain.
- Rivas M, Sosa-Estani S, Rangel J, Caletti MG, Vallés P, Roldán CD, Balbi L, Marsano de Mollar MC, Amoedo D, Miliwebsky E, Chinen I, Hoekstra RM, Mead P, Griffin PM. Risk factors for sporadic Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in children, Argentina. *Emerg Infect Dis*. 2008; 14(5): 763-71.
- Riverón Corteguera RL. Fisiopatología de la diarrea aguda. *Rev Cub Pediatr*. 1999; 71(2): 86-115.
- Roberts T, Stark D, Harkness J, Ellis J. Update on the pathogenic potential and treatment options for *Blastocystis* sp. *Gut Pathog*. 2014; 6: 17-25.
- Robins-Browne RM, Holt KE, Ingle DJ, Hocking DM, Yang J, Tauschek M. Are *Escherichia coli* pathotypes still relevant in the era of whole-genome sequencing? *Front Cell Infect Microbiol*. 2016; 6: 141-50.
- Rodríguez-Angeles G. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Publica Mex*. 2002; 44: 464-75.
- Rogawski E, Guerrant R, Havt A, Lima I, Medeiros P, Seidman J, McCormick B, Babji S, Hariraju D, Bodhidatta L, Shrestha J, Anania J, Maro A, Samie A, Yori P, Qureshi S, Mahfuz M, Bessong P, Kosek M, Ahmed T, Bhutta Z, Lang D, Gottlieb M, Hout E, Lima A; MAL-ED Network Investigators. Epidemiology of enteroaggregative *Escherichia coli* infections and associated outcomes in the MAL-ED birth cohort. *PLoS Negl Trop D*. 2017; 11(7): e0005798.
- Rolfo F, Marin H, Silberman M, Pattin J, Giugno S, Gatti B, Bettioli M, Rigoni A. Epidemiological study of shigellosis in an urban area of Argentina. *J Infect Develop Ctries*. 2012; 6(4): 324-8.
- Ruiz-Palacios GM, Pérez-Schael I, Velázquez FR, Abate H, Breuer T, Clemens SC, Chevart B, Espinoza F, Gillard P, Innis BL, Cervantes Y, Linhares AC, López

- P, Macías-Parra M, Ortega-Barría E, Richardson V, Rivera-Medina DM, Rivera L, Salinas B, Pavía-Ruz N, Salmerón J, Rüttimann R, Tinoco JC, Rubio P, Nuñez E, Guerrero ML, Yarzabal JP, Damaso S, Tornieporth N, Sáez-Llorens X, Vergara RF, Vesikari T, Bouckennooghe A, Clemens R, De Vos B, O'Ryan M; Human Rotavirus Vaccine Study Group. Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *N Engl J Med*. 2006; 354(1): 11-22.
- Rüttler ME, Renna NF, Balbi L, García B, Guidone L, Fernández R, Puig O, Ortiz A. Characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from children with acute diarrhea, in Mendoza, Argentina. *Rev Arg Microbiol*. 2002; 34: 167-70.
- Rüttler ME. *Escherichia coli* enteroagregativa, su importancia como agente causante de diarrea infantil en Mendoza, Argentina. Colección Trabajos distinguidos, Serie Infectología. 2005; 8(1): 1-19. Disponible en: <http://trabajosdistinguidos.com/infectología/expertosinfecto81.php>
- Saboyá M, Catalá L, Ault S, Nicholls R. Prevalence and intensity of infection of Soil-transmitted Helminths in Latin America and the Caribbean Countries: Mapping at second administrative level 2000-2010. Ed. Pan American Health Organization. 2011. Washington, United States.
- Saha M, Saha D, Dutta P, Mitra U, Bhattacharya SK. Isolation of *Salmonella enterica* Serotypes from Children with Diarrhoea in Calcutta, India. *J Health Popul Nutr*. 2001; 19(4): 301-5.
- Sallon S, Deckelbaum RJ, Schmid I, Harlap S, Baras M, Spira D. *Cryptosporidium*, malnutrition, and chronic diarrhea in children. *Am J Dis Child*. 1988; 142: 312-5.
- Sang W, Oundo J, Mwituria J, Waiyaki P, Yoh M, Iida T, Honda T. Multidrug-resistant enteroaggregative *Escherichia coli* associated with persistent diarrhea in Kenyan children. *Emerg Infect Dis*. 1997; 3(3): 373-4.
- Sang WK, Boga H, Waiyaki P, Schnabel D, Wamae NC, Kariuki S. Prevalence and genetic characteristics of Shigatoxigenic *Escherichia coli* from patients with diarrhoea in Maasailand, Kenya. *J Infect Dev Ctries*. 2012; 6(2): 102-8.

- Santona S, Diaz N, Fiori PL, Francisco M, Sidat M, Cappuccinelli P, Rappelli P. Genotypic and phenotypic features of enteropathogenic *Escherichia coli* isolated in industrialized and developing countries. *J Infect Dev Ctries*. 2013; 7: 214-9.
- Santosham M, Sack RB, Reid R, Black R, Croll J, Yolken R, Aurelian L, Wolff M, Chan E, Garrett S, Froehlich J. Diarrhoeal diseases in the white mountain Apaches: epidemiologic studies. *J Diarrhoeal Dis Res*. 1995; 13: 18-28.
- Sarabia-Arce S, Salazar-Lindo E, Gilman RH, Naranjo J, Miranda E. Case-control study of *Cryptosporidium parvum* infection in Peruvian children hospitalized for diarrhea: possible association with malnutrition and nosocomial infection. *Pediatr Infect Dis*. 1990; 9: 627-31.
- Schaetti C. Vaccines for enteric diseases: update on recent developments. *Expert Rev Vaccines*. 2009; 8(12): 1653-5.
- Schär F, Trostorf U, Giardina F, Khieu V, Muth S, Marti H, Vounatsou P, Odermatt P. *Strongyloides stercoralis*. Global Distribution and Risk Factors. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013; 7(7): e2288.
- Scheutz F, Møller Nielsen E, Frimodt-Møller J, Boisen N, Morabito S, Tozzoli R, Nataro J, Caprioli A. Characteristics of the enteroaggregative Shigatoxin/verotoxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 strain causing the outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, May-June 2011. *Euro Surveill*. 2011; 16(24): 19889.
- Schilling KA, Omere R, Derado G, Ayers T, Ochieng JB, Farag TH, Nasrin D, Panchalingam S, Nataro JP, Kotloff KL, Levine M, Oundo J, Parsons MB, Bopp C, Laserson K, Stauber CE, Rothenberg R, Breiman RF, O'Reilly CE, Mintz ED. Factors Associated with the Duration of Moderate-to-Severe Diarrhea among Children in Rural Western Kenya Enrolled in the Global Enteric Multicenter Study, 2008-2012. *Am J Trop Med Hyg*. 2017; 97(1): 248-58.
- Schilling KA. Characteristics and Etiology of Moderate-to-Severe Diarrhea of Acute, Prolonged Acute, and Persistent Duration among Children Less than 5 Years Old in Rural Western Kenya, 2008-2010. Thesis, Georgia State University, 2010. Estados Unidos.

- Schorling JB, Wanke CA, Schorling SK, McAuliffe JF, de Souza MA, Guerrant RL. A prospective study of persistent diarrhea among children in an urban Brazilian slum. Patterns of occurrence and etiologic agents. *Am J Epidemiol.* 1990; 132(1): 144-56.
- Seguí R, Klisiowicz D, Oishi C, Toledo R, Esteban J, Muñoz-Antolí C. Intestinal symptoms and *Blastocystis* load in schoolchildren of Paranaguá Bay, Paraná, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 2017; 59: 86-9.
- Shah N, DuPont HL, Ramsey DJ. Global etiology of travelers' diarrhea: systematic review from 1973 to the present. *Am J Trop Med Hyg.* 2009; 80: 609-14.
- Shane A, Mody RK, Crump JA, Tarr PI, Steiner TS, Kotloff K, Langley JM, Wanke C, Warren C, Cheng AC, Cantey J, Pickering LK. 2017 Infectious Diseases Society of America Clinical Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Infectious Diarrhea. *Clin Infect Dis.* 2017; 65(12): e45–e80.
- Sharaf EF, Shabana II. Prevalence and molecular characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from human and sheep in Al-Madinah Al-Munawarah. *Infectio.* 2016; 1: 81-7.
- Sherris. *Medical Microbiology.* Ryan K, Ray CG (eds). 5ª edición. 2010. McGraw-Hill. New York, United States.
- Shields J, Gleim E, Beach M. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. and *G. intestinalis* in swimming pools, Atlanta, Georgia. *Emerg Infect Dis.* 2008; 14: 948-51.
- Shrivastava AK, Kumar S, Mohakud NK, Suar M, Sahu PS. Multiple etiologies of infectious diarrhea and concurrent infections in a pediatric outpatient-based screening study in Odisha, India. *Gut Pathog.* 2017; 9: 16. doi: 10.1186/s13099-017-0166-0.
- Silva T, Nogueira PA, Magalhães GF, Fagundes Grava A, Pereira L, Puccinelli P. Characterization of *Shigella* spp. by antimicrobial resistance and PCR detection of ipa genes in an infantile population from Porto Velho (Western Amazon region), Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008; 103(7): 731-3.
- Singhi S, Gupta G, Vivek J. Comparison of pediatric emergency patients in a tertiary care hospital vs a community hospital. *Indian Pediatr.* 2004; 41(1): 67-72.

- Slinger R, Lau K, Slinger M, Moldovan I, Chan F. Higher atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (a-EPEC) bacterial loads in children with diarrhea are associated with PCR detection of the EHEC factor for adherence 1/lymphocyte inhibitory factor A (efa1/lifa) gene. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2017; 16: 16-22.
- Snel SJ, Baker MG, Venugopal K. The epidemiology of cryptosporidiosis in New Zealand, 1997–2006. *New Zealand Med J.* 2009; 122(1290): 47-61.
- Socías ME, Fernández A, Gil JF, Krolewiecki AJ. Soil transmitted helminthiasis in Argentina. A systematic review. *Medicina (B Aires).* 2014; 74(1): 29-36.
- Söderblom T, Oxhamre C, Wai S, Uhlén P, Aperia A, Uhlin BE, Richter-Dahlfors A. Effects of the *Escherichia coli* toxin cytolysin A on mucosal immunostimulation via epithelial Ca²⁺ signalling and Toll-like receptor 4. *Cell Microbiol.* 2005; 7(6): 779-88.
- Sommerfelt H, Steinsland H, Grewal HM, Viboud GI, Bhandari N, Gaastra W, Svennerholm A, Bhan M. Colonization factors of enterotoxigenic *Escherichiacoli* isolated from children in north India. *J Infect Dis.* 1996; 174: 768-76.
- Sonntag AK, Prager R, Bielaszewska M, Zhang W, Fruth A, Tschäpe H, Karch H. Phenotypic and genotypic analyses of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O145 strains from patients in Germany. *J Clin Microbiol.* 2004; 42(3): 954-62.
- Soriano S, Manacorda A, Pierangeli N, Navarro M, Gyayetto A, Barbieri L, Lazzarini L, Minvielle M, Grenovero M, Basualdo J. Intestinal parasitosis in relation to socioeconomic factors and habitat conditions in children of Neuquen, Patagonia, Argentina. *Parasitol Latinoam.* 2005; 60: 154-61.
- Stark D, van Hal S, Marriott D, Ellis J, Harkness J. Irritable bowel syndrome: A review on the role of intestinal protozoa and the importance of their detection and diagnosis. *Int J Parasitol.* 2007; 37: 11-20.
- Steiner TS, Lima AA, Nataro JP, Guerrant R. Enteroaggregative *Escherichia coli* produce intestinal inflammation and growth impairment and cause interleukin-8 release from intestinal epithelial cells. *J Infect Dis.* 1998; 177(1): 88-96.

- Stensvold CR, Christiansen D, Pribil Olsen K, Nielsen H. *Blastocystis* sp. Subtype 4 is common in danish *Blastocystis*-positive patients presenting with acute diarrhea. *Am J Trop Med Hyg*. 2011; 84(6): 883-5.
- Stensvold CR. *Blastocystis*: genetic diversity and molecular methods for diagnostic and epidemiology. *Trop Parasitol*. 2013; 3(1): 26-34.
- Stenzel D, Boreham P. *Blastocystis hominis* revisited. *Clin Microbiol Rev*. 1996; 9: 563-84.
- Stephenson LS, Crompton DW, Latham MC, Arnold SE, Jansen AA. Evaluation of a Four Year Project to control *Ascaris* infection in children in two Kenyan villages. *J Trop Pediatr*. 1983; 29:175-84.
- Steyert SR, Sahl JW, Fraser CM, Teel LD, Scheutz F, Rasko DA. Comparative genomics and *stx* phage characterization of LEE-negative Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2012; 2: 133-51.
- Stockmann C, Pavia A, Graham B, Vaughn M, Crisp R, Poritz M, Thatcher S, Korgenski E, Barney T, Daly J, Rogatcheva M. Detection of 23 Gastrointestinal Pathogens Among Children Who Present With Diarrhea. *J Pediatric Infect Dis Soc*. 2017; 6(3): 231-8.
- Strand T, Sharma P, Gjessing H, Ulak M, Chandyo R, Sommerfelt H. Risk Factors for Extended Duration of Acute Diarrhea in Young Children. *PLoS ONE*. 2012; 7: e36436.
- Svenungsson B, Lagergren A, Ekwall E, Evengård B, Hedlund KO, Kärnell A, Löfdahl S, Svensson L, Weintraub A. Enteropathogens in adult patients with diarrhea and healthy control subjects: a 1-year prospective study in a Swedish clinic for infectious diseases. *Clin Infect Dis*. 2000; 30(5): 770-8.
- Tam C, Rodrigues L, O'Brien S, Hajat S. Temperature dependence of reported *Campylobacter* infection in England, 1989-1999. *Epidemiol Infect*. 2006; 134: 119-25.
- Tamaki Y, Narimatsu H, Miyazato T, Nakasone N, Higa N, Toma C, Iwanaga M. the relation ship between o- antigens and pathogenicgenes of diarrhea-associated *Escherichia coli*. *Jpn J Infect Dis*. 2005; 58(2): 65-9.

- Tamura K, Sakazaki R, Murase M, Kosako Y. Serotyping and categorisation of *Escherichia coli* strains isolated between 1958 and 1992 from diarrhoeal diseases in Asia J Med Microbiol. 1996; 45: 353-8.
- Taneja N. Changing epidemiology of shigelosis and emergence of ciprofloxacin-resistant *Shigellae* in India. J Clin Microbiol. 2007; 45(2): 678-9.
- Tang F, Cheng Y, Bao C, Hu J, Liu W, Liang Q, Wu Y, Norris J, Peng Z, Yu R, Shen H, Chen F. Spatio-temporal trends and risk factors for *Shigella* from 2001 to 2011 in Jiangsu Province, People's Republic of China. PloS One. 2014; 9(1): e83487.
- Thapar N, Sanderson IR. Diarrhoea in children: an interface between developing and developed countries. Lancet. 2004 21; 363(9409): 641-53.
- Tian L, Zhu X, Chen Z, Liu W, Li S, Yu W, Zhang W, Xiang X, Sun Z. Characteristics of bacterial pathogens associated with acute diarrhea in children under 5 years of age: a hospital-based cross-sectional study. BMC Infect Dis. 2016; 16: 253-61.
- Tilak GP, Mudaliar JG. Role of Enteropathogenic *Escherichia coli* in Paediatric Diarrhoeas in South India. Mat Soc Med. 2012, 24(3): 178-81.
- Tobias J, Kassem E, Rubinstein U, Bialik A, Vutukuru SR, Navaro A, Rokney A, Valinsky L, Ephros M, Cohen D, Muhsen K. Involvement of main diarrheagenic *Escherichia coli*, with emphasis on enteroaggregative *E. coli*, in severe non-epidemic pediatric diarrhea in a high-income country. BMC Infect Dis. 2015; 15: 79-85.
- Tobias J, Von Mentzer A, Loayza Frykberg P, Aslett M, Page A, Sjöling Å, Svennerholm A. Stability of the Encoding Plasmids and Surface Expression of CS6 Differs in Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) Encoding Different Heat-Stable (ST) Enterotoxins (STh and STp). PLoS ONE 2016; 11(4): 1-12.
- Torres M, Pírez M, Schelotto F, Varela G, Parodi V, Allende F, Falconi E, Dell'Acqua L, Gaione P, Méndez M, Ferrari A, Montano A, Zanetta E, Acuña A, Chiparelli H, Ingold E. Etiology of Children's Diarrhea in Montevideo, Uruguay: Associated Pathogens and Unusual Isolates. J Clin Microbiol. 2001; 39: 2134-39.








- Trabulsi LR, Keller R, Tardelli Gomes TA. Typical and Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis*. 2002; 8: 508-13.
- Treviño N, Accorinti A, Chiodini J, Avellaneda M, Ziallorenzo M, Arregui M, Saab L, Gonzalez S, Palau J. Introducción de la vacuna de rotavirus: vigilancia epidemiológica en un hospital pediátrico. Congreso SADIP. Resumen 150. 2018. Buenos Aires. Argentina.
- Tumwine JK, Kekitiinwa A, Bakeera-Kitaka S, Ndeezi G, Downing R, Feng X, Akiyoshi DE, Tzipori S. *Cryptosporidium parvum* in children with diarrhea in Mulago Hospital, Kampala, Uganda. *Am J Trop Med Hyg*. 2003; 68: 710-5.
- Uhnou I, Wadell G, Svensson L, Olding E, Ekwall E, Mollby R. Aetiology and epidemiology of acute gastroenteritis in Swedish children. *J Infect*. 1986, 13:73-89.
- Urbani C, Palmer K. Drug-based helminth control in western Pacific countries: a general perspective. *Trop Med Int Health*. 2001; 6: 935-44.
- Urio EM, Collison EK, Gashe BA, Sebunya TK, Mpuchane S. *Shigella* and *Salmonella* strains isolated from children under 5 years in Gaborone, Botswana, and their antibiotic susceptibility patterns. *Trop Med Int Health*. 2001; 6: 55-9.
- Valcour JE, Charron DF, Berke O, Wilson JB, Edge T, Waltner-Toews D. A descriptive analysis of the spatio-temporal distribution of enteric diseases in New Brunswick, Canada. *BMC Public Health*. 2016; 16: 204-18.
- Valcour JE, Michel P, McEwen SA, Wilson JB. Associations between indicators of livestock farming intensity and incidence of human Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection. *Emerg Infect Dis*. 2002; 8: 252-7.
- van Duynhoven Y, Friesema I, Schuurman T, Roovers A, van Zwet A, Sabbe L, van der Zwaluw W, Notermans D, Mulder B, van Hannen E, Heilmann F, Buiting A, Jansen R, Kooistra-Smid A. Prevalence, characterisation and clinical profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in The Netherlands. *Clin Microbiol Infect*. 2008; 14: 437-45.
- Vapnarsky CA, Gorojovsky N. El crecimiento urbano en la Argentina. Grupo Editor Latinoamericano IIED. Colección Estudios Políticos y Sociales. 1990.
- Varela G, Batthyány L, Bianco MN, Pérez W, Pardo L, Algorta G, Robino L, Suárez R, Navarro A, Pérez MC, Schelotto F. Enteropathogens associated with acute

- diarrhea in children from households with high socioeconomic level in Uruguay. *Int J Microbiol*. 2015; 592953: 1-8.
- Varela G, Jasinski C, Gadea P, Tanzi M, Mota M, Arenas C, Pardo L, González S, González G, Sirok A, Schelotto F. *Escherichia coli* enteropatógeno asociado a casos de diarrea en niños usuarios del Hospital Pereira Rossell. Aspectos clínicos y características de las cepas involucradas. *Rev Med Urug*. 2007; 23: 153-63.
- Vargas M, Gascón J, Gallardo F, Jimenez M, Vila J. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains detected by PCR in patients with travelers' diarrhea. *Clin Microbiol Infect*. 1998; 4(12): 682-9.
- Velázquez G, Lan D, Nogar G. Tandil a fin del milenio. Una Perspectiva geográfica. Centro de Investigaciones Geográficas (CIG). Facultad de Ciencias Humanas-Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. Tandil, Pcia. de Bs. As. 1998.
- Viboud G, Jouve MJ, Binsztein N, Vergara M, Rivas M, Quiroga M, Svennerholm A. Prospective cohort study of enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in Argentinean children. *J Clin Microbiol*. 1999; 37: 2829-33.
- Vidal M, Kruger E, Durán C, Lagos R, Levine M, Prado V, Toro C, Vidal R. Single multiplex PCR assay to identify simultaneously the six categories of diarrheagenic *Escherichia coli* associated with enteric infections. *J Clin Microbiol*. 2005; 43(10): 5362-5.
- Villena J, Vizoso-Pinto MG, Kitazawa H. Intestinal Innate Antiviral Immunity and Immunobiotics: Beneficial Effects against Rotavirus Infection. *Front. Immunol*. 2016; 7:563-573.
- Vithayasai N, Jennuvat S. Persistent diarrhea: 15 years experience at a tertiary care hospital. *J Med Assoc Thai*. 2014; 97 Suppl 6: S95-100.
- von Schirnding YE, Yach D, Blignault R, Mathews C. Environmental determinants of acute respiratory symptoms and diarrhoea in young coloured children living in urban and peri-urban areas of South Africa. *S Afr Med J*. 1991; 79(8): 457-61.
- Wahl E, Vold L, Lindstedt B, Bruheim T, Afset J. Investigation of an *Escherichia coli* O145 outbreak in a child daycare centre-extensive sampling and

- characterization of *eae* and *stx1* positive *E. coli* yields epidemiological and socioeconomic insight. *BMC Infect Dis.* 2011; 11: 238-50.
- Walker CL, Black RE. Diarrhoea morbidity and mortality in older children, adolescents, and adults. *Epidemiol Infect.* 2010; 138(9): 1215-26.
- Wang X, Wang J, Sun H, Xia S, Duan R, Liang J, Xiao Y, Qiu H, Shan G, Jing H. Etiology of Childhood Infectious Diarrhea in a Developed Region of China: Compared to Childhood Diarrhea in a Developing Region and Adult Diarrhea in a Developed Region. *PLoS One.* 2015; 10(11): e0142136.
- Wei ZQ, Chang HL, Li YF, Xu XB, Zeng M. Clinical epidemiology and antimicrobial resistance of nontyphoidal *Salmonella* enteric infections in children: 2012-2014. *Zhonghua Er Ke Za Zhi.* 2016; 54(7): 489-95.
- Weiler N, Orrego M, Alvarez M, Huber C. Detección molecular de *Escherichia coli* diarreogénica en pacientes pediátricos con síndrome diarreico agudo en Paraguay. *Mem Inst Investig Cienc Salud.* 2017; 15(1): 16-21.
- Weintraub A. Enteroagregativa *Escherichia coli*: epidemiology, virulence and detection. *J Med Microbiol.* 2007; 56: 4-8.
- WHONET. Red Argentina de WHO. XVII Taller WHONET-Argentina. 2016.
- Wilhelmi de Cal I, Mohedano del Pozo RB y Sánchez-Fauquier A. Rotavirus y otros virus productores de gastroenteritis aguda en la infancia. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2008; 26: 61-5.
- Xiao H, Ma S, Qi H, Li X, Wang Y, Yin C. A scoring system for assessing the severity of acute diarrhea of adult patients. *World J Emerg Med.* 2016; 7(2): 130-34.
- Xu Z, Hu W, Zhang Y, Wang X, Zhou M, Huang C, Tong S, Guo Q. Exploration of diarrhoea seasonality and its drivers in China. *Sci Rep.* 2015; 5: 8241-50.
- Yang H, Chen G, Zhu Y, Liu Y, Cheng J, Hu L, Ye Y, Li J. Surveillance of antimicrobial susceptibility patterns among *Shigella* species isolated in China during the 7-year period of 2005-2011. *Ann Lab Med.* 2013; 33(2): 111-5.
- Youssef M, Shurman A, Bougnoux M, Rawashdeh M, Bretagne S, Strockbine N. Bacterial, viral and parasitic enteric pathogens associated with acute diarrhea in hospitalized children from northern Jordan. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2000; 28(3): 257-63.

- Yu J, Jing H, Lai S, Xu W, Li M, Wu J, Liu W, Yuan Z, Chen Y, Zhao S, Wang X, Zhao Z, Ran L, Wu S, Klena JD, Feng L, Li F, Ye X, Qiu Y, Wang X, Yu H, Li Z, Yang W. Etiology of diarrhea among children under the age five in China: Results from a five-year surveillance. *J Infect.* 2015; 71(1): 19-27.
- Zaidi M, Estrada-García T, Campos F, Chim R, Arjona F, Leon M, Michell A, Chaussabe D. Incidence, clinical presentation, and antimicrobial resistance trends in *Salmonella* and *Shigella* infections from children in Yucatan, Mexico. *Front Microbiol.* 2013; 4: 1-10.
- Zhang S, Zhou Y, Xu W, Tian LG, Chen JX, Chen S, Dang Z, Gu W, Yin J, Serrano E, Zhou X. Impact of co-infections with enteric pathogens on children suffering from acute diarrhea in southwest China. *Inf Dis Poverty.* 2016 27; 5: 64-77.
- Zhao Y, Zhu Y, Zhu Z, Qu B. Association between meteorological factors and bacillary dysentery incidence in Chaoyang city, China: an ecological study. *BMJ Open* 2016; 6: e013376.
- Zhou Y, Zhu X, Hou H, Lu Y, Yu J, Mao L, Mao L, Sun Z. Characteristics of diarrheagenic *Escherichia coli* among children under 5 years of age with acute diarrhea: a hospital based study. *BMC Infect Dis.* 2018; 18: 63-73.
- Zonta ML, Oyhenart EE, Navone GT. Nutritional status, body composition, and intestinal parasitism among the Mbya Guarani communities of Misiones, Argentina. *Am J Hum Biol.* 2010; 22: 193-200.
- Zotta CM. Portación de *Escherichia coli* en convivientes de casos de síndrome urémico hemolítico. *Salud(i)Ciencia.* 2015; 21: 136-41.

ANEXO I: Escala de Bristol

TABLA DE HECES DE BRISTOL				
TIPO	1		Pedazos duros y separados, como nueces	Estreñimiento severo
TIPO	2		Consistencia brumosas como una salchicha	Estreñimiento leve
TIPO	3		Forma de salchicha con una superficie agrietada	Normal
TIPO	4		Forma de salchicha, suave y casi como una serpiente	Normal
TIPO	5		Trozos de masa suaves con bordes bien definidos	Falta de fibra
TIPO	6		Consistencia blanda con bordes irregulares	Diarrea leve
TIPO	7		Consistencia líquida sin pedazos sólidos	Diarrea severa



GLOBAL HEALING CENTER

ANEXO II: Preparación de buffers para biología molecular

1. Buffer Tris-EDTA (TE)

a-Solución Tris-EDTA (TE) 1X pH 8

- Tris- HCl 1M (pH 8): 10 ml

- EDTA 0,5 M (pH 8): 2 ml

-Vol. Final: 1000 ml, Autoclavar

Solución de trabajo 1X pH 7: llevar la solución de trabajo 1X pH 8 a pH 7 con solución diluida de ácido HCl.

b-Solución Tris- HCl 1M (pH 8)

-Tris base: 121,1 g

-HCl 6 N: 80 ml

-Vol final: 1000 ml

Ajustar a pH 8

c-Buffer EDTA 0,5 M (pH 8)

-EDTA: 186,1 g

-Vol final: 1000 ml

Ajustar a pH 8

2. Buffer Tris-Acetato EDTA (TAE)

Solución concentrada 50X

-Tris base 242 g

-Ácido acético glacial 57,1ml

-0,5 M EDTA (pH 8) 100 ml

-Vol. Final: 1000 ml.

Solución de trabajo 1X: se realiza una dilución 1:50 de la solución 50X.

3. Tritón X-100 al 1% en buffer TE 1X.

- Buffer TE 1X 50 ml (estéril)

- Tritón X-100 0,5 ml

Dispensar el Tritón (no estéril) en el buffer TE 1X (estéril) y mezclar para homogenizar.

4. Buffer de siembra para electroforesis

- Glicerol 30% 30 ml

- Xilene cyanol 0,25% 0,25 g

- Agua estéril 70 ml

- Agua estéril 70 ml

ANEXO III: Coloraciones permanentes para el estudio parasitario

Coloración de Ziehl Neelsen

Los extendidos fecales se dejaron secar al aire y se cubrieron con Carbofucsina (Solución A: 4g de fucsina básica en 20 ml de etanol al 95% y Solución B: 8 g de Fenol en 100 ml de agua destilada). Con un hisopo encendido se calentó el frotis hasta la emisión de vapores blancos, se dejó 5 minutos y se lavó con agua. La decoloración se realizó con ácido sulfúrico al 5% durante 30 segundos, luego se lavó y se tiñó con solución de azul de metileno al 0,3% durante 1 minuto. El extendido se lavó, dejó secar y se observó en microscopio con objetivo de inmersión (100 X).

Coloración de Safranina-Azul de Metileno

Los extendidos se dejaron secar al aire y se fijaron con una solución de HCl al 3% y metanol (7ml de HCl concentrado en 93ml de metanol) durante 4 minutos. El extendido se lavó y se cubrió con safranina al 1% durante 1 minuto. Con un hisopo encendido se calentó el frotis hasta la emisión de vapores blancos, se lavó y se cubrió con solución de azul de metileno al 1% durante 1 minuto. Los extendidos se lavaron, dejaron secar y se observaron en microscopio con objetivo de inmersión (100 X)

Coloración Tricrómica modificada de Ryan

Los extendidos se dejaron secar al aire y se fijaron con metanol absoluto por 5 minutos. Luego se cubrieron con Solución Tricrómica: Cromotropo 2R (6 g), azul de anilina (0,5 g), ácido fosfotúngstico (0,7 g), Ácido Acético glacial (3ml) y Agua destilada (100ml), ajustando el pH a 2,5 con solución 1,0M de HCl. Los extendidos se sumergieron en la solución durante 90 minutos. La decoloración se realizó con alcohol ácido (Etanol 90% y Ácido Acético glacial) durante 10 segundos. Los extendidos fueron sumergidos varias veces en mezclas de alcohol-agua. Los extendidos se lavaron, dejaron secar y se observaron en microscopio con objetivo de inmersión (100 X).

Coloración Gram Cromotropo

Esta coloración combina la tinción de Gram con la Tinción Tricrómica en caliente. Los extendidos se dejaron secar al aire y se fijaron con calor. Luego se cubrieron con Violeta de Genciana y después con Lugol durante 30 segundos cada paso. Los extendidos se decoloraron con Etanol (98%) y se colocaron en la solución cromotrópica de Weber a 55°C durante 1 minuto. Luego se realizan dos lavados, uno con Etanol (95%) y otro con Etanol absoluto, durante 30 segundos cada uno. Los extendidos se lavaron, dejaron secar y se observaron en microscopio con objetivo de inmersión (100 X).

ANEXO IV: Datos climáticos y topográficos de la región en estudio

Variables climáticas mensuales promedio de Tandil* según estación del año.				
Variables climáticas (valores promedio)	Estación del año			
	primavera	verano	otoño	invierno
Temperatura media (°C)	12,8	19,6	13,5	7,6
Temperatura mínima (°C)	6,2	11,8	7,3	2,4
Temperatura máxima (°C)	19,5	27,6	19,7	12,9
Precipitaciones (mm)	73	88	76	45

*Coordenadas de la ciudad de Tandil: Latitud (-37,32) y Longitud (-59,15).
 Datos climáticos históricos recolectados en el período 1980-2016.
 ©Climate-Data.org y OpenStreetMap.org. Licencia de Open Data Commons, Open Database License (ODbL). Disponible en <https://es.climate-data.org/location/1922/>

Mapa topográfico de Tandil:

<http://es-ar.topographic-map.com/places/Tandil-237810/>

Índice de Tablas

TABLA	TÍTULO	PÁGINA
Tabla 1.1	Principales patógenos bacterianos y características clínicas de la infección entérica	34
Tabla 1.2	Principales patógenos parasitarios y características clínicas de la infección entérica	35
Tabla 2.1	Operacionalización de la variable en estudio	63
Tabla 2.2	Equipamiento e instrumental de laboratorio utilizado en la tesis	64
Tabla 2.3	Información demográfica y clínica de los pacientes con diarrea	65
Tabla 2.4	Categorías de las heces según presencia de leucocitos y hematíes fecales	67
Tabla 2.5	Genes, primers, secuencias y tamaño de los fragmentos amplificados para mPCR1	77
Tabla 2.6	Cepas control utilizadas en la PCR múltiple 1 (mPCR-1)	78
Tabla 2.7	Protocolo de amplificación mPCR-1	78
Tabla 2.8	Genes, primers, secuencias y tamaño de los fragmentos amplificados para mPCR2	79
Tabla 2.9	Cepas control utilizadas en la PCR múltiple 2 (mPCR-2)	79
Tabla 2.10	Protocolo de amplificación mPCR-2	79
Tabla 3.1	Distribución de los niños según duración temporal de la diarrea	91
Tabla 3.2	Duración temporal del cuadro diarreico de los niños según tipo de diarrea	93
Tabla 3.3	Características de las heces según la presencia de leucocitos y hematíes fecales	96
Tabla 3.4	Frecuencia de bacterias patógenas identificadas mediante cultivo y serología	97
Tabla 3.5	Perfil de resistencia a los antimicrobianos en aislamientos de <i>Shigella</i> spp.	99
Tabla 3.6	Factores de virulencia bacterianos investigados por métodos moleculares	103
Tabla 3.7	Frecuencia de patotipos de <i>Escherichia coli</i> diarreigénicos identificados por PCR	108
Tabla 3.8	Caracterización molecular y serotípica de los aislamientos STEC	111
Tabla 3.9	Frecuencia de infección intestinal de niños con diarrea según etiología y número de agentes patógenos	114
Tabla 3.10	Datos demográficos, manifestaciones clínicas y hallazgos de laboratorio en niños con diarrea	117
Tabla 3.11	Frecuencia de infección según edad de los niños con diarrea	118
Tabla 3.12	Frecuencia de infección de niños con diarrea según etiología y duración temporal del cuadro diarreico	119
Tabla 3.13	Presencia de patógenos intestinales en niños con diarrea según estación del año	131
Tabla 3.14	Patógenos entéricos en niños con diarrea persistente	134

Índice de figuras

FIGURA	TÍTULO	PÁGINA
Figura 1.1	Tasa de mortalidad por enfermedades diarreicas en niños menores de 5 años. Población mundial.	24
Figura 1.2	Tasa de diarreas agudas por 100.000 habitantes. Argentina.	25
Figura 1.3	Clasificación de las diarreas según su duración temporal	27
Figura 1.4	Mecanismos de adherencia y lesión intestinal de <i>Escherichia coli</i> diarreigénica	37
Figura 1.5	Mecanismos de adherencia y lesión intestinal. A: <i>G. intestinalis</i> , <i>Cryptosporidium</i> spp. y <i>E. histolytica</i> . B: <i>Blastocystis</i> spp.	38
Figura 1.6	Mecanismo de acción de las toxinas LT, ST y toxinas Shiga	40
Figura 1.7	Mecanismo de injuria inflamatoria causada por Rotavirus	41
Figura 1.8	Mapa de Tandil. A: regiones urbanas periférica, central y sur en base a dimensiones socioeconómica, habitacional y espacial. B: líneas de transporte urbano. C: área urbana con suministro de gas de red. D: área urbana con red de desagües cloacales. E: establecimientos educativos de la ciudad	48
Figura 1.9	Fotografías de la región central y sur de Tandil	49
Figura 1.10	Fotografías de la región periférica de Tandil	49
Figura 1.11	Mapa de Tandil con la ubicación geográfica de los barrios populares y las características demográficas y socioeconómicas de la población que habita en dichos barrios	50
Figura 1.12	Mapa de la región sanitaria VIII, provincia de Buenos Aires	51
Figura 1.13	Fotografía del frente del Hospital de Niños Debilio Blanco Villegas de Tandil	51
Figura 1.14	Mapa de Tandil. Ubicación geográfica del Hospital Debilio Blanco Villegas	52
Figura 1.15	Mapa de la clasificación de los climas. Izquierda: Sudamérica. Derecha: detalle de la región en estudio	54
Figura 2.1	Mapa de Argentina y de la provincia de Buenos Aires	58
Figura 2.2	Mapa topográfico de la ciudad de Tandil y sus alrededores.	59
Figura 2.3	Algoritmo de procesamiento de las muestras para el estudio macroscópico y microscópico de las heces	66
Figura 2.4	Algoritmo de procesamiento de las muestras para la detección de agentes bacterianos productores de diarrea	67

Figura 2.5	Identificación bacteriana mediante métodos automatizados. Detalle de preparación de suspensiones bacterianas y acondicionamiento de materiales necesarios para el procedimiento	69
Figura 2.6	Identificación bacteriana mediante métodos automatizados. Detalle de tarjetas individuales para identificación y antibiograma automatizado Vitek2	69
Figura 2.7	Identificación bacteriana mediante métodos inmunológicos	70
Figura 2.8	Algoritmo general de diagnóstico molecular de las cepas DEC	72
Figura 2.9	Algoritmo detallado de diagnóstico molecular de las cepas DEC	73
Figura 2.10	Algoritmo de repique y extracción de ADN, proveniente de la zona de confluencia bacteriana	74
Figura 2.11	Algoritmo de repique y extracción de ADN, proveniente de 10 colonias bacterianas aisladas	75
Figura 2.12	Fotografías del procedimiento de amplificación génica	76
Figura 2.13	Algoritmo de identificación de virus entéricos	81
Figura 2.14	Equipo diagnóstico para la detección de antígenos virales en heces	82
Figura 2.15	Algoritmo de procesamiento de las muestras para la detección de protozoos intestinales	82
Figura 2.16	Algoritmo de procesamiento de las muestras para la detección de helmintos intestinales	83
Figura 2.17	Procesamiento de muestras fecales por flotación y sedimentación	84
Figura 2.18	Detalle de cultivo de larvas parasitarias en Agar Tripteina Soya (ATS)	86
Figura 3.1	Perfil demográfico de los niños con diarrea. Número de niños con diarrea estudiados según grupo etario	90
Figura 3.2	Número de casos de diarrea según edad y duración temporal del cuadro	91
Figura 3.3	Frecuencia de casos según tipo de diarrea y grupo etario	92
Figura 3.4	Diagrama de cajas y bigotes (<i>box-plot</i>) sobre la duración de la diarrea según edad de los niños	93
Figura 3.5	Diagrama de cajas y bigotes (<i>box-plot</i>) sobre la duración de la diarrea según estación del año	93
Figura 3.6	Número de días con diarrea y contribución porcentual al total de días con diarrea para los cuadros agudos, prolongados y persistentes	94
Figura 3.7	Manifestaciones clínicas de los niños con diarrea según el grupo etario y el tipo de diarrea	95
Figura 3.8	Proporción de niños con cada tipo de diarrea según las categorías de la Escala de Bristol	96

Figura 3.9	Frecuencia de niños con cada tipo de diarrea según la presencia de leucocitos y/o hematíes en las heces	97
Figura 3.10	Fotografías de cultivos bacterianos de <i>Shigella</i> spp. y <i>Salmonella</i> spp. provenientes de niños con diarrea	98
Figura 3.11	Fotografías de cultivos bacterianos de <i>Escherichia coli</i> provenientes de niños con diarrea	98
Figura 3.12	Prueba inmunológica para identificación de <i>Shigella flexneri</i> proveniente de cultivo de un niño con diarrea	98
Figura 3.13	Fotografías del cultivo bacteriano primario obtenido de un niño con diarrea	100
Figura 3.14	Fotografías de cultivos bacterianos primarios y secundarios en Agar MacConkey obtenidos de un niño con diarrea	100
Figura 3.15	Fotografías de cultivos primarios de heces en Agar MacConkey y Chrom-Agar obtenidas de niños con diarrea	101
Figura 3.16	Fotografías de cultivos bacterianos primarios y secundarios en agar MacConkey obtenidos de niños con diarrea	101
Figura 3.17	Fotografía de los productos de amplificación de factores de virulencia de <i>Escherichia coli</i> en gel de agarosa con cepas control	102
Figura 3.18	Fotografía de los productos de amplificación de los factores de virulencia de <i>Escherichia coli</i> .	104
Figura 3.19	Fotografía de los productos de amplificación de los factores de virulencia de <i>Escherichia coli</i> diarraigénica mediante PCR múltiples.	105
Figura 3.20	Fotografía de los productos de amplificación de los factores de virulencia de <i>Escherichia coli</i> diarraigénica (mPCR2).	106
Figura 3.21	Procedimiento de obtención de una cepa de EAEC mediante amplificación por PCR, aislamiento y criopreservación.	107
Figura 3.22	Fotografía de los productos de amplificación de los factores de virulencia de EPEC (mPCR1).	108
Figura 3.23	Fotografía de los productos de amplificación de los factores de virulencia de ETEC (mPCR1).	109
Figura 3.24	Fotografía de los productos de amplificación de los factores de virulencia de ETEC (mPCR1).	109
Figura 3.25	Fotografía de los productos de amplificación de los factores de virulencia de EAEC (mPCR2).	110
Figura 3.26	Fotografía de los productos de amplificación de los factores de virulencia de STEC (mPCR2).	110
Figura 3.27	Patrones de restricción PFGE de dos aislamientos STEC	112
Figura 3.28	Inmuncromatografía para la detección de antígenos de Rotavirus y Adenovirus	112
Figura 3.29	Microfotografía de los protozoos <i>Cryptosporidium</i> spp., <i>Blastocystis</i> spp. y <i>Giardia intestinalis</i> en niños con diarrea	113

Figura 3.30	Frecuencia relativa de patógenos entéricos en casos de diarrea infecciosa sin leucocitos ni hematíes según Escala de Bristol	115
Figura 3.31	Frecuencia de patógenos entéricos en casos de diarrea infecciosa según presencia fecal de leucocitos/hematíes y Escala de Bristol	116
Figura 3.32	Número de niños con diarrea según presencia o ausencia de patógenos intestinales y edad	117
Figura 3.33	Frecuencia de diarrea infecciosa en niños según grupo etario y duración temporal de la diarrea	120
Figura 3.34	Distribución de los casos de diarrea infecciosa según tipo de diarrea y agente etiológico	120
Figura 3.35	Distribución de patógenos entéricos según tipo de diarrea	121
Figura 3.36	Distribución geográfica de las viviendas de los niños con diarrea, estudiados en el período 2016-2017	123
Figura 3.37	Distribución geográfica de las viviendas de los niños con diarrea según el agente etiológico	125
Figura 3.38	Mapa de calor (<i>hotspots</i>). Distribución geográfica de las viviendas de los niños con diarrea	126
Figura 3.39	Distribución geográfica de las viviendas de los niños con diarrea según el agente etiológico bacteriano	127
Figura 3.40	Distribución geográfica de las viviendas de los niños con diarrea según el agente etiológico viral y parasitario	128
Figura 3.41	Mapa de calor (<i>hotspots</i>). Distribución geográfica de las viviendas de los niños con diarrea infecciosa	129
Figura 3.42	Frecuencia de casos de diarrea infecciosa según tipo de patógeno y estación	130
Figura 3.43	Distribución geográfica de los niños con diarrea según el agente etiológico, durante el período primavera-verano	132
Figura 3.44	Distribución geográfica de los niños con diarrea según el agente etiológico durante el período otoño-invierno	133
Figura 3.45	Diagrama de cajas y bigotes (<i>box-plot</i>) sobre la distribución de edades de los niños con diarrea persistente	134
Figura 3.46	Modalidad de atención médica pediátrica según duración temporal de la diarrea	135
Figura 3.47	Mapa de calor (<i>hotspots</i>). Distribución geográfica de las viviendas de los niños con diarrea persistente	136
Figura 3.48	Número de casos totales de diarrea (barras rojas) y de diarrea persistente (línea azul) según mes del año	137

Glosario

Siglas, Acrónimos y Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMP	Ampicilina
AMS	Ampicilina-sulbactam
ATM	antimicrobiano
CDC	Centro de Control de Enfermedades
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	Instituto de estándares clínicos y de laboratorio
CPD	Cefpodoxima
CRO	Ceftriaxona
DAG	Diarrea aguda
DEC	<i>Escherichia coli</i> diarreigénica
DPE	Diarrea persistente
DPO	Diarrea prolongada
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogénica
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica
FOS	Fosfomicina
HDBV	Hospital de niños Debilio Blanco Villegas
INDEC	Instituto Nacional de Censos y Estadísticas
LT	Toxina termolábil
MgCl₂	cloruro de magnesio
NAL	Ácido Nalidíxico
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	Pares de bases
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción de Polimerasa en Cadena
rpm	Revoluciones por minuto
SHU	Síndrome Urémico Hemolítico
SIG	Sistemas de Información Geográfica
SMN	Servicio Meteorológico Nacional
SNT	<i>Salmonella</i> no tifoidea
STEC	<i>Escherichia coli</i> productora de toxina Shiga