

Etiología de la diarrea bacteriana aguda en pacientes pediátricos de la ciudad de Córdoba

Vanina G. Huerta, Patricia A. González, Valeria P. Contreras Funes, Danilo Barcudi, Daniela M. Dichiara, Paulo R. Cortes*.

Sección de Bacteriología-Hospital Pediátrico del Niño Jesús-Córdoba-Argentina

Av. Castro Barros 650. Córdoba capital. CP 5000. Tel: 0351-4346061

*autor de correspondencia: pcortes@fcq.unc.edu.ar

Resumen

La diarrea aguda es principalmente una enfermedad de niños, siendo su epidemiología totalmente dependiente de la región geográfica, nivel socio económico, costumbres y hábitos de la población. Es una importante causa de morbilidad y mortalidad en países en desarrollo. Para evidenciar los agentes bacterianos causales de diarrea en la población atendida en el Hospital Pediátrico del Niño Jesús de la ciudad de Córdoba, se estudiaron en forma retrospectiva un total de 5387 muestras fecales diarreicas recibidas entre el 1 de marzo de 2004 y el 31 de diciembre de 2011, de las cuales 1835 (34,1%) presentaron desarrollo de alguna especie bacteriana patógena. En 1779 muestras se detectó un enteropatógeno, en 55 muestras se detectó asociación entre dos; y en una muestra se encontró asociación entre 3 especies bacterianas. Las frecuencias de aislamiento fueron: *Shigella* spp: 52,97% (972/1835), *Campylobacter* spp: 41,68% (765/1835), *Salmonella* spp: 6,81% (125/1835) y *E. coli* O157:H7: 0,98% (18/1835); en 11 pacientes se detectó *Yersinia enterocolitica* como único enteropatógeno, y en un paciente *E. coli* O145. Los métodos de cultivo convencionales, siguen siendo la opción más accesible para la detección e identificación de patógenos bacterianos entéricos en los laboratorios clínicos en nuestro país. La implementación de técnicas moleculares permitirá profundizar los estudios epidemiológicos de estos enteropatógenos.

Palabras clave: diarrea bacteriana aguda, etiología, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella flexneri* aa479.

Introducción

La diarrea se define como la presencia de heces de menor consistencia o acuosas, por lo menos tres veces por día, o una frecuencia de deposiciones mayor que la normal para un individuo (1). La diarrea es el síntoma común de una infección gastrointestinal causada por un amplio rango de patógenos, incluidos los virus, las bacterias y los protozoos. La gran mayoría de estos patógenos comparten el modo en que son transmitidos: de la materia fecal de una persona a la boca de la otra.

La diarrea aguda es una causa importante de morbilidad y mortalidad. En el mundo entero mueren más de 2 millones de personas por año, la mayoría niños, debido a que poseen una alta susceptibilidad y mayor exposición a los agentes causales (2). La epidemiología depende del nivel socioeconómico, huésped, estación del año y fundamentalmente de la falta de provisión de fuentes de agua segura y la incorrecta eliminación de excretas. En Argentina más de 8 millones (23%) de habitantes no tienen red de agua potable, mientras que más de 21 millones (57,5%) no cuentan con desagües cloacales (3).

Algunos de los patógenos bacterianos más importantes observados en el mundo incluyen *Aeromonas* spp., *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* diarreogénica, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Vibrio cholerae* y *Yersinia* spp. (4). Usualmente, la etiología microbiológica de la diarrea no es obvia clínicamente, por lo tanto el diagnóstico de laboratorio adquiere gran importancia, ya que se debe instaurar al paciente, un tratamiento de rehidratación, y en ciertas ocasiones, dependiendo del agente etiológico y la gravedad del cuadro, implementar una terapia antimicrobiana.

Recientemente están disponibles pruebas moleculares de diagnóstico, pero debido a su alto costo su uso está limitado a países desarrollados, por ello los métodos de cultivo convencionales, aunque laboriosos, siguen siendo la opción más accesible para la detección

e identificación de patógenos bacterianos entéricos en los laboratorios clínicos de nuestro país.

El objetivo de este trabajo fue detectar los agentes causales de diarrea en la población pediátrica atendida en el Hospital Pediátrico del Niño Jesús de la Ciudad de Córdoba entre el 1 de marzo de 2004 y el 30 de diciembre de 2011.

Materiales y Métodos

Se revisaron, en forma retrospectiva, los agentes etiológicos causales de diarrea aislados de coprocultivos realizados entre el 1 de marzo de 2004 y el 30 de diciembre de 2011. En este período se procesaron 5387 muestras de materia fecal de pacientes pediátricos con diagnóstico de diarrea aguda (una muestra por paciente).

Las heces se recogieron por evacuación espontánea en frasco estéril y fueron examinadas microscópicamente (400X) con azul de metileno para determinar el recuento de leucocitos.

Se investigó la presencia de *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* O157:H7 y *Yersinia* spp. sembrando las muestras dentro de la media hora de ser remitidas al servicio, en los siguientes medios de cultivo: agares Levine y Salmonella-Shigella (SS) (Britania), Mac Conkey con sorbitol (SMAC) (Biokar) y en caldo selenito (Britania). Los cultivos fueron incubados a 37°C en aerofilia durante 24 horas a 37°C y a 25°C por 24 horas adicionales para favorecer el desarrollo de *Yersinia* spp.. Paralelamente se inoculó un tubo con medio de transporte de Cary Blair (Britania), que fue conservado a 4°C, por no más de 4 días, hasta la siembra en placas comerciales Campyloset (Biomerieux) para la investigación de *Campylobacter* spp., e incubadas a 42°C en microaerofilia a través de sobres generadores de atmósfera (GenPack, Biomerieux) por 48 horas.

Identificación bioquímica y serológica: las colonias “sospechosas” (en agares Levine y SS: lactosa negativa; en agar SMAC: sorbitol negativas o pequeñas sorbitol positivas) fueron tipificadas mediante pruebas bioquímicas convencionales. Para *Yersinia*

spp.: coloración de Gram, oxidasa, utilización de glucosa-lactosa-sacarosa, producción de gas y de sulfídrico: mediante utilización del medio de tres azúcares y hierro (TSI: del inglés tri sugar iron), urea, sorbitol, decarboxilación de lisina (LIA), ornitina y arginina, fenilalanina, Voges Proskauer a 25 y 37 °C. Para *Salmonella* spp., *E. coli* y *Shigella* spp: coloración de Gram, oxidasa, TSI y LIA. Para *Campylobacter* spp.: morfología de la colonia, movilidad, coloración de Gram, catalasa, oxidasa, hidrólisis del indoxilacetato (Sigma) y en algunos casos hidrólisis del hipurato de sodio.

Los aislamientos tipificados bioquímicamente como *Shigella* spp., *Salmonella* spp. y/o *E. coli* fueron serotipificados con antisueros poli y monovalentes producidos y provistos por el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas Dr. Carlos G. Malbrán (Osh B, Osh D, O1, O2, O3, O6 y aa479 para *Shigella* spp.; OS-A, OS-B, O4, O9 y O6 para *Salmonella* spp.; O157, O145 y H7 para *E. coli*. Todas las cepas de *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *E. coli* O157:H7 y *Yersinia* sp. fueron remitidas al Instituto Malbrán donde se confirmó, en todos los casos, su identificación de género y especie y/o serológica.

Resultados

El examen microscópico de la materia fecal coloreada con azul de metileno, reveló respuesta inflamatoria (>5 leucocitos /campo de 400X) en el 95% de las muestras donde se obtuvo el desarrollo de al menos un enteropatógeno. En el 5% restante se observó presencia de menos de 5 leucocitos por campo.

El índice de positividad del cultivo de la materia fecal fue del 34,1%, ya que en 1835 muestras fue posible identificar al menos una especie bacteriana patógena.

Las frecuencias de aislamiento fueron: *Shigella* spp: 52,97% (972/1835), *Campylobacter* spp: 41,68% (765/1835), *Salmonella* spp: 6,81% (125/1835) y *E. coli* O157:H7: 0,98% (18/1835). En 55 muestras se encontraron asociaciones entre dos enteropatógenos bacterianos: *Campylobacter* spp. con: *Shigella* spp. (n=43), con *E. coli* O157:H7 (n=5), con *Salmonella* spp. (n=2), y con *Yersinia enterocolitica* (n=2). También se encontró *Salmonella* spp. asociada con *Shigella* spp. (n=3). En 1 muestra se encontró

asociación entre tres enteropatógenos bacterianos: *Shigella dysenteriae*, *Salmonella* sp. y *Campylobacter* sp. (**Tabla 1**).

Con respecto a las especies dentro del género *Shigella* hubo un marcado predominio de *S. flexneri* seguida por *S. sonnei* y luego por *S. dysenteriae* con 684, 284 y 4 aislamientos respectivamente.

Durante el período estudiado *S. flexneri* predominó sobre *S. sonnei* (70,0 % vs 29,2% respectivamente), salvo durante el verano del año 2009-2010 (meses de noviembre, diciembre, enero y febrero) en que se detectó un desmesurado incremento en la frecuencia de *S. sonnei* respecto de *S. flexneri* (69% vs 31% respectivamente), lo que evidenció un cambio en la epidemiología de la diarrea producida por *Shigella* spp. durante ese período, ya que posteriormente *S. flexneri* volvió a predominar sobre *S. sonnei*.

Los serotipos de *S. flexneri* fueron: 2, 3, 1, 6, aa479, 4, 5, variante X y variante Y, con 375, 190, 62, 27, 20, 4, 3, 1 y 1 aislamientos respectivamente. (**Tabla 2**). Un aislamiento no pudo ser serotipificado ya que perdió la viabilidad.

De los 125 aislamientos de *Salmonella enterica* subesp. *enterica*, 35 fueron serovariedad Typhimurium, 28 Enteritidis, 7 Newport, 5 Agona, 4 Montevideo, 2 Derby, 2 Saintpaul, 2 Oraniemburg, 2 Javiana y diversas serovariedades con 1 aislamiento cada una. No se pudo conocer la serovariedad en 30 aislados.

Se determinó la especie dentro del género *Campylobacter* en 60 aislados siendo *C. jejuni* la predominante (95%).

De las 18 cepas de *E. coli* O157:H7 sólo 4 produjeron síndrome urémico hemolítico en los pacientes que las portaban. La mayoría de los aislamientos de *E. coli* O157 fueron productores de toxina de shiga tipo 2. El aislamiento de *E. coli* O145 provino de un paciente con síndrome urémico hemolítico.

En cuanto a *Yersinia enterocolitica*, hubo un total de 11 aislamientos de los cuales dos estaban asociados a *Campylobacter* spp. La detección de esta especie se vió favorecida por la incubación a temperatura ambiente por 24 hs adicionales.

Con respecto a la estacionalidad de los diferentes enteropatógenos, *Shigella* spp. y *Salmonella* spp. fueron más prevalentes en los meses estivales, mientras que *Campylobacter* spp. fue aislado durante todo el año pero con mayor frecuencia durante los meses de otoño e invierno.

Discusión

La diarrea aguda es principalmente una enfermedad de niños, siendo su epidemiología totalmente dependiente de la región, nivel socio económico, costumbres y hábitos de la población. La provisión de agua potable y la correcta eliminación de excretas juegan un rol fundamental en la prevención de la misma.

En el presente trabajo, se realizó una revisión retrospectiva de muestras de materia fecal de pacientes pediátricos con diagnóstico de diarrea bacteriana aguda con una tasa de recuperación del 34,1%, la cual es buena, teniendo en cuenta reportes previos que oscilan entre 3% en países desarrollados (5), alcanzando valores de hasta el 49,9% en países en vías de desarrollo (6,7,8). Creemos que el alto porcentaje de recuperación puede ser debido a que en el Laboratorio del Hospital Pediátrico las materias fecales fueron sembradas inmediatamente de recibidas, lo cual favorece la viabilidad de los enteropatógenos.

Debe tenerse en cuenta que el coprocultivo puede por sí mismo tener valores de recuperación bajos, ya que existen células bacterianas que pueden ser viables pero no cultivables en el laboratorio de microbiología utilizando medios de cultivo convencionales, un fenómeno que ha sido descrito para *Vibrio cholerae*, *Salmonella* Enteritidis, *Shigella* spp. y *Campylobacter jejuni* (4).

El principal enteropatógeno en esta serie fue *Shigella* spp. (18,0%), coincidente con reportes previos (6,9,2). Sin embargo existen reportes en la literatura donde *Campylobacter* sp. es el enteropatógeno predominante (10). Al respecto se puede mencionar que el nivel socio económico de la población estudiada, tiene relación sobre la predominancia de uno sobre el otro; mientras mayor es el mismo, *Campylobacter* spp. predominará sobre *Shigella* spp. y viceversa (11). Dentro de éste género, *S. flexneri* fue más prevalente que *S. sonnei*,

con excepción del verano del año 2009-2010, en el cual hubo un gran incremento de la especie *sonnei*. Idéntica situación se presentó en todo el país quizá por el ingreso de un nuevo clon. A partir de ese momento y en un intento de predecir futuros brotes y adoptar medidas de control el Instituto Malbrán implementó el programa MIDAS. El mismo tipo de brote ocurrió en el año 2001 en la Provincia de Buenos Aires (2) y en San José de Costa Rica (12). *Shigella sonnei* causa brotes aislados en países desarrollados (13), mientras que *S. flexneri* lo hace en países en vía de desarrollo. En cuanto a los aislamientos de *S. flexneri* denominados aa479 fueron informados por el INEI ANLIS Malbrán como probable nuevo serotipo el cual se encuentra actualmente en estudio. De los 4 aislamientos de *S. dysenteriae* dos fueron serotipo 3.

Campylobacter spp. tuvo una frecuencia de aislamiento del 14,2%, siendo el segundo en prevalencia; es esperable ya que se ha visto que la infección por este patógeno es hiperendémica en países en desarrollo. A diferencia de *Shigella* spp la cual predomina en meses estivales, *Campylobacter* spp. no presentó estacionalidad estival (14), fenómeno que también ocurre en países desarrollados (15).

La mayor asociación entre patógenos en este estudio fue entre *Shigella* spp. y *Campylobacter* spp.; sumando un total de 43 casos. Estudios realizados en países en desarrollo, demuestran que cerca de la mitad de los pacientes con enteritis por *Campylobacter*, tienen asociado otro enteropatógeno (16); inclusive los test diagnósticos moleculares también certifican que hay asociaciones entre distintos patógenos (4).

Referido a *E. coli* productora de toxina shiga, en la presente revisión se encontró que el serotipo O157 fue el más prevalente, en concordancia con el trabajo de Rivas y col (17).

En cuanto a *Yersinia enterocolitica*, hubo un total de 11 aislamientos (dos asociados a *Campylobacter* spp.), siendo este trabajo el primer reporte con dicha cantidad de cepas. Teniendo en cuenta la bibliografía (18, 19) nuestro porcentaje de recuperación (0,22%) fue muy satisfactorio, a pesar de no contar con medios de cultivo selectivos para este patógeno, tales como el medio CIN (Cefsulodina-Irgasan-Novobiocina). No existen hasta el presente otros trabajos referidos a *Yersinia enterocolitica* en materia fecal, por lo que proponemos

que es probable que esta infección esté subdiagnosticada, por ello es necesario mejorar la metodología empleada para su detección. (20,21)

A pesar de los esfuerzos por mejorar la recuperación de los diversos enteropatógenos utilizando medios de cultivo convencionales, se hace indispensable la aplicación de técnicas moleculares para conocer en mayor profundidad la epidemiología a nivel local de los mismos, lo que acarreará medidas preventivas específicas en nuestra población pediátrica.

Tabla 1: Enteropatógenos recuperados de 1835 muestras de materia fecal proveniente de pacientes pediátricos

<i>Shigella</i> spp	50,40%
<i>Campylobacter</i> spp	38,80%
<i>Salmonella</i> spp	6,49%
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	0,71%
<i>Yersinia enterocolitica</i>	0,49%
<i>Escherichia coli</i> O145	0,05%
<i>Campylobacter</i> spp + <i>Shigella</i> spp	2,34%
<i>Campylobacter</i> spp + <i>Salmonella</i> spp	0,11%
<i>Campylobacter</i> spp + <i>E.coli</i> O157:H7	0,27%
<i>Campylobacter</i> spp + <i>Yersinia</i> spp	0,27%
<i>Shigella</i> spp + <i>Salmonella</i> spp	0,16%
<i>Shigella</i> spp + <i>Salmonella</i> spp + <i>Campylobacter</i> spp	0,05%

Tabla 2: serotipos de *Shigella flexneri*

Serotipos de <i>Shigella flexneri</i>	Número de aislamientos
2	375 (54,8%)
3	190 (27,8%)
1	62 (9,1%)
6	27 (3,9%)
aa479	20 (2,9%)
4	4 (0,6%)
5	3 (0,4%)
variante X	1 (0,1%)
variante Y	1 (0,1%)
Sin tipificar	1(0,1%)

Bibliografía

1. “Diarrhoea: why children are still dying and what can be done?” The United Nations Children’s Fund (UNICEF)/World Health Organization (WHO), 2009.
2. Giugno S, Oderiz S. “Etiología bacteriana de la diarrea aguda en pacientes pediátricos”. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 2010; 44(1):63-9 .
3. Maceira D, Kremer P, Finuncane H. “El desigual acceso a los servicios de agua corriente y cloacas en Argentina”. *CIPPEC Pol Publicación Anual Julio 2007*;(39) .
4. Liu J, Gratz J, Maro A, Kumburu H, Kibiki G, Taniuchi M, Howlader AM, Sobuz SU, Haque R, Talukder KA, Qureshi S, Zaidi A, Haverstick DM, and Houpt ER. “Simultaneous Detection of Six Diarrhea-Causing Bacterial Pathogens with an In-House PCR-Luminex Assay”. *J Clin Microbiol* 2012; 50(1):98.
5. Silletti RP, Lee G, Ailey E. “Role of stool screening test in diagnosis of inflammatory bacterial enteritis and in selection of specimens likely to yield invasive enteric pathogens.” *J Clin Microbiol* 1996; 34: 1161-5.
6. 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(3):216-23.
7. Huicho L, Garaycochea V, Uchima N, Zerpa R, Guerrant RL. “Fecal lactoferrin, fecal leukocytes and occult blood in the diagnostic approach to childhood invasive diarrhea.” *Pediatr Infect Dis J* 1997; 16:644-7.
8. Ruiz-Pelaez JG, Mattar S. “Accuracy of fecal lactoferrin and other stool test for diagnosis of invasive diarrhea at a colombian pediatric hospital”. *Pediatr Infect Dis J* 1999; 1999; 18:342-6.
9. Mota MI, Gadea MG, González S, González G, Pardo L, Sirok A, Rivas M, Algorta G, Schelotto F, Varela G. “Bacterial pathogens associated with bloody diarrhea in Uruguayan children”. *Revista Argentina de Microbiología* 2010; 42: 114-7.
10. Larrosa-Haro A, Ruiz-Perez M, Aguilar-Benanvides S. “Utilidad del estudio de las heces para el diagnóstico y manejo de lactantes y preescolares con diagnóstico de diarrea aguda”. *Salud Pública de México* 2002; 44: 328-33.
11. Hilmarsdóttir I, Baldvinsdóttir GE, Harðardóttir H, Briem H, Sigurðsson SI. “Enteropathogens in acute diarrhea: a general practice-based study in a Nordic country” *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious*. 2012; 31(7): 1501-9.

12. Barrantes K, Pardo V, Achí R. “Brote de diarrea asociado a *Shigella sonnei* debido a contaminación hídrica, San José, Costa Rica, 2001” Rev. Costarric. Cienc. Méd 2004; 25(1-2).
13. Guía de la asociación mundial de Gastroenterología 2012.
14. Muñoz Vicentea E, Bretón Martínez JR, Ros Díez A, Rodríguez García A, Casado Sánchez B, Hernández Marcoa R, Nogueira Coito JM. “Gastroenteritis aguda infecciosa en urgencias de un hospital urbano.” An. Pediatr. (Barc). 2008;68(5):432-8.
15. McCarthy ND, Gillespie IA, Lawson AJ, Richardson J, Neal KR, Hawtin PR, Maiden MC, O'Brien S. “Molecular epidemiology of human *Campylobacter jejuni* shows association between seasonal and international patterns of disease”. Epidemiol. Infect. 2012; 140 (12): 2247 – 55.
16. Coker AO, Isokpehi RD, Thomas BN, Amisu KO, Obi CL. “ Human campylobacteriosis in developing countries”. Emerg. Infect. Dis. 2002; 8: 237-43.
17. 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.
18. Paz M, Mezio H, Teves S, Santini P. “Análisis de una cepa de *Yersinia enterocolitica* aislada de heces diarreicas humanas en Argentina”. Revista Argentina de Microbiología 2004; 36: 164-69.
19. Rodríguez Fernández M , Sanchén A, Casas R, Hernández C, Cordero Rodríguez M. “*Yersinia enterocolitica*. Reporte de dos casos con enfermedad diarreica aguda.” Archivo Médico de Camagüey. 2007; 11 (2).
20. Cortes PR, Contreras Funes V, Huerta VG, Dichiara DM . “*Yersinia enterocolitica* en la materia fecal de 6 pacientes pediátricos de la ciudad de Córdoba”. Revista Argentina de Microbiología. 2010; 42 (1).
21. Murphy BP Drummond N, Buckley JF, Coveney AP, Redmond HP, Power JP, Fanning S, Prentice MB. “Current evidence for human yersiniosis in Ireland. Ringwood” European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. 2012; 31 (11): 2969-81.