

11282
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

5

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
SECRETARÍA DE SALUD PÚBLICA

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
"SALVADOR ZUBIRÁN"

INFLUENCIA DE LA COLONIZACIÓN INTESTINAL POR
BACILOS ÁCIDO LÁCTICOS EN LA PROTECCIÓN
CONTRA LA ENFERMEDAD DIARREICA OCASIONADA
POR ROTAVIRUS

TESIS DE POSGRADO
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS
P R E S E N T A:
SARBELIO MORENO ESPINOSA

298477

DIRECTOR DE TESIS:
DRA. MARÍA DE LOURDES GUERRERO ALMEIDA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Influencia de la colonización intestinal por Bacilos Ácido Lácticos en la protección contra la enfermedad diarreica ocasionada por rotavirus

Trabajo de Investigación Clínica que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias Médicas
Presenta

Dr. Sarbelio Moreno Espinosa

Programa Único de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas,
Odontológicas y de la Salud
Sede Sur, Universidad Nacional Autónoma de México

Tutor: Dra. María de Lourdes Guerrero Almeida
Cotutor: Dr. Guillermo M. Ruiz-Palacios y Santos

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"
Departamento de Infectología
Clínica de Diarreas
Ciudad de México, 2001

RECONOCIMIENTOS

A la Dra. Lourdes Guerrero, por compartirme sus conocimientos, consejos y palabras de ánimo. Por su disponibilidad y paciencia, y sobretodo su amistad.

Al Dr. Guillermo Ruíz Palacios, por compartirme sus conocimientos e impulsarme para salir adelante

A mis compañeros médicos, enfermeras, trabajadoras sociales, promotoras de salud, químicos, capturistas y secretarias, porque gracias a su colaboración y compañerismo fue posible este trabajo.

A mis profesores del Curso de Maestría, gracias por sus conocimientos y consejos.

Al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán por haberme permitido ser parte de él.

A la Universidad Nacional Autónoma de México que tanto nos aporta.

A la Secretaria de Salud y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por haberme hecho posible subsistir durante mis estudios.

Un reconocimiento muy especial a mi esposa Lesly, por haberme apoyado y comprendido durante este tiempo, espero que me alcance la vida para poderle corresponder y reponer el tiempo que no hemos compartido.

A mi familia, por su apoyo constante y palabras de ánimo.

A mis amigos, por estar siempre presentes en mis mejores momentos.

INDICE

	Página
I. RESUMEN	3
II. JUSTIFICACIÓN	5
III. OBJETIVOS	6
IV. HIPÓTESIS	7
V. INTRODUCCIÓN	8
VI. MÉTODOS	30
A. DISEÑO DEL ESTUDIO	30
B. POBLACIÓN EN ESTUDIO	30
C. ELEGIBILIDAD	31
D. SELECCIÓN DE LA POBLACIÓN	31
E. SEGUIMIENTO DE LA COHORTE	32
F. DEFINICIONES OPERACIONALES	32
G. MÉTODOS DE LABORATORIO	33
H. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	34
VII. RESULTADOS	37
VIII. DISCUSIÓN	44
IX. CONCLUSIONES	49
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
XI. TABLAS	58
XII. GRÁFICAS	69
XIII. FIGURAS	75

Influencia de la colonización intestinal por Bacilos Ácido Lácticos en la protección contra la enfermedad diarreica ocasionada por rotavirus

Introducción: Estudios clínicos y básicos han demostrado que la ingesta de *Lactobacillus* spp viables induce colonización intestinal y protege contra la diarrea por rotavirus (RVH).

Objetivo: Demostrar que la colonización natural por *Lactobacillus* spp previene la diarrea por RVH durante la infancia. **Metodología:** Se siguió una cohorte de niños menores de 2 años de edad, visitados semanalmente para detectar diarrea, la cual se documentó y siguió por médicos. Se recolectaron muestras fecales semanales para detección de RVH y quincenales para cuantificar *Lactobacillus* spp. Por cada caso de RVH se eligieron tres controles sanos de la misma cohorte. Para el análisis de los datos se utilizaron medidas de frecuencia y de asociación mediante regresión logística condicionada.

Resultados: Se incluyeron 162 sujetos, seguidos de octubre de 1998 a mayo de 1999, contribuyendo con 947 meses de seguimiento. Se detectaron 169 episodios de diarrea en general y 15 por RVH (Incidencia: 17.8/100 niño-mes y 1.68 episodios/100 niño-mes respectivamente). Los niños con RVH tuvieron menor colonización por *Lactobacillus* spp que los controles (Media geométrica: 4.14, IC 95% 2.98-5.76 vs 5.79, IC 95% 4.92-6.82; $p=0.10$). Debido a la colinearidad entre las variables, se realizó un análisis de componentes principales. El primer componente (ingesta de seno materno, fórmula láctea, alimentos sólidos y edad) explicó el 53% de la varianza total y el segundo, (colonización por *Lactobacillus* spp), el 24% de ésta.

Conclusiones: La lactancia materna y la colonización por *Lactobacillus* spp se asocian independientemente con disminución de la incidencia de diarrea por RVH, y la edad, consumo de fórmula y alimentos sólidos aumentan el riesgo de dicha diarrea.

JUSTIFICACIÓN

La enfermedad diarreica continúa siendo una de las principales causas de morbi-mortalidad en la población infantil. En las últimas décadas se ha demostrado que el rotavirus es el agente patógeno responsable de la mayoría de las muertes asociadas a la enfermedad diarreica por deshidratación grave. Se ha observado que la flora intestinal de los niños alimentados al seno materno está constituida primordialmente por bacterias ácido lácticas, mientras que en la flora intestinal de los niños alimentados con fórmula y ablactados tempranamente predominan enterobacterias y anaerobios. Existe evidencia de que la presencia de los bacilos ácido lácticos en el intestino del ser humano se asocia con una disminución en la severidad de los síntomas de un episodio de diarrea, así como a un aumento en los títulos de anticuerpos protectores circulantes contra RVH. A pesar de existir estudios que demuestran la influencia de la lactancia materna en la colonización intestinal por bacilos ácido lácticos, se desconoce con precisión el grado de colonización intestinal que ésta confiere, y los diferentes factores que modifican esta colonización. Así mismo se desconoce si la colonización intestinal natural del intestino del humano por lactobacilos protege al niño en contra de la enfermedad diarreica ocasionada por el RVH.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar el grado de colonización intestinal por lactobacilos y su papel en la protección en contra de la enfermedad diarreica por rotavirus, en una cohorte de niños mexicanos de 0 a 12 meses de edad, alimentados al seno materno y/o con fórmula láctea, seguidos longitudinalmente durante los meses de otoño e invierno, en una comunidad de la periferia de la Ciudad de México.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A. Determinar si la lactancia materna influye en el grado de colonización intestinal por lactobacilos, en lactantes de una población con alto índice de lactancia materna.
- B. Determinar si los niños con bajos niveles de colonización ($< \log 4$ UFC/g de heces) son más susceptibles a la infección por RVH, que los que tienen una colonización mayor ($\geq \log 4$ UFC/g heces) por bacilos ácido lácticos.

HIPÓTESIS

HIPÓTESIS GENERAL

La colonización intestinal ($\geq \log 4$ UFC/g heces) por lactobacilos disminuye la incidencia de la enfermedad diarreica por rotavirus en niños de 0-12 meses de edad de una comunidad de la periferia de la ciudad de México.

HIPÓTESIS ESPECÍFICAS

- A. Los niños alimentados con leche materna presentan mayor grado de colonización intestinal por bacilos ácido lácticos, que los niños que son alimentados con fórmula láctea.

- B. La colonización intestinal por lactobacilos ($\geq \log 4$ UFC/g heces) disminuye la incidencia de diarrea por RVH.

INTRODUCCIÓN

ANTECEDENTES

La enfermedad diarreica constituye una causa mayor de morbilidad y mortalidad en el mundo y es responsable de casi 3 millones de muertes al año; 2,500,000 de estas muertes ocurren en niños menores de 4 años de edad (1), correspondiendo 130,000 de estos casos a América Latina. En México se ha observado un notable descenso en la tasa promedio de muertes por diarrea, de 518/100,000 habitantes por año en 1940 a 33.3/100,000 habitantes por año en 1997 (1). A pesar de este descenso en la mortalidad, la enfermedad diarreica en México ocupa el cuarto lugar dentro de las causas de mortalidad infantil, sólo superada por las afecciones perinatales relacionadas con asfixia, las malformaciones congénitas y las infecciones respiratorias bajas. Actualmente en México ocurren alrededor de 2,600 defunciones por diarrea al año en niños menores de 5 años, con una tasa de 97.1 defunciones/100,000 nacidos vivos (2) y cerca de 29 millones de episodios de diarrea en niños de este mismo grupo de edad (3).

El rotavirus humano (RVH) del grupo A es una de las principales causas de diarrea aguda en los lactantes en todo el mundo, incluyendo México (4,5). A pesar de que diferentes estudios han demostrado una incidencia similar de diarrea por RVH en países desarrollados y en vías de desarrollo (6), la enfermedad es más fatal en los segundos debido al retraso en la asistencia y la deficiencia en los servicios de salud (7). Se estima que el RVH es responsable de la muerte de más de 870 000 niños de 1 a 4 años de edad y de 17 millones de casos de diarrea de moderada a severa cada año en países en vías de desarrollo (8). Se ha estimado que la carga asistencial

asociada a la enfermedad diarreica causada por RVH puede ser tan alta como un billón de dólares anuales (9,10,11).

La dificultad para disminuir la mortalidad y complicaciones de la diarrea ocasionada por RVH mediante la promoción de la educación en la salud (como la detección de signos de alarma de deshidratación y el inicio oportuno de la hidratación oral) hace más urgente la búsqueda de alternativas para la prevención de esta enfermedad, como el desarrollo de vacunas ó el reforzamiento de los mecanismos de defensa propios del individuo.

ROTAVIRUS

Las primeras descripciones de la enfermedad diarreica ocasionada por RVH probablemente correspondan a la "enfermedad de vómito de invierno" (winter vomiting illness) descrita en San Luis Missouri, EU, ó al término "*pseudocholera infantum*" reportado en Japón en 1910. En 1973 Bishop y colaboradores aislaron el virus mediante microscopía electrónica en muestras fecales y biopsias duodenales de niños con diarrea aguda (12). En 1974 fue nombrado "rotavirus" por su semejanza con una rueda (13). Previamente a este descubrimiento ya habían sido identificados agentes virales que provocaban diarrea en becerros, ratones y simios, que compartían características morfológicas con este nuevo agente (14).

Estructura del virus. El RVH es un RNA virus de cadena doble perteneciente a la familia *Reoviridae*, relativamente grande (70nm). Posee un centro (core) que contiene al genoma de RNA de 11 segmentos, del cual parten de manera radiada los capsómeros hacia las cápsides de doble borde bien delimitado, que morfológicamente semejan una rueda. La cápside interna tiene cuatro proteínas

virales: VP1, VP2, VP3 y VP6. La mayor de éstas es VP6 y sus características antigénicas le permiten ser clasificado en 7 distintos grupos, de la A-G. Los RVH del grupo A son los más frecuentes en el humano, pero también se han descrito casos ocasionados por los grupos B y C. El grupo A se sub-clasifica en los subgrupos I y II, de acuerdo a diferencias antigénicas adicionales en VP6. El subgrupo II parece ser más común que el I, pero esto varía de acuerdo a las diferentes zonas geográficas (15).

Las cepas de rotavirus han sido tipificadas de acuerdo a la neutralización de las proteínas de su cápside: la glucoproteína VP7 (tipos G1-G14), y la hemaglutinina VP4 (tipos P, 20 diferentes) que juega un papel menor en la determinación genotípica, y se ha relacionado con la severidad de las infecciones neonatales (15).

Los serotipos G 1, 2, 3 y 4 son responsables de la mayoría de las infecciones en niños, aunque en los últimos años se ha identificado cada vez con mayor frecuencia el serotipo G9 (16). En un estudio en comunidad de una cohorte de niños seguidos longitudinalmente desde su nacimiento hasta los 2 años de edad, en un área suburbana de la periferia de la ciudad de México, el serotipo G más frecuente fue el G3, seguido por G1, G2 y G4 (5). Ningún serotipo se asoció a mayor incidencia ó severidad. Así mismo se observó que el segundo serotipo más frecuentemente encontrado durante un brote epidémico fue el predominante en el brote siguiente (comunicación personal, Dr. Guillermo Ruiz Palacios). Este mismo patrón de presentación se observó en un estudio multicéntrico llevado a cabo en diferentes estados de la República Mexicana. En este estudio se evaluaron dos estaciones epidémicas consecutivas de RVH, el serotipo más frecuente en la primera estación fue G3, seguido de G1, G2 y G4 y en la segunda estación fue el G1, seguido por G2, G3 y G4 (17). Aunque se trató de un estudio de corte transversal, y se analizaron

diferentes poblaciones, también se observó que el segundo serotipo en frecuencia en el brote previo, predecía el serotipo predominante del siguiente brote. Los estudios anteriormente mencionados tienen la limitante de que solo fueron tipificados los serotipos 1, 2, 3 y 4, considerándose el resto de los RV identificados como no tipificables, quedando en duda la frecuencia con que se presentan los otros serotipos.

A diferencia de lo que ocurre en comunidad, en los cuneros de los hospitales, un mismo serotipo puede persistir hasta dos años y ser diferente al presente en ese momento en la comunidad (16). En brotes epidémicos posteriores a la ingesta de agua, reportados en China, los episodios de diarrea fueron causados por RV del grupo B (16,19,20,21). También se han descrito casos aislados de diarrea ocasionados por RV del grupo C en Nepal, Tailandia, Reino Unido y Japón (16,22,23).

Epidemiología de la infección por RVH. La mayoría de las infecciones ocurren por contacto de humano a humano. En huéspedes normales, se encuentra presente en heces desde antes del inicio de la diarrea hasta 10 días después de haber iniciado. Se sugiere que el mecanismo de transmisión es fecal-oral, aunque se ha aislado RV de la superficie de utensilios en guarderías, por lo que algunos autores sugieren que los fomites pueden participar en la transmisión de éste (18). Se piensa que la transmisión respiratoria también puede ser posible en esta infección. La infección por RV constituye la causa más común de diarrea nosocomial en niños, y es causa común de diarrea en guarderías. También se han descrito brotes a partir de la ingesta de agua contaminada (16,18).

Grupos de edad afectados. La mayoría de los autores coinciden que el grupo de edad más afectado es el de 6 a 24 meses, con una mayor incidencia entre

los 6 y 9 meses ó 9 y 14 meses según el área geográfica (16,18). Generalmente los niños de países en vías de desarrollo adquieren la enfermedad de manera más temprana que en países desarrollados. En México la edad de presentación más común es entre 4 y 9 meses (5). A los 3 años de edad, la mayoría de los niños ya ha tenido contacto con el RVH (16).

El RVH también puede infectar neonatos y adultos. Algunos autores reportan que la infección en los neonatos habitualmente es asintomática, sugiriendo que sólo 10 a 20% de los neonatos infectados presentan cuadro enteral (16). Se desconoce con certeza la razón de esta presentación, aunque se ha sugerido que la leche materna puede ser un factor protector; se ha observado que los neonatos alimentados al seno materno presentan menor grado de infección, y menor excreción viral (16,24), y una mayor inocuidad en las cepas que afectan en los cuneros. Aunque es un grupo poco afectado, también los adultos suelen infectarse por RVH, sobretodo los contactos de un caso índice de diarrea infantil. Se han descrito brotes en asilos, unidades coronarias y bases militares. En brotes observados a partir de la ingesta de agua contaminada (16,20,21,23,25), la población adulta es la más afectada, probablemente por efecto de la mayor cantidad de agua (inóculo) ingerida por éstos. En pacientes portadores del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) se ha aislado en 50% de los enfermos con gastroenteritis, pudiendo actuar como agente causal, propiciar recaídas de la diarrea ocasionada por otro agente, actuar como co-patógeno ó no contribuir con el estado de diarrea crónica (26). También se ha implicado al RVH en la diarrea del viajero, sin ser éste el agente más importante (16).

Estacionalidad de la infección. En países templados como el Reino Unido, Japón, EU, Canadá y regiones de Sudáfrica y Australia, la infección por RVH ocurre

en otoño e invierno, mientras que en los países más cercanos al Ecuador, la estacionalidad puede pasar desapercibida, describiéndose en algunos países dos brotes, uno durante la temporada seca y otro en la temporada de lluvia (16,18). En países con amplia extensión geográfica como EU, la estacionalidad varía de una región a otra, presentándose en la región del sudoeste la mayoría de los casos en octubre y noviembre, y en el noreste en abril y mayo (27). En México, al igual que en el sudoeste de los Estados Unidos, la infección por RVH presenta su mayor incidencia durante los meses de octubre y noviembre, con menor frecuencia el resto de los meses del año, observándose brotes ocasionales en primavera (5).

Fisiopatogenia. La infección por RVH afecta los dos tercios superiores del intestino delgado (duodeno y yeyuno superior) y se asocia a pérdida de líquidos y electrolitos, resultando en una diarrea acuosa severa, como producto de una combinación de malabsorción y secreción de líquido por células crípticas inmaduras. Debido a la disposición más superficial de la lactasa, con respecto a otras disacaridasas, en el "borde en cepillo" de la mucosa intestinal, puede ocurrir intolerancia a la lactosa (28).

Se han sugerido varios mecanismos fisiopatogénicos que expliquen la presencia de diarrea. Se sugiere que la adhesión ó entrada del RVH a la célula por sí mismas, pueden ser suficientes para provocar diarrea, de manera análoga a las enterotoxinas. En modelos murinos, se ha visto que la proteína NSP4, codificada por el cromosoma 10, provoca cambios en la concentración de calcio intracelular, induciendo diarrea secretora, de la misma manera que lo hace la enterotoxina B termolábil de la *Escherichia coli* (29).

Existen argumentos para pensar que la resolución de los episodios de diarrea por RV ocurre tanto por mecanismos inmunológicos como no inmunológicos, ya que

se ha visto que la IgA secretoria RVH específica aparece hasta una semana después del inicio del episodio, cuando ya los signos y síntomas han desaparecido (30).

También se ha visto en modelos murinos, que animales suprimidos tanto de la inmunidad humoral como celular, han resuelto infecciones primarias por RVH (31).

Se sugieren como mecanismos no inmunológicos para la resolución de infección primaria por RVH, el recambio de células epiteliales de las criptas vellosas por células menos maduras, menos permisivas para la replicación viral, el incremento en la peristalsis que disminuye el tiempo de contacto del RVH con la superficie epitelial y la presencia de interferones secretados por las células epiteliales vellosas y por los linfocitos Inter-epiteliales (32)

Protección asociada a infección natural por RVH. Se desconoce con certeza por qué los lactantes no presentan cuadros severos de diarrea por RVH durante los primeros 3 meses de vida. Como ya se mencionó anteriormente, se ha sugerido que la lactancia materna con sus componentes protectores inmunológicos y no inmunológicos puede contribuir a la protección. También se ha sugerido que esto pudiera explicarse en parte por la presencia de anticuerpos maternos trasplacentarios (32). El inicio de los cuadros de diarrea por RVH coincide con el tiempo en que los títulos de anticuerpos maternos decaen hasta concentraciones más bajas. Se desconocen los mecanismos por los cuales los anticuerpos trasplacentarios protegen contra la infección por RVH, pero se postula que la IgG materna llega al intestino mediante transcitosis, neutralizando a los RVH antes de que infecten a los enterocitos (32).

Estudios realizados en los últimos 5 años, han contribuido a aclarar los mecanismos mediante los cuales se adquiere protección después de haber presentado una infección por RVH. Posterior a la replicación en el epitelio del

intestino delgado, los RVH son captados por las células M, iniciando una serie de eventos inmunológicos que derivan en la presencia de células B productoras de IgA RVH específicas y linfocitos T citotóxicos en la superficie luminal del epitelio intestinal (31).

Tomando en cuenta que el RVH solo se replica en las células epiteliales y no se encuentra en la circulación ó lugares distantes a la mucosa, podemos decir que la respuesta inmune activa ocurre en la superficie mucosa intestinal (31). A pesar de que las altas concentraciones de IgA en la mucosa puedan proteger contra una reinfección sintomática, las células T y B de memoria localizadas en la lámina propia, son más importantes en la modificación que en la prevención de la enfermedad (protección contra enfermedad moderada a severa pero no de enfermedad leve ó infección asintomática)(31).

En neonatos y lactantes la infección natural por RVH confiere protección contra eventos subsecuentes (33,34). Esto se corroboró durante el seguimiento longitudinal de niños mexicanos mencionado anteriormente, donde se registró una disminución progresiva del riesgo de infectarse después de uno, dos ó tres episodios previos de 0.62, 0.40 y 0.34 (riesgos relativos ajustados), y del riesgo de presentar diarrea de 0.23, 0.17 y 0.08, respectivamente. Ningún niño presentó diarrea moderada a severa después de dos infecciones (33).

Bishop y Barnes siguieron durante 3 años a un grupo de lactantes. El 50% habían desarrollado infección por RVH durante la primera semana de vida; y observaron que los niños que habían sido infectados estaban clínicamente protegidos contra enfermedad severa por RVH, cuando presentaban una reinfección (35).

Manifestaciones clínicas. El periodo de incubación de la infección por RVH es de 1 a 3 días. La infección puede variar en intensidad desde una infección asintomática hasta una diarrea grave con deshidratación isotónica subsecuente. En México, aproximadamente el 50% de los niños presenta infección sintomática (5). Puede presentarse vómito previo al inicio de la diarrea ó durante la misma en un 50 a 90% de los pacientes pudiendo durar hasta 3 días (28,36,37). La diarrea suele ser acuosa, profusa y puede acompañarse de deshidratación isotónica y en algunas ocasiones ser hipertónica. Habitualmente se resuelve a los 5 días después de haber iniciado el cuadro, reportándose un 20% de pacientes que persisten con diarrea más de 1 semana. La diarrea generalmente se acompaña de fiebre (hasta en dos terceras partes de los pacientes), la cual puede persistir hasta 3 días (28,36,37).

Los individuos con infección moderada a grave tal vez requieran hospitalización por deshidratación. Los síntomas por lo general desaparecen en una semana; sin embargo, 20% de los pacientes hospitalizados pueden persistir enfermos más de una semana. La mayoría de los lactantes logra una ganancia ponderal normal hasta tres semanas después de la desaparición de los síntomas (28,37). Fuera de la deshidratación y la intolerancia a la lactosa en los casos graves, las complicaciones de esta enfermedad suelen ser infrecuentes, pero se han informado casos de síndrome de Reye, encefalitis, meningitis aséptica, coagulación intravascular diseminada, síndrome de muerte súbita del lactante y neumonía (38). Los individuos inmunodeprimidos pueden presentar diarrea crónica (38).

Pruebas diagnósticas. Las pruebas disponibles comercialmente para la detección de RVH del grupo A son el ensayo inmuno-absorbente asociado a enzimas (ELISA) y la prueba de aglutinación en látex. Ambas pruebas son útiles para la detección del RVH durante la diarrea. El ELISA es más sensible para la detección de

antígeno tardío en el curso de la enfermedad. Ambos estudios tienen una alta especificidad, pero pueden existir falsos positivos y reacciones inespecíficas en neonatos ó pacientes con enfermedad intestinal subyacente. En laboratorios de investigación, los virus también pueden ser identificados en heces mediante microscopía electrónica y técnicas de amplificación de ácidos nucleicos. El RVH es muy difícil de detectar in vitro, por lo que el cultivo celular no es rutinariamente usado para su detección y diagnóstico (18).

Tratamiento. No existe tratamiento antiviral específico disponible. La hidratación oral y parenteral es necesaria para prevenir y corregir la deshidratación. Ningún tipo de antidiarreico, incluyendo reguladores de la motilidad, está indicados en el tratamiento de la diarrea por RVH. En Chile y en Perú se realizaron ensayos clínicos controlados para evaluar la eficacia del subsalicilato de bismuto en el tratamiento de la diarrea, en niños de 2 meses a 10 años de edad, y se observó que administrándose 5 a 6 veces al día, los niños presentaron notable disminución de la duración de la diarrea, así como del gasto fecal. El agente etiológico en más del 50% de éstos niños fue RVH (39,40).

En pacientes inmunodeprimidos con cuadros de diarrea prolongados se han utilizado, de manera experimental, inmunoglobulinas humanas, logrando reducir la excreción viral y acortando la duración de la diarrea (37). De la misma manera, en niños con gastroenteritis aguda por RVH, se han empleado anticuerpos anti-RVH provenientes del calostro de vacas inmunizadas, con notable mejoría clínica (26,41).

Prevención. La vacuna contra RVH es una vacuna de virus vivos de origen simiano, que replican pobremente en humanos y consta de la cepa viral original más tres cepas recombinantes que expresan una proteína de superficie (VP7) derivada de los serotipos humanos más importantes. Debido a su pobre replicación en humanos,

son necesarios títulos relativamente altos (105 viriones) de cada cepa simiana, para producir inmunidad protectora. Esta vacuna es oral y se administra en tres dosis, la primera a los 2 meses, la segunda a los 4 meses y la tercera a los 6 meses; puede ser administrada concomitantemente con la vacuna oral para poliomielitis y no se altera con la lactancia materna (42,43).

Con el propósito de evaluar una vacuna eficaz que pudiera prevenir la infección sintomática por RVH, se llevaron a cabo 27 ensayos clínicos controlados en 9 países diferentes, en los que participaron 17 963 lactantes. En 4 estudios realizados en Estados Unidos y Finlandia, esta vacuna mostró una eficacia del 49% a 68% para prevenir cualquier infección por RVH, 69% a 91% para prevenir diarreas severas y 50% a 100% para prevenir visitas al médico para atención de diarrea por RVH (44). Esta vacuna fue sometida a un minucioso análisis para aprobación de su licencia por la Administración de Fármacos y Alimentos (FDA) y de manera concurrente por el Comité Consultivo de Prácticas de Vacunación (ACIP) y del Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC), y el 31 de agosto de 1998 la FDA aprobó el uso rutinario de vacuna simiana contra RVH (45).

Previo a la aprobación de la vacuna, los investigadores del ACIP observaron 5 casos de invaginación intestinal en los niños vacunados de los cuales 3 se presentaron durante la primera semana, mientras que en los grupos control, sólo se observó un caso. Estos hallazgos fueron analizados por la FDA, CDC, los Institutos Nacionales de Salud (NIH) y el Comité de Enfermedades Infecciosas de la Academia Americana de Pediatría (AAP), dando como resultado el dictamen de que la presencia de 5 casos de invaginación intestinal no era lo suficientemente fuerte para impedir que se aprobara una vacuna que iba a prevenir tantos episodios de enfermedad (44).

El Sistema de Reportes de Efectos Adversos de Vacunas de la FDA recibió el reporte de 15 casos de invaginación intestinal de los 1 500 000 niños que recibieron la vacuna, después de 10 meses de haber sido aprobada. De éstos, 13 ocurrieron después de la primera dosis, con un promedio de 3 meses de edad, y las otras 2 después de la segunda dosis. Por este motivo el laboratorio fabricante decidió retirar la vacuna del mercado en noviembre de 1999 (44). Hasta el momento no ha habido estudios concluyentes que demuestren una asociación entre la infección natural por RVH e invaginación intestinal (45).

Es necesario ponderar el riesgo–beneficio de las ventajas que ofrece la vacuna con respecto al número relativamente pequeño de casos de invaginación intestinal. Por otro lado es necesario conocer los resultados de eficacia de otros estudios realizados en América Latina aún no publicados que nos darían una idea del impacto real de la vacunación y la posibilidad de ocasionar invaginación intestinal. Es necesario continuar con la investigación para la elaboración de nuevas vacunas más seguras y más eficaces, así mismo como el estudio de medidas alternativas que nos permitan prevenir la enfermedad por RVH.

FLORA INTESTINAL

La colonización intestinal es un proceso que inicia después del nacimiento y se caracteriza por la presencia, crecimiento y multiplicación de microorganismos en el tracto digestivo, sin expresión clínica ni reacción inmunológica, que evoluciona y cambia durante toda la vida del ser humano. Un individuo normal cuenta con 10^{14} bacterias de 400 diferentes especies que constituyen su flora intestinal. Las bacterias de la flora intestinal se encuentran en contacto estrecho con una superficie de 200m^2 constituida por aproximadamente 10^{13} células eucarióticas que forman el epitelio mucoso del tracto intestinal. La función de la mucosa intestinal, aparte de ser una ruta para la absorción de los nutrientes, es la de servir como barrera a su contenido potencialmente tóxico (46).

Función de la mucosa intestinal como barrera. La mucosa intestinal constituye una barrera debido a una combinación de elementos epiteliales e inmunológicos, tanto luminales como mucosos, en equilibrio, cuya función es controlar la penetración de sustancias u organismos nocivos y modular mecanismos inflamatorios autolimitados y reacciones inmunológicas adecuadas. Existen factores luminales inespecíficos que contribuyen en el control de la colonización por agentes patógenos y de antígenos externos, como son la acidez gástrica que previene la ingesta excesiva de bacterias, el moco que contiene microbios, antígenos y toxinas, las enzimas digestivas que hidrolizan antígenos, y los movimientos peristálticos que ayudan a expulsar sustancias nocivas (46).

Clasificación de la flora intestinal. Las bacterias que constituyen la flora intestinal pueden ser agrupadas en tres diferentes conjuntos: bacterias ácido lácticas,

anaerobios (incluye bacilos curvos anaerobios) y el grupo aeróbico (47). Como se puede observar en la tabla 1, esta clasificación no es taxonómica sino funcional.

Cronología de la colonización intestinal. El tracto digestivo se encuentra estéril al momento del nacimiento. El intestino grueso es colonizado durante los dos primeros días de vida por enterobacterias, estreptococos, enterococos y clostridios. Al tercer día de vida se agregan bacteroides y bifidobacterias. Entre el cuarto y séptimo día de vida se vuelven predominantes las bifidobacterias, encontrándose de 10^{10} a 10^{11} de unidades formadoras de colonias por gramo de heces, en escala logarítmica con base 10 (Log UFC/g de heces) y disminuyen los clostridios, enterobacterias, bacteroides, estreptococos y estafilococos (figura 2, 48-50).

En contraste con el colon, el estómago tiene una escasa cantidad de flora. La flora predominante la constituyen los lactobacilos, debido a su tolerancia al medio ácido. La flora bacteriana aumenta en cantidad y complejidad conforme se va volviendo más distal el tracto digestivo, reportándose bacilos de 0 a 10^8 y 0 a 10^{10} Log UFC/g de heces en el intestino delgado y la materia fecal respectivamente (51,52).

Factores que modifican la flora intestinal La colonización bacteriana inicial del intestino del neonato proviene del canal del parto y el intestino grueso de la madre. Los neonatos alimentados al seno materno de manera exclusiva desarrollan una flora específica al final de la primera semana, la cual aumenta su predominio al mes de vida. Algunos factores luminales como la producción de ácido láctico que origina un medio ácido, la presencia de oligosacáridos que compiten por receptores bacterianos en la superficie mucosa previniendo la colonización patológica, y algunos nutrientes específicos de la leche materna como el factor bifido, la lactoferrina, la caseína y los nucleótidos, contribuyen a que haya un medio luminal que favorece que

la flora bacteriana predominante en los lactantes amamantados la constituyan lactobacilos y bifidobacterias, teniendo menos posibilidades de ser colonizados por anaerobios (46). En contraste, los niños alimentados con fórmula láctea artificial rápidamente adquieren una flora intestinal más diversa, similar a la del adulto, coexistiendo con las bifidobacterias, bacteroides, enterococos y clostridios, debido a la presencia de un medio luminal alcalino y a la ausencia de los factores prebióticos mencionados, presentes en la leche materna (46,51).

La flora intestinal cambia durante la ablactación, predominando los bacilos gramnegativos de la flora de los adultos. Las bifidobacterias disminuyen un logaritmo y las bacteroidaceas, eubacterias, peptococcaceas y clostridios sobrepasan a las bifidobacterias que pasan a constituir tan sólo el 5 a 10% de la flora total. El género de las bifidobacterias también cambia, predominando las de tipo adulto (*B. adolescentis* y *B. longum*) sobre las de tipo infantil (*B. infantis* y *B. breve*) (46,51).

Se han encontrado diferencias en la composición de la flora fecal entre niños de diferentes áreas geográficas, reflejando en parte el impacto del medio ambiente (condiciones sanitarias). Además de los factores mencionados, la flora intestinal puede ser alterada tanto por factores exógenos como endógenos como son: alteraciones en la peristalsis, neoplasias, intervenciones quirúrgicas, estómago ó intestino corto, enfermedad hepática ó renal, anemia perniciosa, síndrome de asa ciega, radioterapia, alteraciones del sistema inmunológico, estrés emocional, administración de antibióticos y envejecimiento. Estas alteraciones modifican la ecología del tracto gastrointestinal pudiendo favorecer el sobrecrecimiento de bacterias potencialmente patógenas como el *Clostridium difficile*, a expensas de disminución ó desaparición de los lactobacilos (50).

Funciones de la flora intestinal La flora intestinal juega un papel importante en el metabolismo de los carbohidratos. Los carbohidratos que llegan al colon son predominantemente polisacáridos no ramificados (fibra alimenticia) resistentes a las enzimas digestivas del tracto gastrointestinal superior, así como polisacáridos ramificados mal digeridos, debido a mala masticación, ó de alimentos crudos (los alimentos cocinados son gelatinizados y por lo tanto más accesibles a las alfa amilasas). Estos carbohidratos son el principal sustrato para la producción de ácidos grasos de cadena corta por parte de los bacilos ácido lácticos de la flora intestinal, de los cuales los más importantes son el acetato, propionato y butirato, los cuales tienen un importante efecto en la motilidad, absorción y circulación sanguínea colónica, así como regulación de la diferenciación celular, reduciendo el riesgo de carcinogénesis. Se desconocen con certeza las especies específicas que colaboran en este proceso (53).

Experimentos en modelos animales han demostrado que las bacterias de la flora intestinal llevan a cabo diversas funciones bioquímicas como son la desconjugación y dehidroxilación de ácidos biliares por parte de la *E. coli*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus faecalis*, *Bacteroides* spp., *Eubacterium* spp., y *Clostridium* spp., la conversión de bilirrubina a urobilinógeno por el *Clostridium ramnosum*, el metabolismo de colesterol a coprostanol por *Eubacterium*, y la producción de menaquinonas (vitamina K) por *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Propionobacterium*, *Fusobacterium*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Enterobacterium*, *Veillonella*, *Enterococcus*, *Enterobacteria* y *Streptococcus*. Con respecto al metabolismo de las proteínas, la flora intestinal produce amonio a partir de la urea, por medio de la enzima ureasa producida por las bacterias que la constituyen, el cual

contribuye a disminuir el pH intestinal inhibiendo el crecimiento de organismos patógenos, y disminuye el amonio y la urea séricos (46).

Influencia de la flora en el intestino. Diversos estudios sugieren que la flora intestinal además de su función metabólica influye en la morfogénesis, diferenciación y función intestinal. A continuación mencionaremos algunos de los mecanismo propuestos:

Efectos en la arquitectura general del intestino. Las bacterias componentes de la flora intestinal como *Peptostreptococcus micros*, *Ruminococcus* y *Bifidobacterium* son responsables de la degradación de las glucoproteínas del moco producido por las células epiteliales, mediante la producción de glucósido-hidrolasas. En animales de laboratorio con el intestino descolonizado, se ha observado aumento de volumen del ciego debido a cúmulo de moco no degradado, reversible a la recolonización con *Peptostreptococcus micros*. También las vellosidades del intestino delgado son más grandes en animales descolonizados que en aquellos con una colonización adecuada (53).

Efectos en la motilidad intestinal. Se ha observado en especies de laboratorio que la migración de componentes neuronales motores en el intestino es menor y más lenta en animales descolonizados que en animales con una colonización adecuada. Esto parece depender de la capacidad para responder al estímulo de los productos entero-endócrinos (53). Este efecto pudiera ser importante en el entendimiento del síndrome de intestino irritable, sobretodo después de haberse modificado la flora intestinal mediante el uso de agentes antimicrobianos.

Efectos en la diferenciación epitelial: Estudios en animales han comprobado que los componentes de la microflora modifican los programas de diferenciación de los distintos linajes, durante la morfogénesis epitelial intestinal. Un

ejemplo de esto ocurre en las células Paneth las que normalmente producen lisozima al día 10 de vida y glucoconjugados que contienen fucosa y ácido siálico, entre los días 21 y 28. En animales libres de flora, la aparición de lisozima se retrasa hasta el día 14, y la expresión de glucoconjugados fucosilados es inducida precozmente, sin suprimirse durante la edad adulta (53). Este efecto en la diferenciación celular epitelial, como podemos ver, también influye en la protección contra infecciones, ya que se relaciona con la producción de lisozima y oligosacáridos.

Factores protectores de la flora intestinal. Se ha sugerido que la flora intestinal juega un papel importante en la resistencia a enfermedades tanto en humanos como en animales. Se han propuesto tres mecanismos mediante los cuales los bacilos ácido lácticos de la flora intestinal pueden inhibir el crecimiento de agentes patógenos: Competencia por sitios de adhesión y nutrientes, producción de sustancias antimicrobianas específicas y factores inmunomoduladores.

El objetivo de los primeros estudios realizados in vitro fue determinar que cepas de bacilos ácido lácticos eran las que inhibían mejor el crecimiento de bacterias patógenas, observándose que diferentes grados de inhibición entre éstas (54). Posteriormente las cepas que inhibían el crecimiento bacteriano fueron probadas en modelos murinos a los que se les administró concomitantemente un agente patógeno (toxina colérica), observándose mayor grado de producción de anticuerpos específicos en comparación con ratones a los que no se les había administrado el lactobacilo, y se observó que el grado de inmunogenicidad también tenía relación con el tipo de cepa que se administraba (54).

Yasui y cols. demostraron en modelos murinos que *B. breve* (YIT4064) puede inducir la producción local en las placas de Peyer de grandes cantidades de IgA contra la hemaglutinina del virus de la influenza después de la inoculación del virus.

Así mismo se ha demostrado que induce una mayor producción de IgA contra toxina colérica posterior a la administración oral de la misma junto con el *B. breve* (YIT4064), en comparación con ratones a los que solo se les administró la primera, y mayor cantidad de IgA específica contra rotavirus en glándula mamaria e intestino de ratones hembra inmunizadas contra rotavirus, a los que se administró *B. breve* (YIT4064) en comparación con las que no se les administró, así como en las crías de las primeras (55).

Diferentes estudios in vitro han demostrado la capacidad de algunos lactobacilos como *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus casei* GG y *Lactobacillus acidophilus* de producir sustancias antimicrobianas con poder antimicrobiano (56-59). Además de estas sustancias antimicrobianas específicas, producen sustancias que favorecen la acidificación del pH intestinal dificultando la colonización por bacterias patógenas, como los ácidos grasos de cadena corta (60) ya mencionados anteriormente al describir las funciones metabólicas de la flora intestinal y el ácido láctico, y algunos metabolitos como peróxido de hidrógeno, diacetil y dióxido de carbono que tienen un efecto directo sobre la membrana celular de la bacteria (62).

Por último, se ha visto que los bacilos ácido lácticos tienen la capacidad de unirse a los receptores de adhesión, favoreciendo la colonización por ellos mismos e impidiendo la incorporación de gérmenes patógenos (59). Un ejemplo de este mecanismo lo constituyen las cepas LA₁ y BG₂FO₄ del *Lactobacillus acidophilus* que se adhiere a las líneas celulares Caco2 y HT29 del epitelio intestinal, inhibiendo la adhesión de patógenos (61). Esto mismo se ha demostrado con el *Lactobacillus casei* GG (62). Se ha descrito la presencia de una sustancia de naturaleza proteica extracelular involucrada en la adhesión de ambos lactobacilos (*acidophilus* y *casei* GG) denominado: Factor promotor de adhesividad (59).

Desde la antigüedad se han utilizado diferentes mezclas de microorganismos vivos (productos de leche fermentada ó cataplasmas de moho de pan) para tratar infecciones (63). En 1907 Elías Metchnikoff sugirió que las bacterias que crecen en el intestino grueso del humano influían en la salud y enfermedad del hospedero (64).

En 1908 demostró in vitro que el *Vibrio cholerae* podía ser estimulado ó inhibido por otra bacteria, y postuló que el desarrollo de la infección por este germen dependía de la composición de la flora intestinal. También sugirió que la producción crónica de toxinas podía causar auto intoxicación y que alterando la flora indígena mediante la ingestión de leche fermentada podían aminorar estos efectos. Estas "bacterias buenas" han sido sujetas a estudio, y se ha dado el nombre de probióticos a estos microorganismos antagonistas de gérmenes patógenos (64).

Saavedra y colaboradores llevaron a cabo un ensayo clínico controlado, doble ciego, en 55 niños de 5 a 24 meses de edad, hospitalizados por causas distintas a diarrea, que fueron asignados a dos grupos, uno recibió una fórmula láctea adicionada con *Bifidobacterium bifidum* y *Streptococcus thermophilus* y el otro fórmula láctea estándar sin probiótico. Fueron seguidos durante 17 meses, encontrándose que el 31% del grupo que recibió la fórmula sin probiótico desarrolló diarrea en comparación con el 8% en el grupo con probiótico. Al 39% del grupo que recibió la fórmula sin probiótico se le aisló RVH por lo menos en una ocasión, mientras que en el que recibió el probiótico sólo se aisló en el 10%. De esta manera se demostró una disminución en la incidencia de diarrea aguda y de infección por RVH en el niño hospitalizado (65).

Existen varios estudios que valoran el papel de los probióticos en el tratamiento coadyuvante de la diarrea aguda, posterior a la hidratación oral. La mayoría de los estudios se han realizado usando *Lactobacillus casei* GG en diarrea

por RVH. En estos estudios se aprecia notable mejoría del cuadro a partir del segundo día de tratamiento, con mejor consistencia de las evacuaciones y menor cantidad de éstas, así como menor duración en días (66-68). En estos estudios también se observó el papel inmunomodulador de los lactobacilos, observándose un aumento en la producción de IgA específica contra RVH y un aumento de células productoras de inmunoglobulinas. Si bien estos resultados son alentadores, es preciso llevar a cabo mayor cantidad de estudios, a mayor escala y transpolarlos a lo que ocurre en las diarreas ocurridas en la comunidad y no sólo en pacientes hospitalizados, para ver el impacto real que tiene el administrar exógenamente los lactobacilos tanto para tratamiento como para prevención de la diarrea.

Para demostrar el papel protector de la administración de bacilos ácido lácticos en comunidad, se llevó a cabo un ensayo clínico controlado en una cohorte de 408 niños entre 12 y 36 meses de edad en una comunidad de la periferia de la ciudad de México, a los cuales se les asignó una de tres bebidas. Los niños recibieron una fórmula láctea suplementada con: 1) *Lactobacillus reuteri*, 2) *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium animalis* y 3) un placebo. Los niños fueron seguidos durante 4 meses. Se observó que los niños alimentados con las bebidas suplementadas con bacilos ácido lácticos tuvieron una incidencia de diarrea significativamente menor *L. reuteri*: RR 0.67, IC 95% 0.46-0.99 y *L. acidophilus* + *B. bifidum*: RR 0.75%, IC 95% 0.51-1.09 que el grupo control (69). Así mismo se observó que un 30% de los niños no se colonizaron en forma adecuada con bacilos ácido lácticos ($< \log 2.8$ UFC/gramo de heces) y tuvieron un riesgo de diarrea tres veces mayor (RR 3.2 IC 95% 1.4-9.1), que los niños con un grado de colonización mayor ($> \log 2.8$ UFC/ gramo de heces)⁷⁰. Si bien la protección conferida por la administración exógena de bacilos ácido láctica no fue estadísticamente significativa,

se logra ver una tendencia. Por otro lado la presencia de un nivel de colonización como protector contra la enfermedad diarreica sienta las bases para explorar este aspecto en la incidencia natural (sin intervenciones) de las infecciones gastrointestinales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño del estudio. Se llevó a cabo un estudio de casos y controles anidado en una cohorte. Se siguió prospectiva y longitudinalmente una cohorte de niños entre 0 y 20 meses de edad (0 a 12 meses al momento de la inclusión), entre octubre de 1998 y mayo de 1999, en la comunidad de San Pedro Mártir, Tlalpan. Se identificaron a aquellos niños que desarrollaron un episodio de diarrea asociado a RVH y se seleccionaron 3 controles sin diarrea de la misma cohorte, pareando por edad.

Descripción de la comunidad en estudio San Pedro Mártir es una comunidad que se localiza al sudoeste de la periferia de la Ciudad de México; cuenta con aproximadamente 45,000 habitantes. El proceso de asentamiento de la población ha producido una importante diversidad sociodemográfica entre los habitantes, con gran variedad en las condiciones de vida, económicas y de vivienda. Más del 50% de los habitantes de esta comunidad conviven en un cuarto, con más de 4 miembros de la familia. Los hombres trabajan en diferentes actividades manuales, con ó sin educación formal, pero sin gran variación en los salarios que perciben. El 15% de los hombres, con familias jóvenes, trabajan en el ejército mexicano y viven en esta zona durante su entrenamiento. Aunque es raro que las mujeres trabajen, su número se incrementa día con día. La comunidad cuenta con un Centro de Salud coordinado por la Secretaría de Salud, que ofrece atención prenatal, inmunizaciones y consulta pediátrica.

Elegibilidad

Criterios de inclusión

- Niños de 0 - <13 meses de edad de ambos sexos.
- Residentes de la comunidad de San Pedro Mártir que no planeaban cambiar de domicilio durante el seguimiento.

Criterios de exclusión

- Peso \leq 2.200Kg al nacimiento
- Antecedente de estancia hospitalaria prolongada (\geq 7 días) al nacimiento.
- Episodio de diarrea al momento ó durante los 7 días previos a su inclusión en el estudio.
- Diarrea crónica.
- Evidencia clínica de inmunodeficiencia.
- Ingesta de medicamentos inmunosupresores.

Criterios de eliminación

- Niños cuyos padres no desearan continuar por más tiempo en el estudio.
- Cambio de domicilio fuera de la comunidad de estudio.
- Todos los sujetos en los que no se pudo obtener una muestra fecal ó información acerca de su alimentación y patrón de evacuaciones en un periodo mayor a 2 semanas.

Selección de la población. Previo a la inclusión de los niños en el estudio, se realizó un censo de la comunidad con la finalidad de identificar a los sujetos que cumplieron con los criterios de elegibilidad del estudio. Se invitó a los padres de los

niños a participar en el estudio, y los que aceptaron firmaron una carta de consentimiento informado. El estudio fue aprobado por el Comité de Investigación en Humanos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán (INCMNSZ).

Seguimiento de la cohorte. La vigilancia de la población en estudio fue llevada a cabo durante 7 meses (26 de octubre de 1998 al 31 de mayo de 1999). Todos los niños incluidos en el estudio fueron visitados semanalmente en su domicilio por una promotora social, quien aplicaba un cuestionario a la madre del niño, el cual contenía información acerca del patrón de evacuaciones del niño durante las 24 horas previas a la visita, tipo de alimentación recibido por el niño en éste mismo periodo de tiempo, presencia de diferentes signos y síntomas de enfermedades, incluyendo en éstos diarrea e ingesta de medicamentos, a partir de la última visita. Durante cada visita la promotora social proporcionaba a cada familia un recipiente de plástico seco para la obtención de una muestra de heces para el aislamiento de RVH en caso de presentarse un episodio de diarrea, y uno con medio de transporte para la recolección de muestras fecales para la cuantificación de *Lactobacillus* spp. Se pidió a la madre que la muestra se recolectara lo más cercano posible al día en que inició el cuadro diarreico. En caso de que la familia no contara con refrigerador, se suministraba una hielera con congelantes para mantener la muestra fecal en condiciones de refrigeración hasta que la promotora la recolectara en el transcurso de la mañana. Las muestras fueron transportadas al laboratorio del departamento de Infectología del INCMNSZ la misma mañana en que se recolectaron.

Las muestras fecales para la identificación de RVH se recolectaron durante los episodios de diarrea, mientras que las muestras fecales para la cuantificación de

Lactobacillus spp. se recolectaron cada 15 días. Se instruyó a los padres acerca de los principales signos y síntomas a identificar en caso de que su hijo tuviera diarrea (número, consistencia y características de las evacuaciones). En los casos de diarrea, los padres avisaban vía telefónica, por medio de la promotora social ó acudían directamente a la clínica, dentro de las primeras veinticuatro horas de haber iniciado el cuadro diarreico. Un médico acudía al domicilio del niño para verificar la ocurrencia del episodio de diarrea, realizaba historia clínica completa y exploración física, y daba seguimiento al episodio hasta su completa resolución. Todos los episodios fueron seguidos hasta 7 días después del primer día sin diarrea.

Definiciones operacionales

Diarrea: La ocurrencia de un episodio de diarrea se definió como la presencia de:

- 1 Tres ó más evacuaciones líquidas en 24 horas.
- 2 Dos ó más evacuaciones con cambio de consistencia, fuera de su patrón usual de evacuaciones en 24 horas.
- 3 Al menos una evacuación con sangre, disminuida de consistencia, durante 24 horas.

Final del episodio: Primer día que las evacuaciones del niño volvieron a su patrón habitual.

Periodo Inter-episodio: Cuando hubieron transcurrido por lo menos 7 días entre el final de un episodio y la presencia de un nuevo episodio de diarrea.

Colonización intestinal: Niveles de *Lactobacillus* spp. ≥ 4 Log UFC/g de heces.

Alimentación al seno materno: Ingesta de por lo menos una toma de leche al día.

Fórmula: Por lo menos una toma de leche diferente a la materna, ya sea modificada en proteínas ó leche entera de vaca en 24 horas.

Ingesta de alimentos sólidos: Ingesta de por lo menos una toma de alimentos, como líquidos nutritivos y alimentos sólidos de cualquier naturaleza.

Recolección de muestras y métodos de laboratorio. Se recolectó una muestra fecal durante los episodios de diarrea para la identificación de RVH. Esta muestra se depositó en un bote seco de plástico y fue transportada en refrigeración y posteriormente congelada a -70°C , hasta su procesamiento. Se recolectó una muestra fecal quincenalmente para la cuantificación de lactobacilos. Se recolectaron aproximadamente 2 g de heces y se colocaron en un vial previamente pesado que contenía 15 ml de un medio de transporte con buffer de fosfato y 10% de glicerol. La muestra fecal fue dispersada en el medio con una cucharilla provista adherida a la cubierta del vial. Posteriormente fue agitada hasta formar una mezcla homogénea y llevada por la promotora al laboratorio en un tiempo menor a 24 horas. Una vez en el laboratorio, las muestras fueron homogeneizadas con un homogeneizador (stomacher) y repartidas en alícuotas de 1.8 ml en viales criogénicos y congelados a -70°C .

Muestra fecal para identificación de RVH. Se realizó un ensayo inmuno enzimático (EIA), utilizando el método comercial Premier Rotaclone (Meridian). Se cubrieron las fosas microtituladas de una placa con anticuerpos monoclonales contra el gen VP6 del RVH. Se agregó una alícuota de muestra fecal y se incubó simultáneamente con un anticuerpo monoclonal combinado con peroxidasa de rábano, quedando el antígeno del RVH a manera de sándwich entre la fase sólida de anticuerpos monoclonales y los anticuerpos unidos a enzimas. Después de 60 minutos de incubación a temperatura ambiente, se lavó la placa para remover los anticuerpos unidos a las enzimas que no se unieron al antígeno. Se agregaron el sustrato (peróxido de urea) y el cromógeno (TMB) y se incubaron durante 10 minutos

a temperatura ambiente. En los casos positivos, las enzimas unidas a las fosas convirtieron el sustrato sin color a color azul. La intensidad del color azul fue directamente proporcional a la concentración del antígeno de RVH de la muestra. Posteriormente se corroboró leyendo en espectrofotómetro agregando dos gotas (100 μ l) de solución de parada (ácido sulfúrico). Se leyó la absorbancia de cada fosa a 450nm.

Muestra fecal para cuantificación de lactobacilos. Todas las muestras fueron pesadas y homogeneizadas para su procesamiento. Se realizaron diluciones seriadas de los especímenes y se inocularon 100 μ l en agar LBS (BBL, Becton Dickinson) con jugo de tomate adicionado con 1.32 ml de ácido acético, esparciéndose suavemente en la superficie del agar cubriéndose la totalidad de la placa. Se dejó secar la superficie de las placas durante 15 minutos y se colocaron en las jarras de incubación anaeróbica. Fueron incubados en anaerobiosis utilizando sobres de Gas-Pack (Oxoid) a 37°C durante 48 horas para su posterior identificación y enumeración. La identificación inicial de los lactobacilos se realizó analizando la morfología colonial característica y la tinción de Gram. Además, las colonias dudosas se confirmaron con el sistema API 50 CH (Biomérieux). El número total de bacterias se determinó mediante la diferencia de los pesos, posterior y previo a la inoculación, para obtener la cantidad de heces en gramos por volumen, y multiplicarlo por el factor de dilución, donde se pudieron contar las bacterias en el intervalo de 20-200. Las cuentas bacterianas se reportaron en unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de heces.

Análisis estadístico. Los datos del seguimiento semanal, los reportes y seguimiento de diarrea, los resultados de las cuentas de lactobacilos y los resultados de la detección de RV en heces fueron capturados en un programa para manejo de datos compatible con las computadoras IBM del INCMNSZ (Paradox, versión 4.5; Borland International, Inc. Scotts Valley, CA). Los datos fueron analizados utilizando el programa STATA (Versión 3.0: Centro de Investigación en Computación, Santa Mónica, Cal) y SPSS (Versión 8.0, SPSS, Chicago IL.). Se calcularon las tasas de incidencia dividiendo el número de episodios de diarrea y de diarrea por RVH entre el número total de meses de observación, y se calcularon sus intervalos de confianza al 95%. Se llevó a cabo un análisis de asociación entre el tipo de alimentación (lactancia materna vs no lactancia materna) y el grado de colonización por *Lactobacillus*, utilizando una prueba de chi-cuadrada de Mantel y Haenszel. Para el análisis de la asociación entre la ocurrencia de diarrea por RVH y variables como la alimentación al seno materno, fórmula láctea, alimentos sólidos y cuentas de *Lactobacillus*, se llevó a cabo un análisis univariado utilizando un modelo de regresión logística condicionada (71). Debido a la colinearidad observada entre las variables en estudio, se utilizó un análisis de componentes principales, el cual es un procedimiento matemático que transforma un conjunto de variables correlacionadas de respuesta, en un conjunto menor de variables no correlacionadas llamadas componentes principales (72). El objetivo de los componentes principales es el de reducir la dimensionalidad del conjunto de datos e identificar nuevas variables significativas subyacentes (73). Una vez que se redujo la dimensión de nuestras variables, estas quedaron agrupadas en 2 componentes principales, los cuales fueron analizados en un modelo de regresión logística multivariada. Se consideró un valor de $p \leq 0.05$ de 2 colas como estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Se realizó un censo poblacional durante el mes de octubre de 1998 para identificar lactantes de 0 a 12 meses de edad. Durante el seguimiento los mayores alcanzaron la edad de 18 meses. Se identificaron 190 sujetos elegibles, los cuales fueron invitados a participar en el estudio durante la tercera semana de octubre. Se incluyeron 157 lactantes, 78 (49.7%) niños y 79 (50.3%) niñas. La principal causa por la cual la mamá no aceptó que su hijo participara en el estudio fue la falta de disposición para la recolección de las muestras. La distribución por grupos de edad al inicio del estudio fue: 48 (30.6%) lactantes en el grupo de 0 a 3 meses, 35 (22.3%) en el grupo de 3 a 6 meses, 45 (28.7%) en el grupo de 6 a 9 meses y 29 (18.5) en el grupo de 9 a 12 meses.

Seguimiento de la cohorte. Los lactantes fueron seguidos en un periodo comprendido entre el 26 de octubre de 1998 y el 31 de mayo de 1999. Los sujetos en estudio aportaron un total de 947 meses de seguimiento (media 6.5 meses, mediana 7.75 meses, desviación estándar 2.22, intervalo 0.5-7 meses). De los 157 niños que iniciaron el seguimiento, 117 (74.5%) lo terminaron en su totalidad, con un total de 1127 meses esperados de seguimiento, con una pérdida de 179 (16%) meses. Las causas de baja del estudio fueron: cambio de domicilio (13%), falta de disposición para obtención de las muestras fecales del niño por parte de la madre (7%), el no localizar a la madre y a su hijo en un periodo mayor a 2 semanas (2%), inconformidad con la atención médica (1%), fallecimiento del niño a consecuencia de neumonía (1%) e inicio laboral de la madre (1%). Se obtuvo muestra para detección

de RVH en todos los episodios diarreicos y de las 2067 muestras esperadas para cultivo de *Lactobacillus* spp. se recolectaron 1898 (91.82%).

Durante el seguimiento del estudio, 109 niños fueron alimentados al seno materno durante 656 (69.27%) semanas totales de seguimiento. Los 157 niños colaboraron con 440 semanas recibiendo fórmula y 657 semanas recibiendo alimentos sólidos. Como se menciona en las definiciones operacionales, llamamos fórmula a la ingesta de cualquier tipo de leche diferente a la materna, incluyendo leches modificadas en proteínas y leche entera de vaca, y alimentos sólidos a la ingesta de cualquier otro tipo de alimento como líquidos nutritivos y alimentos sólidos, durante un periodo de 24 horas.

Incidencia de diarrea. Se documentaron 169 episodios de diarrea durante el periodo de estudio. La incidencia global de diarrea fue de 17.8 episodios / 100 niño-mes. La incidencia de diarrea dentro de los primeros tres meses de edad fue de 8.14 episodios/100 niño-mes. Esta incidencia fue en ascenso en los grupos de 3 a 6 meses y 6 a 9 meses (14.2 y 15.35 episodios/niño mes, respectivamente). La máxima incidencia de diarrea se observó en el grupo de 9 a 12 meses, siendo ésta de 24.25 episodios/niño mes. La incidencia de diarrea disminuyó después de los 12 meses de edad a 6.43 episodios/100 niño-mes, 14.29 episodios/100 niño-mes en el grupo de 15 a 18 meses y 8.69 episodios/100 niño-mes en los mayores de 18 meses (Tabla 2).

Incidencia de diarrea por RVH. En 16 episodios de diarrea se identificó RVH por excreción fecal. La incidencia de diarrea por RVH fue de 1.68 episodios / 100 niño-mes. La incidencia de diarrea por RVH dentro de los primeros 3 meses de vida fue de 1.35 episodios/niño mes. La mayor incidencia se presentó entre los 3 y 6 meses de edad, siendo de 2.18 episodios/100 niño mcs. En el grupo de 6 a 9 meses

de edad fue de 1.18 episodios/100 niño-mes y en el de 9 a 12 meses fue de 1.83 episodios/100 niño mes. La incidencia más baja ocurrió en el grupo de 12 a 15 meses y fue de 0.5 episodios/niño mes. En el grupo de 15 a 18 meses aumentó a 1.78 episodios/100 niño mes, no presentándose ningún caso a mayor edad (Tabla 3).

Estacionalidad. La incidencia de enfermedad diarreica tuvo variaciones en los diferentes meses de seguimiento. En octubre se observó una incidencia de 20.51 episodios/100 niño-mes, presentándose un descenso notable en la incidencia en los meses de noviembre (7.38 episodios/100 niño-mes) y diciembre (7.61 episodios/100 niño-mes). En los meses siguientes la incidencia volvió a aumentar, siendo en enero de 21.59 episodios/100 niño-mes, en febrero de 27.82 episodios/100 niño-mes, en marzo de 20.37 episodios, en abril de 24.48 episodios/niño-mes y en mayo de 20.92 episodios/niño mes. La diarrea secundaria a infección por RV se presentó durante los meses de noviembre, enero y febrero, con una incidencia en el mes de noviembre de 1.13 episodios/niño-mes. En diciembre no se presentó ningún caso, ocurriendo la mayor incidencia en los meses de enero en que fue de 5.59 episodios/100 niño-mes y en febrero que fue de 5.9 episodios/100 niño-mes (gráfica 2).

Colonización Intestinal. Treinta y uno (52%) de los 60 niños, tanto del grupo con diarrea por RVH como del grupo control, estaban colonizados por *Lactobacillus* spp (gráfica 3). No se observó una correlación estadísticamente significativa entre el grado de colonización y el grupo de edad (r de Pearson=0.11, $p=0.40$).

Selección de casos y controles para el análisis de las hipótesis en estudio. Se detectaron 16 episodios de diarrea por RVH, de los cuales 2 correspondieron a un mismo niño, por lo que para el análisis de casos y controles anidado en la cohorte, solo se tomaron en cuenta 15 pacientes. Se eligieron tres niños (controles) que no hubieran tenido diarrea durante el seguimiento por cada

niño que presentó diarrea por RVH, se pareó por edad y se asignó cada control de manera aleatoria. En el grupo de casos hubo 7 (46%) niños y 8 (54%) niñas, y en el grupo control 18 (40%) niños y 27 (60%) niñas ($p = 0.58$).

Colonización por *Lactobacillus* spp y lactancia materna. Con la finalidad de determinar si la lactancia materna se asocia con un aumento en el grado de colonización intestinal por *Lactobacillus* spp., se midió la colonización intestinal por éstos en muestras recabadas 7 a 15 días previos al episodio diarreico, y se compararon los niveles encontrados entre los niños alimentados al seno materno y los niños que no recibían leche materna en ese mismo periodo. La gráfica 4 muestra en el eje de las ordenadas el grado de colonización intestinal en unidades formadoras de colonias por gramo de heces en escala logarítmica con base 10 (Log UFC/g de heces), y en el eje de las abscisas el porcentaje de la población que presentó este nivel de colonización. Las columnas negras representan a los niños que no tomaban leche materna, mientras que las grises a los que tomaban leche materna. En esta gráfica se aprecia que los niños alimentados con leche materna son los que presentan mayor grado de colonización intestinal, en comparación con los niños que no recibían leche materna (razón de verosimilitud $\chi^2=4.73$, $p = 0.029$).

Grado de colonización por *Lactobacillus* spp y diarrea. Para determinar si la colonización intestinal por *Lactobacillus* spp. (\geq Log 4 UFC/g de heces) disminuye la ocurrencia de episodios de diarrea por RVH, y para poder controlar la influencia de otros factores como los hábitos dietéticos, se describen a continuación algunas de las características observadas entre el grupo de niños que presentó diarrea por RVH y el grupo control que no presentó diarrea durante el seguimiento.

Los niños del grupo control tuvieron una mayor colonización por *Lactobacillus* spp. (media geométrica: 5.79, IC 95% 4.92-6.82) que los niños que tuvieron diarrea

por RVH (media geométrica 4.14, IC 95% 2.98-5.76; $p=0.10$). Esta diferencia se muestra en la gráfica 5. Se realizó un análisis univariado mediante el método de regresión logística condicionada, en el cual se observó que la colonización por *Lactobacillus* spp mayor de 4 Log UFC/g de heces protege contra la diarrea por RVH (RM 0.34, IC95% 0.09-1.23, $p=0.10$). Así mismo se observó que el ser alimentado al seno materno es un factor protector (RM 0.19, IC95% 0.04-1.04, $p=0.03$), mientras que el ser alimentado con fórmula láctea (RM 4.27, IC95% 1.03-17.7, $p=0.03$) y la ingesta de alimentos sólidos (RM 11.32, IC95% 1.28-99.76, $p=0.009$) aumentan el riesgo de presentar diarrea por RVH, con valores estadísticamente significativos (tabla 4). También se observó que los lactantes menores de 6 meses de edad con niveles de colonización menores de 4 Log. UFC/g de heces, presentan mayor riesgo de presentar diarrea por RVH (RM 0.74, IC 95% 0.09-6.29, $p=0.10$), mientras que los de 7 a 18 meses tienen un mayor riesgo de presentar diarrea por RVH (RM 0.22, IC 95% 0.04-1.20, 0.06), presentando una tendencia hacia la significancia estadística (tabla 5).

Análisis de componentes principales. Debido a la correlación existente entre el recibir leche materna y fórmula láctea, leche materna y alimentos sólidos, y la edad y el recibir alimentos sólidos (tabla 6), en el modelo de regresión logística bivariado, se tenía que excluir una de estas variables para poder llevarse a cabo la estimación del modelo. Así mismo se observó una inestabilidad importante en la estimación iterativa del modelo (tabla 7), la cual se podría explicar, tanto por la colinearidad existente, como por el tamaños de muestra. La colinearidad entre variables independientes puede causar dos tipos de problemas estadísticos en los procedimientos algebraicos. La dificultad principal es que la correlación entre las variables puede alterar su efecto combinado sobre la variable dependiente (diarrea

por RVH) llevando a un resultado distorsionado si ambas variables independientes se mantienen en el modelo de regresión. Una segunda dificultad que es un problema igualmente importante es que las circunstancias extremas de colinearidad pueden hacer difícil ó imposible calcular los coeficientes de regresión. La existencia de una alta correlación entre 2 variables, no necesariamente implica que una deba ser eliminada; las 2 variables pueden tener un efecto individual importante en la variable dependiente, el cual se puede evidenciar con un manejo estadístico apropiado de los datos.

Debido a lo anterior y con la finalidad de utilizar al detalle la información de estas variables, es decir, evitar la colinearidad entre éstas y aprovechar la información recolectada sobre el número de veces que el niño recibió de los diferentes tipos de alimentos en 24 horas, en lugar de analizar estas variables de manera dicotómica, se llevó a cabo un análisis descriptivo de componentes principales.

La colinearidad sospechada en el análisis de correlación multivariada se confirmó en la matriz de correlación llevada a cabo como primer paso del análisis de componentes principales, en donde se observó una correlación negativa entre la alimentación al seno materno y la ingesta de fórmula láctea y entre la alimentación al seno materno y el consumo de alimentos sólidos. También se observó una correlación positiva entre el consumo de alimentos sólidos y la edad cumplida en meses (tabla 6). El peso específico de cada una de las variables al final del método de extracción, se muestra en la tabla 8, donde la variable que explica la mayor parte de la varianza fue el número de veces que se alimentó el niño con leche materna (0.87) y la que explica la menor parte de la variabilidad del fenómeno fue la edad del niño en meses (0.572).

Se obtuvieron cinco componentes principales que explicaban el 100% de la varianza, de los cuales sólo se tomaron en cuenta los dos primeros componentes por explicar la mayoría de la varianza (75.319%, tabla 8). El primer componente principal estuvo constituido por las variables que se asociaron con un menor ó mayor riesgo de diarrea por RVH, mientras que el segundo componente se relacionó con el grado de colonización por *Lactobacillus* spp (tabla 9).

En la gráfica de componentes en espacio rotado (gráfica 6) podemos observar que el ser alimentado con más tomas de leche materna disminuye el riesgo de presentar diarrea por RVH (0.11) y aumenta la probabilidad de estar colonizado por *Lactobacillus* spp (0.25). El estar colonizado por un mayor número de *Lactobacillus* spp. disminuye el riesgo de presentar diarrea por RVH (0.13). El ser alimentado con más tomas de fórmula láctea aumenta el riesgo de presentar diarrea por RVH (0.75) y disminuye la probabilidad de ser colonizado por *Lactobacillus* spp (0.53). El ser alimentado con mayor frecuencia con alimentos sólidos, y a mayor edad se tenga en meses, aumentan el riesgo de presentar diarrea por RVH (0.78 y 0.61, respectivamente) y aumentan de manera moderada la probabilidad de ser colonizados por *Lactobacillus* spp (0.53 y 0.44, respectivamente, tabla 10).

Los 2 componentes principales fueron analizados en un modelo de regresión logística multivariada. El primer componente (que representa la relación entre una menor ingesta de leche materna con un consiguiente aumento de la ingesta de fórmula y alimentos sólidos) se asoció con un riesgo mayor para diarrea por RVH (RM=2.82, IC95% 0.88-8.99, p=0.079), mientras que el segundo componente, que representa el grado de colonización del intestino del niño, se mantuvo la dirección de la asociación hacia la protección RM=0.74, IC95% 0.32-1.73, p=0.50, tabla 11), pero con un error tipo 1 muy importante (tabla 11).

DISCUSIÓN

En este estudio de casos y controles anidado en una cohorte en que se siguió longitudinalmente a un grupo de 157 niños de 0 a 20 meses de edad durante una estación de RVH, se observó una incidencia global de diarrea de 17.83 episodios/100 niño-mes encontrándose mayor incidencia en el grupo de edad de 9 a 12 meses. La incidencia de diarrea por RVH fue menor (1.68/100 niño-mes) a la reportada en estudios previos en la misma comunidad (4.83 episodios/100 niño-mes) aun tomando en cuenta que en el presente estudio se analizó sólo una estación de RVH, en comparación con el estudio anterior en que se analizaron 2 años completos de seguimiento, que incluían periodos de tiempo fuera de la estación de RVH.

A diferencia de lo reportado en México, donde la estación en que predominaba el RVH ocurría de octubre a febrero, con un pico estacional durante el mes de noviembre, en el presente estudio se reportaron 2 casos aislados en noviembre, ninguno en diciembre, y una mayor incidencia en los meses de enero y febrero, sin presentarse ningún caso en el resto del seguimiento (marzo a mayo), coincidiendo ésta con lo reportado en otros centros hospitalarios de la ciudad de México durante esta misma estación, en que también los episodios de diarrea por RVH que requirieron hospitalización se observaron tardíamente, presentándose con mayor frecuencia en el mes de enero (comunicación verbal).

Se han reportado cambios en el patrón estacional de diferentes virus y bacterias. En un estudio realizado en Perú entre 1997 y 1998, se observó que la incidencia de diarrea tuvo un incremento de un 200%. Por cada grado centígrado que aumentaba la temperatura se observó un 8% de aumento en la incidencia de diarrea. Así mismo se observó un incremento en las diarreas de etiología bacteriana, propias

de verano, durante los meses fríos, lo que resultó en una pérdida de la estacionalidad de muchas de las enfermedades de etiología infecciosa (74).

La comunidad en estudio se caracterizó por madres que comparten un alto grado cultural hacia la lactancia materna. El porcentaje de madres que lactan a sus hijos de manera exclusiva hasta los 6 meses es muy alta, así como la lactancia prolongada después del año de vida. Diversos estudios han reportado que la colonización intestinal es diferente en los niños alimentados con leche materna que en los alimentados con fórmula (75,76,77). Harmsen demostró que esta colonización por bacilos ácido lácticos es favorecida por la alimentación con la leche materna y está dada básicamente por las bacterias del género *Bifidobacterium* (95%), y en menor grado por *Lactobacillus* y enterobacterias. (78). El objetivo de nuestro estudio fue el de determinar el papel de las bacterias del género *Lactobacillus*, ya que los estudios llevados a cabo, en cuanto a protección contra la enfermedad diarreica, es con bacterias de este género. En el presente estudio, se determinó la relación existente entre la lactancia materna y el grado de colonización por bacterias del género *Lactobacillus* de manera individual, durante los primeros 18 meses de vida. El grado de colonización por *Bifidobacterium* lo cuantificaremos posteriormente, ya que en nuestro laboratorio no contamos con experiencia en el cultivo de *Bifidobacterium*. En el análisis univariado se observó que los niños en cuya alimentación estaba incluida la leche materna, presentaron mayor grado de colonización intestinal por *Lactobacillus* spp, en comparación con los niños que recibieron otro tipo de alimentación, siendo esta diferencia estadísticamente significativa. Este resultado lo tomamos con reserva, ya que la variable fue analizada de manera dicotómica y no se da el peso específico al grado de exposición.

Con el propósito de conocer el la protección natural que confiere el grado de colonización intestinal por *Lactobacillus* en el niño, en contra de la enfermedad diarreica causada por RVH, las muestras que se analizaron correspondieron a los días 7 a 15 previos al desarrollo de un episodio diarreico por RVH. En el análisis global de los datos no se observó una asociación estadísticamente significativa entre el grado de colonización intestinal por *Lactobacillus* spp y la presencia de enfermedad diarreica, sin embargo, al estratificar por grupos de edad, se observó una tendencia hacia un mayor grado de protección contra la enfermedad diarreica causada por RVH en el grupo de niños mayores de 6 meses de edad. Esta significancia estadística marginal pudo explicarse por lo reducido del tamaño de la muestra obtenida, ya que ésta se calculó en base a la incidencia de diarrea por RVH de años anteriores, que como ya se mencionó, tuvo una notable reducción en el periodo en que se realizó este estudio.

Se han propuesto diferentes mecanismos mediante los cuales los lactobacilos pueden prevenir la enfermedad diarreica. Entre los mecanismos propuestos tenemos, la competencia por nutrientes y sitios de adhesión en la mucosa intestinal que impiden la colonización por organismos patógenos, la producción de sustancias bactericidas y la estimulación del sistema inmune. Se desconoce con certeza cual de estos mecanismos pudiera ser el involucrado en la prevención de la diarrea por RVH, pero pudiera estar involucrado el bloqueo de sitios de unión para RVH, como se ha demostrado con otros agentes patógenos.

Diferentes artículos de revisión refieren cual es la cronología de la colonización intestinal durante los primeros días de vida, más no existen estudios en que se analicen las diferencias en el grado de colonización con respecto a la edad del niño, en los primeros meses de vida. Inicialmente encontramos que el grado de

colonización intestinal por *Lactobacillus* spp no se correlacionó con la edad de los niños, pero al dicotomizar ambos grupos en niños mayores y menores de 6 meses de edad, en el análisis global de los datos para ver la asociación entre el grado de colonización intestinal por *Lactobacillus* spp y el riesgo de presentar enfermedad diarreica, observamos que existía una significancia marginal entre ambos grupos, ya mencionada.

Debido a la gran correlación que tuvieron entre sí las diferentes variables, y a la colinearidad observada entre las variables de alimentación, se realizó el análisis de componentes principales, el cual permitió analizar cada una de las variables de manera independiente, nulificando los efectos de la colinearidad, y darle el peso específico al grado de exposición con que se presentó cada una de ellas. El contar con los datos completos acerca del número de tomas de leche materna, fórmula láctea y alimentos sólidos que recibía el niño cada 24 horas, nos permitió analizar ésta como variable continua y no sólo de manera dicotómica como se había hecho en el análisis univariado. Se observó que la alimentación con leche materna protege contra la diarrea por RVH, de manera proporcional al número de tomas; a mayor número de tomas mayor protección. Esta protección conferida por la lactancia materna se presentó de manera independiente al grado de colonización intestinal por *Lactobacillus* spp, el cual, aunque también es proporcional al nivel de exposición, confiere mucho menos protección que la lactancia materna.

Existen otros factores en la leche materna que protegen al niño en contra de la enfermedad diarreica, diferentes a la inducción de una colonización intestinal adecuada, como lo son la secreción de IgA e IgM poliméricas que aglutinan microorganismos y otros antígenos, inhibiendo su adhesión y penetración al epitelio, la acción bactericida de la lactoferrina y la lisozima, la producción de citocinas y

factores de crecimiento que estimulan el sistema inmunológico, y la presencia de oligonucleótidos que compiten por receptores con los patógenos, adhiriéndose a su superficie e impidiendo que se unan a éstos. La presencia de otros elementos protectores en la leche materna, diferentes a los que promueven la colonización intestinal, puede explicar la independencia entre ambas variables.

Por otra parte, el consumo de fórmula láctea, el consumo de alimentos sólidos y la edad se relacionaron con un mayor riesgo de presentar diarrea por RVH. Contrario a lo observado con la lactancia materna, a mayor número de tomas de alimentos sólidos y de fórmula láctea, y a mayor edad, el riesgo de presentar diarrea por RVH es mucho mayor. En el análisis de componentes principales vimos que el grado de colonización intestinal coincide con un incremento en la edad de los lactantes, que a su vez corresponde con el consumo de alimentos sólidos. La colinearidad observada entre estas tres variables, pudiera ser la causa de que no hayamos encontrado inicialmente una correlación entre el grado de colonización intestinal y la edad de los niños.

Al aumentar el consumo de fórmula láctea y alimentos sólidos, disminuye el consumo de leche materna. Esta disminución en el consumo de leche materna se agrega a la lista de mecanismos propuestos mediante los cuales el consumo de fórmula láctea y alimentos sólidos favorecen la presencia de diarrea, como son el uso de agua contaminada para la preparación de éstos, el consumo de alimentos crudos y la contaminación propia del proceso de preparación de éstos.

A diferencia de los ensayos clínicos controlados en que se administran lactobacilos de manera exógena, éste artículo es el primero que demuestra que la colonización intestinal natural por *Lactobacillus* protege contra la enfermedad diarreica ocasionada por RVH

Conclusión

De lo anteriormente mencionado podemos concluir que:

1. Después del ajuste por otras variables, el grado de colonización del intestino del niño por *Lactobacillus spp* no se asocia con la ingesta de leche humana.
2. A mayor edad, se observó una mejor colonización natural del intestino del niño por *Lactobacillus spp*, la cual lo protege contra la diarrea por RVH.
3. Se confirma el papel protector de la leche materna en la protección del niño contra la diarrea por RVH.
4. El tomar fórmula láctea, la edad y la ingesta de alimentos sólidos se asocian con un incremento en el riesgo de diarrea por RVH.

Referencias bibliográficas

1. Murray CJL, Lopez AD. Global Burden of Disease. A comprehensive assessment of mortality and disability from diseases, injuries, and risk factors in 1990 and projected to 2020. The Harvard School of Public Health on behalf of the World Health Organization and the World Bank. 1st ed USA Harvard University Press. 1996; 457-465.
2. Datos oficiales de la Dirección General de Estadística, Informática y Evaluación de la Secretaría de Salud, México 1998.
3. Solórzano F, Guiscafré H, Muñoz O. Enfermedad diarreica aguda en pediatría. En: Santos JI. Temas de Pediatría. Infectología. 1^a. Ed. México: Interamericana-McGraw Hill, 1996; 253-64.
4. Pickering LK, Evans DJ, Muñoz O, et al. Prospective study of enteropathogens in children with diarrhea in Houston and Mexico. *J Pediatr* 1978;93:383-8.
5. Velázquez FR, Calva JJ, Guerrero ML, Mass D, Glass RI, Pickering LK, Ruiz-Palacios G. Cohort study of rotavirus serotype patterns in symptomatic and asymptomatic infections in Mexican children. *Pediatr Infect Dis J*, 1993;12:54-61.
6. Bishop RF. Development of candidate rotavirus vaccines. *Vaccine* 1993; 11:247-54.
7. Pérez-Schael I. The Impact of Rotavirus Disease in Venezuela. *J Infect Dis* 1996;174(Suppl 1):S19-21.
8. Institute of Medicine. The prospect for immunizing against rotavirus: In: New vaccine development. Establishing priorities. Diseases of importance in developing countries. Vol II. Washington DC: National Academy Press, 1986:308-18.
9. Unicomb LE, Kilgore PE, Faruque SG, et al. Anticipating rotavirus vaccines: Hospital bases surveillance for rotavirus diarrhea and estimates of disease burden in Bangladesh. *Pediatr Infect Dis F* 1997;16:947-51.

10. Glass RI, Kilgore PE, Holman RC, Jin S, Smith JC, Woods PA, Clarke MJ, Ho MS, Gentsch JR. The Epidemiology of Rotavirus Diarrhea in the United States: Surveillance and Estimates of Diseases Burden. *J Infect Dis* 1996;174(Suppl 1):S5-11.
11. Parashar UD, Holman RC, Bresee JS et al. Epidemiology of diarrheal disease among children enrolled in four West Coast health maintenance organizations. Vaccine Safety Data link Team. *Pediatr Infect Dis J* 1998;17:605-11.
12. Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ. Viral particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute nonbacterial gastroenteritis. *Lancet* 1973;1:281-3.
13. Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ. Detection of a new virus by electron microscopy of faecal extracts from children with acute gastroenteritis. *Lancet* 1974;1:149-71
14. Kapikian AZ, Light JS, Hodes HL. Studies on epidemic diarrhea of the newborn: Isolation of a filterable agent-causing diarrhea in calves. *Am J Public Health* 1943;33:1951-4.
15. Haffejee IE. The Epidemiology of Rotavirus Infections: A Global Perspective. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1995;20:275-86.
16. Palombo EA, Masendycz PJ, Bugg HC, Bogdanovic N, Barnes GL, Bishop RF. Emergence of Serotype G9 Human Rotaviruses in Australia. *J Clin Microbiol* 2000;38:1305-6.
17. Padilla-Noriega L, Méndez-Toss M, Menchaca G, Contreras JF, Romero-Guido P, Puerto FI, Guiscafré H, Mota F, Herrera I, Cedillo R, Muñoz O, Calva J, Guerrero ML, Coulson BS, Greenberg HE, López S, Arias CF. Antigenic and Genomic Diversity of Human Rotavirus VP4 in Two Consecutive Epidemic Seasons in Mexico. *J Clin Microbiol* 1998;36:1688-92.
18. American Academy of Pediatrics. Rotavirus Infections. In: Peter G, ed. 2000 Red Book: Report of the Committee on Infectious Diseases. 25th ed. Elk Grove Village, IL: American Academy of Pediatrics; 2000:493-5.

19. Matsumoto K, Hatano M, Kobayashi K, Hasegawa A, Yamazaki S, Nakata S, Chiba S, Kimura Y. An Outbreak of Gastroenteritis Associated with Acute Rotaviral Infection in Schoolchildren. *J Infect Dis* 1989;160:611-5.
20. Tao H, Changan W, Zhaoying F, Zinyi C, Xuejian C, Xiaoquang L, Guangmu C, Henli Y, Tungxin C, Weiwei Y, Shuasen D, Weicheng C. Waterborne Outbreak of Rotavirus Diarrhoea in Adults in China caused by a Novel Rotavirus. *Lancet* 1984;160:1139-42.
21. Tao H, Guangmu C, Changan W, Zinyi C, Tungxin C, Weiwei Y, Henli Y, Kinghai M. Rotavirus-like agent in adult non-bacterial diarrhoea in China. *Lancet* 1983;2:1078-9.
22. Brown DWG, Campbell L, Tomkins DS, Hambling MH. School outbreak of gastroenteritis due to atypical rotavirus. *Lancet* 1989;2:737-8.
23. Fang ZY, Ye Q, Ho M-S, Dong H, Qing S, Penaranda ME, Hung T, Wen L, Glass RI. Investigation of an Outbreak of Adult Diarrhea Rotavirus in China. *J Infect Dis* 1989;160:948-53.
24. Brüssow H, Benitez O, Uribe F, Sidoti J, Rosa K, Cravioto A. Rotavirus-Inhibitory Activity in Serial Milk Samples from Mexican Women and Rotavirus Infections in Their Children during Their First Year of Life. *J Clin Microbiol* 1993;31:595-7.
25. Meurman OH, Laine MJ. Rotavirus epidemic in adults. *N Engl J Med* 1977;296:1298-9.
26. Cunningham AL, Grohman AS, Harkness J, Law C, Marriott D, Tindall B, Cooper DA. Gastrointestinal Viral Infections in Homosexual Men Who were Symptomatic and Seropositive for Human Immunodeficiency Virus. *J Infect Dis* 1988;158:386-91.
27. Torok TJ, Kilgore PE, Matthew JC, Holman RC, Bresee JS, Glass RI and the National Respiratory and Enteric Virus Surveillance System Collaborating Laboratories. Visualizing geographic and temporal trends in rotavirus activity in the United States, 1991 to 1996. *J Pediatr Infect Dis* 1997;16:941-6.

28. Maldonado YA, Yolken RH. Rotavirus. En: Enfermedades diarreicas en el niño. Torregosa-Ferraez L, Santos-Preciado J, Rodríguez-Suárez RS, Velázquez-Jones L, García-Aranda JA, Alpuche-Aranda CL. 10ª. Ed. México: Interamericana-McGraw Hill, 1996;101-2.
29. Ball JM, Tian P, Zeng CQ-Y. Age-depended diarrhea induced by a rotaviral non-structural glycoprotein. *Science* 1996;272:101-4.
30. Bishop RF, Bugg HC, Masendycz PJ, Lund JS, Gorell RJ, Barnes GL. Serum, Fecal and Breast Milk Rotavirus Antibodies as Indices of Infection in Mother-Infant Pairs. *J Infect Dis* 1996;174(Suppl 1):S22-9.
31. Offit PA. Host Factors Associated with Protection against Rotavirus Disease: The Skies are clearing. *J Infect Dis* 1996;174(Suppl 1):S59-64.
32. Ward RL. Mechanism of Protection against Rotavirus in Human and Mice. *J Infect Dis* 1996;174(Suppl 1):S51-8.
33. Velázquez FR, Matson DO, Calva JJ, Guerrero ML, Morrow AL, Carter-Campbell S, Mass D, Glass RI, Estes MK, Pickering LK, Ruiz-Palacios G. Rotavirus protection in infants as protection against subsequent infections. *N Engl J Med* 1996;335:1022-28.
34. Moulton MH, Staat MA, Santosham M, Ward RL. The Protective Effectiveness of Natural Rotavirus Infection in an American Indian Population. *J Infect Dis* 1998;178:1562-6.
35. Bishop RF, Barnes GL Neonatal Rotavirus Infection: Possible Effect on Prevalence of Severe Diarrhoea in a Community. *J Pediatr Child Health* 1997;33:80-1.
36. O'Ryan M, Matson DO, Pickering LK. Rotavirus, Enteric Adenoviruses, Norwalk virus, and Other Gastroenteritis Tract Viruses. In: Specter S, Lancz G. *Clinical Virology Manual*. 2nd ed. New York. Elsevier Science Publishing Company, Inc. 1992:361-96
37. Matson DO, Rotaviruses. In: Long SS, Pickering LK, Prober CG. *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases*. 1st ed. New York: Churchill Livingstone. 1997:1211-5.
38. Barnes GL, Bishop RF. Rotavirus infection and prevention. *Current Opinion Pediatr* 1997;9:19-23.

39. Soriano-Brucher H, Avendaño P, O'Ryan M, et al. Bismuth subsalicylate in the treatment of acute diarrhea in children. *Pediatrics* 1991;87:18-27.
40. Figueroa-Quintanilla D, Salazar-Lindo E, Sack RB, et al. A controlled trial of bismuth subsalicylate in infants with acute watery diarrheal disease. *N Engl J Med* 1993;328:1653-8.
41. Sarker SA, Casseall TH, Mahalanabis D, Alam NH, Albert MJ, Brüssow H, Fuchs GJ, Hammerström L. Successful treatment of rotavirus diarrhea in children with immunoglobulin from immunized bovine colostrum. *Pediatr Infect Dis J* 1998;17:1149-54.
42. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). Rotavirus Vaccine for the Prevention of Rotavirus Gastroenteritis among Children. US Department of Health & Human Services. Centers of Disease Control and Prevention. 1999;48:1-20.
43. Barnes G. Rotavirus Vaccine. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000;30:12-7.
44. Rennels M. The Rotavirus Vaccine Story: A Clinical Investigator's View. *Pediatrics* 2000;106:123-5.
45. Nakagomi T Rotavirus Infection and Intussusception: A View from Retrospect.
46. Walker WA Role of Nutrients and Bacterial Colonization in the Development of Intestinal Host Defense. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000;30(Suppl 2):S3-7.
47. Bengmark S, Jeppsson B. Gastrointestinal Surface Protection and Mucosa Reconditioning. *J Parent Ent Nutr*. 1995; 19: 410-5
48. Catto-Smith A. Gut flora and mucosal function. *Asia Pacific J Clin Nutr* 1996;5:36-39.
49. Nestel P. Intestinal flora and human health –introductory remarks. *Asia Pacific J Clin Nutr* 1996;5:1-9.
50. Mitsuoka T. Intestinal flora and human health. *Asia Pacific J Clin Nutr* 1996;5:2-9
51. Jarvis WR. The Epidemiology of Colonization. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1996;17:47-52.
52. Salminen S, Deighton M, Lactic Acid Bacteria in the Gut in normal and Disordered States. *Dig Dis* 1992;10:227-38.

53. Falk PG, Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI. Creating and Maintaining the Gastrointestinal Ecosystem: What we Know and Need to Know from Gnotobiology. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998;62:1157-70.
54. Yasui H, Mike A, Ohwaki M. Immunogenicity of *Bifidobacterium breve* and Change in Antibody Production in Peyer's Patches After Oral Administration. *J Dairy Sci.* 1989;72:30-35.
55. Yasui H, Kiyoshima J, Ushijima H. Passive Protection against Rotavirus-Induced Diarrhea of Mouse Pups Born to and Nursed by Dams Fed *Bifidobacterium breve* YIT4064. *J Infect Dis* 1995;403:403-9.
56. Silva M, Jacobus NV, Deneke C, Gorbach SL. Antimicrobial Substance from a Human *Lactobacillus* Strain. *Antimicrob Agents Chemoter.* 1987;31:1231-3.
57. Talarico TL, Dobrogosz WJ. Production and Isolation of Reuterin, a Growth Inhibitor Produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrob Agents Chemoter.* 1988; 32: 1854-8.
58. Talarico TL, Dobrogosz WJ. Chemical characterization of an Antimicrobial Substance Produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrobs Agents Chemoter.* 1989; 33: 674-9.
59. Mishra C, Lambert J. Production of anti-microbial substances by probiotics. *Asia Pacific J Clin Nutr.* 1996;5:20-24.
60. Topping DL. Short-chain fatty acids produced by intestinal bacteria. *Asia Pacific J Clin Nutr.* 1996;5:15-9.
61. Bernet MF, Brassart D, Neeser JR, Servin AL. *Lactobacillus acidophilus* LA1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachments and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut.* 1994; 35: 483-9
62. Goldin BR, Gorbach SL, Saxelin M, Barakat S, Gualtieri L, Salminen S. Survival of *Lactobacillus* Species (strain GG) in Human Gastrointestinal Tract. *Digestive Diseases and Sciences.* 1992;37:121-8.
63. Elmer GW, Surawicz CM, McFarland LV. Biotherapeutic Agents. *JAMA.* 1996;275:870-6.

64. Saavedra JM. Microbes to Fight Microbes: A not so Novel Approach to Controlling Diarrheal Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 1995; 21: 125-9.
65. Saavedra JM, Bauman NA, Oung I, Perman JA, Yolken RH. Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. *Lancet* 1994;344:1046-9
66. Kaila M, Isolauri E, Soppi E, Virtanen E, Laine S, Arvilommi H. Enhancement of the Circulating Antibody Secreting Cell Response in Human Diarrhea by a Human *Lactobacillus* Strain. *Pediatr Res* 1992;32:141-4.
67. Isolauri E, Kaila M, Mykkänen H, Ling WH, Salminen S. Oral Bacteriotherapy for Viral Gastroenteritis. *Dig Dis Sci* 1994;12:2595-600.
68. Kaila M, Isolauri E, Saxelin M, Arvilommi H, Vesikari T. Viable versus inactivated *Lactobacillus* strain GG in acute rotavirus diarrhoea. *Arch Dis Child* 1995;72:51-3.
69. Ruiz-Palacios GM, Guerrero ML, Hilty M, Dohnalek M, Newton P, Calva JJ, Costigan T, Tuz F, Arteaga F. Feeding of a probiotic for the prevention of Community-Acquired Diarrhea in Young Mexican Children. *Pediatric Academic Societies' Annual Meeting in Washington, May 1996*;184A-1089.
70. Ruiz-Palacios GM, Tuz F, Arteaga F, Guerrero ML, Dohnalek M, Hilty M. Tolerance of Fecal Colonization with *Lactobacillus reuteri* in Children Fed a Beverage with a Mixture of *Lactobacillus* spp. *Pediatric Academic Societies' Annual Meeting in Washington, May 1996*;184A-1090.
71. Fleiss JL. The Analysis of Data from Matched Samples. In: Fleiss JL. *Statistical Methods for Rates and Proportions*. 2nd ed. John Wiley & Sons. New York 1981:112-37.
72. Johnson DE. Análisis de componentes principales. En: Jonson DE. *Métodos multivariados aplicados al análisis de datos*. 1^a. Ed. Thomson Editores. México. 2000:93-145.
73. *Stata Reference Manual*. 6th ed. Stata Corporation. College Station, Texas. 1993:320-3.

74. Checkley W, Epstein LD, Gilman RH, Figueroa D, Cama RI, Patz JA, Black RE. Effects of El Niño in ambient temperature on hospital admissions for diarrhoeal diseases in Peruvian children. *Lancet* 2000;355:442-50.
75. Yoshioka H, Iseki K-I, Fujita K. Development and differences of intestinal flora in the neonatal period in breast-fed and bottle-fed infants. *Pediatrics* 1983;72:317-21
76. Balmer SE, Wharton BA. Diet and Faecal flora in the newborn: Breast milk and infant formula. *Arch Dis Child* 1989;64:1472-7.
77. Hall MA, Cole CB, Smith SL, Fuller R, Rolles CJ. Factor influencing the presence of faecal lactobacilli in infancy. *Arch Dis Child* 1990;65:185-8.
78. Harmsen HJ, Wildeboer-Veloo ACM, Raangs GC, Wagendorp AA. Analysis of Intestinal Flora Development in Breast-Fed and Formula Fed Infants by Using Molecular Identification and Detection Methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000;30:61-7.

TABLAS

Tabla 1. Principales géneros bacterianos que conforman la flora intestinal.

Bacterias ácido-lácticas	Bacterias anareobias	Grupo aeróbico
<i>Bifidobacterium</i>	<i>Bacteroidaceae</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>Eubacterium</i>	<i>Bacillus</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>Peptococcaceae</i>	<i>Corynebacterium</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>Veillonella</i>	<i>Pseudomonas</i>
	<i>Megasphaera</i>	Levaduras
	<i>Gemminer</i>	
	<i>Clostridium</i>	
	<i>Treponema</i>	

Tomado de: Mitsuoka T. Intestinal flora and human health.
Asia Pacific J Clin Nutr, 1996;5:2-9.

Tabla 2. Incidencia de diarrea en general por grupo de edad.

Grupos de edad (meses)	Seguimiento (meses)	No. de episodios	INCIDENCIA*	IC 95%**
0 - <3	73.63	6	8.14	2.4, 14.0
3 - <6	183.04	26	14.20	10.0, 18.6
6 - <9	253.04	39	15.35	11.5, 19.0
9 - <12	218.51	53	24.25	19.8, 28.7
12 - <15	559.63	36	6.43	4.50, 8.30
15 - <18	55.95	8	14.29	6.30, 22.0
18	11.5	1	8.69	0, 23.6
TOTAL	947	169	17.8	2.64, 16.75

* episodios/100 niño-mes

** Intervalo de confianza del 95%

Tabla 3. Incidencia de diarrea por RVH por grupo de edad.

Grupo de edad (meses)	Seguimiento (meses)	No. de episodios	INCIDENCIA*	IC 95%
0 - <3	73.63	1	1.35	0, 4.0
3 - <6	183.04	4	2.18	0.1, 4.3
6 - <9	253.04	3	1.18	0, 2.5
9 - <12	218.51	4	1.83	0.08, 3.6
12 - <15	559.63	3	0.5	0, 1.1
15 - <18	55.95	1	1.78	0, 5.2
18 - <25	11.5	0	0	0
TOTAL	947	16	1.68	0,23.6

* episodios/100 niño-mes

Tabla 4. Colonización por *Lactobacillus* spp. (Log UFC/g de heces) en niños con diarrea por RVH y controles sanos

Colonización <i>Lactobacillus</i> spp	n	Razón de momios	I.C. 95%	p
0 - 6 meses				
< 4	12	1.0		
≥4	17	0.74	0.09, 6.29	0.78
7 - 18 meses				
< 4	9	1.0		
≥4	22	0.22	0.04, 1.20	0.06

Regresión logística condicionada para estimación de riesgos

Tabla 5. Asociación entre el tipo de alimentación y de la colonización por *Lactobacillus* y la incidencia de diarrea por RVH

VARIABLE	RM*	IC 95%	P
Colonización por <i>Lactobacillus</i> spp. (>4 ó <4 Log UFC/g heces)	0.34	0.09 - 1.23	0.10
Seno materno (toma / no toma)	0.19	0.04 - 1.04	0.03
Fórmula láctea (toma / no toma)	4.27	1.03 - 17.7	0.03
Alimentos sólidos (toma / no toma)	11.32	1.28 - 99.76	0.009
Edad (continua: meses)	1.24	0.49 - 3.11	0.64

* razón de momios

Análisis univariado mediante el método de regresión logística condicionada.

Tabla 6. Matriz de correlación entre las diferentes variables.

	Cuentas de <i>Lactobacillus</i> spp	Seno Materno	Fórmula Láctea	Alimentos sólidos	Edad (meses)
Cuentas de <i>Lactobacillus</i> spp	1.000	.108	-.205	.139	.104
Seno materno	.108	1.000	-.779	-.608	-.489
Fórmula láctea	-.205	-.779	1.000	.461	.240
Alimentos sólidos	.139	-.608	.461	1.000	.700
Edad (meses)	.104	-.489	.240	.700	1.000

Tabla 7. Análisis multivariado para ajustar el efecto de la colonización en la presencia de diarrea por RVH por las variables pecho, alimentación con fórmula y comida

Análisis de regresión multivariado Thu Sep 6 16:46:19 2001 Page 1

```

-----
/ / / / / / / /
Statistics/Data Analysis

User: Sarbelio
Project: Rotaflores

```

1. clogit rota clacto cpecho cformula ccomida, group(grupo)or

```

Iteration 0: log likelihood = -19.214753
Iteration 1: log likelihood = -15.463634
Iteration 2: log likelihood = -14.6824
Iteration 3: log likelihood = -14.483712
Iteration 4: log likelihood = -14.418515
Iteration 5: log likelihood = -14.395038
Iteration 6: log likelihood = -14.386464
Iteration 7: log likelihood = -14.383318
Iteration 8: log likelihood = -14.382162
Iteration 9: log likelihood = -14.381736
Iteration 10: log likelihood = -14.38158
Iteration 11: log likelihood = -14.381522
Iteration 12: log likelihood = -14.381501
Iteration 13: log likelihood = -14.381494
Iteration 14: log likelihood = -14.381491
Iteration 15: log likelihood = -14.381489
Iteration 16: log likelihood = -14.381489
Iteration 17: log likelihood = -14.381489
Iteration 18: log likelihood = -14.381489
Iteration 19: log likelihood = -14.381489
Iteration 20: log likelihood = -14.381489
Iteration 21: log likelihood = -14.381489
Iteration 22: log likelihood = -14.381489

```

```

Conditional (fixed-effects) logistic regression   Number of obs       60
                                                    LR chi2(4)           12.83
                                                    Prob > chi2          0.0122
Log likelihood = -14.381489                       Pseudo R2            0.3084

```

	Odds Ratio	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]	
rota						
clacto	.2842378	.2561428	-1.396	0.163	.0485977	1.662447
cpecho	1.17e-10					
cformula	2.93e-10	2.80e-10	-22.914	0.000	4.48e-11	1.91e-09
ccomida	1.06e+10	1.57e+10	15.631	0.000	5.88e+08	1.92e+11

Stata Corporation
 702 University Drive East
 College Station, Texas 77840
 409-696-4600, fax 409-696-4601

Tabla 8. Valoración de las variables mediante el método de extracción.

VARIABLE	INICIAL	EXTRACCIÓN
SENO MATERNO	1.000	0.866
FÓRMULA LÁCTEA	1.000	0.787
ALIMENTOS SÓLIDOS	1.000	0.896
LACTOBACILOS	1.000	0.645
EDAD EN MESES	1.000	0.572

Análisis factorial: Componentes principales

Tabla 9. Varianza total explicada por cada uno de los componentes.

Componentes	Autovalores iniciales			Sumas de las saturaciones al cuadrado de la extracción		
	Total	% varianza	% acumulado	Total	% varianza	% acumulado
1	2.363	47.270	47.270	2.363	47.270	47.270
2	1.402	28.049	73.319	1.402	28.049	75.319
3	0.872	17.437	92.756			
4	0.207	4.148	99.903			
5	0.155	3.097	100.000			

Tabla 10. Matriz de componentes principales.

	COMPONENTE 1	COMPONENTE 2
SENO MATERNO	-0.895	0.256
FORMULA LÁCTEA	0.751	-0.473
ALIMENTOS SÓLIDOS	0.781	0.535
LACTOBACILOS	-0.134	0.792
EDAD EN MESES	0.610	0.447

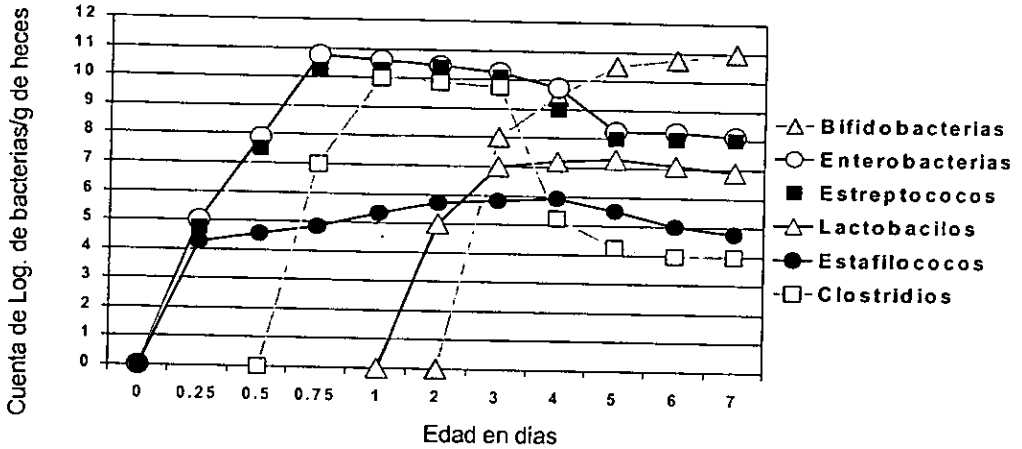
Tabla 11. Análisis Multivariado utilizando las 2 nuevas variable extraídas por le método de componentes principales

COMPONENTES PRINCIPALES	RM	IC 95%	p
PRIMER COMPONENTE:			
Relación entre:			
< ingesta de leche materna	2.82	0.88 – 8.97	0.079
> ingesta de fórmula			
> ingesta de alimentos sólidos			
SEGUNDO COMPONENTE:			
Grado de colonización intestinal	0.74	0.32 – 1.73	0.50

Método de Regresión logística condicionada
 Log-loglikelihood = -17.43 LR χ^2 (2) = 6.71 p=0.03

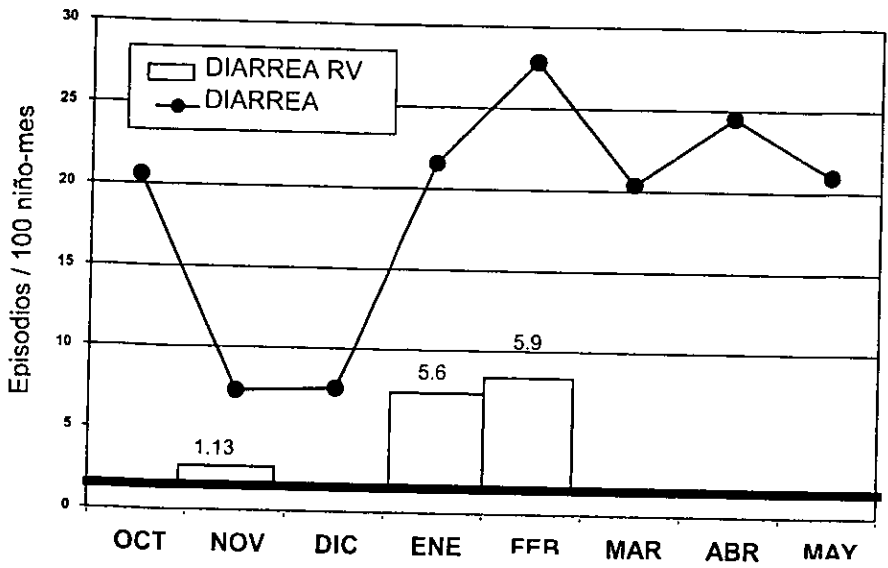
GRÁFICAS

Gráfica 1. Desarrollo de la flora normal en los neonatos.

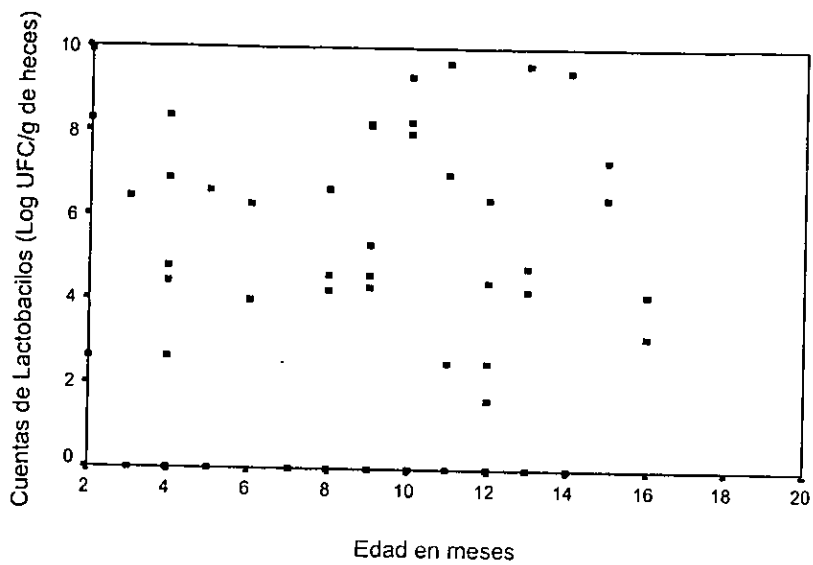


Tomado de: Mitsuoka T. Intestinal flora and human health. Asia Pacific J Clin Nutr, 1996;5:2-9.

Gráfica 2. Incidencia de diarrea y diarrea por RVH por mes del año.



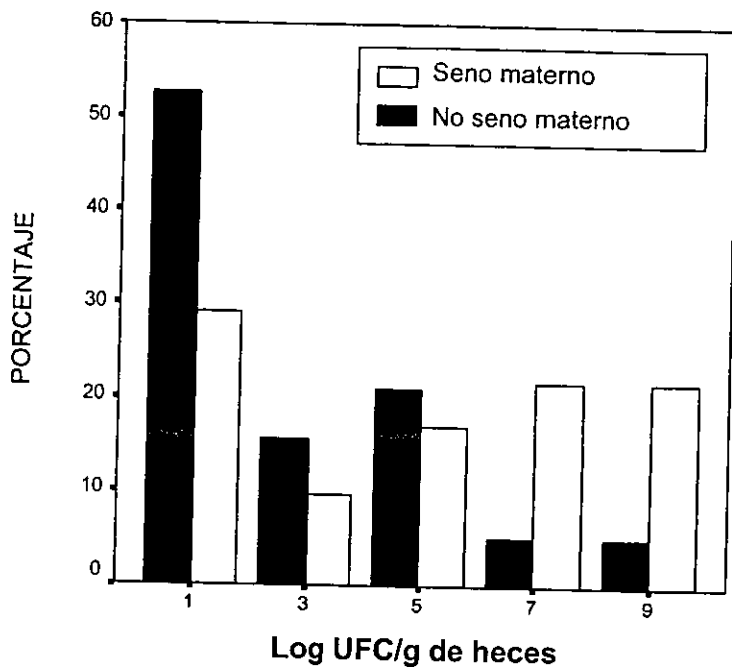
Gráfica 3. Distribución de la colonización intestinal por grupo de edad.



Coefficiente de correlación de Pearson = 11%

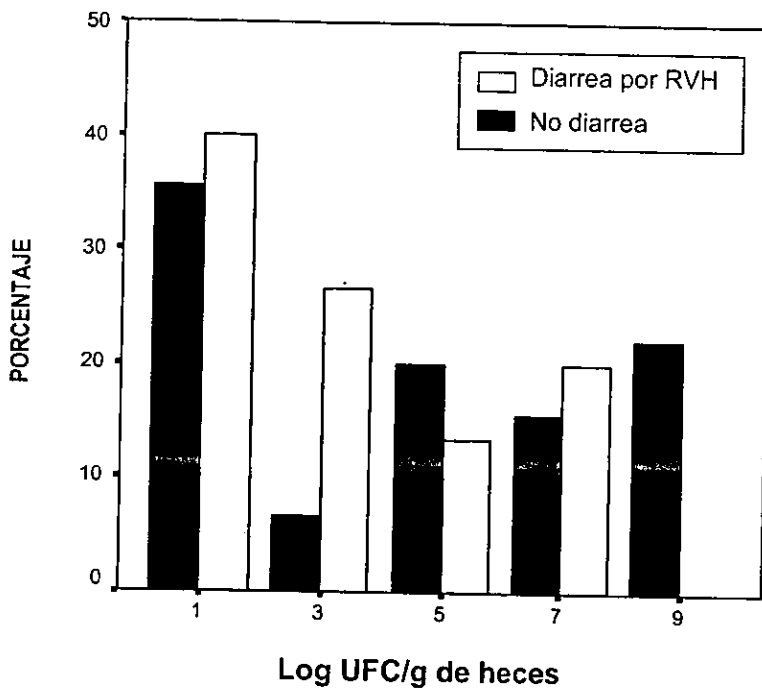
$p = 0.40$

Gráfica 4. Cuentas de *Lactobacillus* spp. en niños alimentados al seno materno (n = 19) y niños que no reciben lactancia materna (n = 41).



Log likelihood ratio $\chi^2(1) = 4.73$
 $p = 0.02$

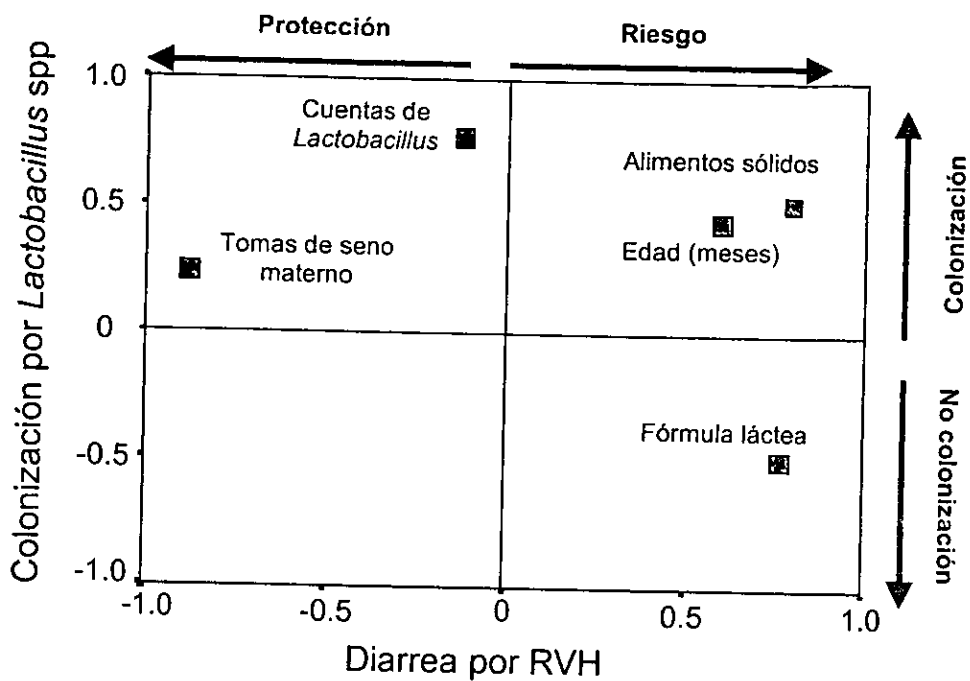
Gráfica 5. Cuentas de *Lactobacillus* spp. en niños con diarrea por RVH (n = 15) y niños sin diarrea (controles, n = 45)



■ Media geométrica: 5.79, IC 95% 4.92-6.82
□ Media geométrica: 4.14, IC 95% 2.98-5.76

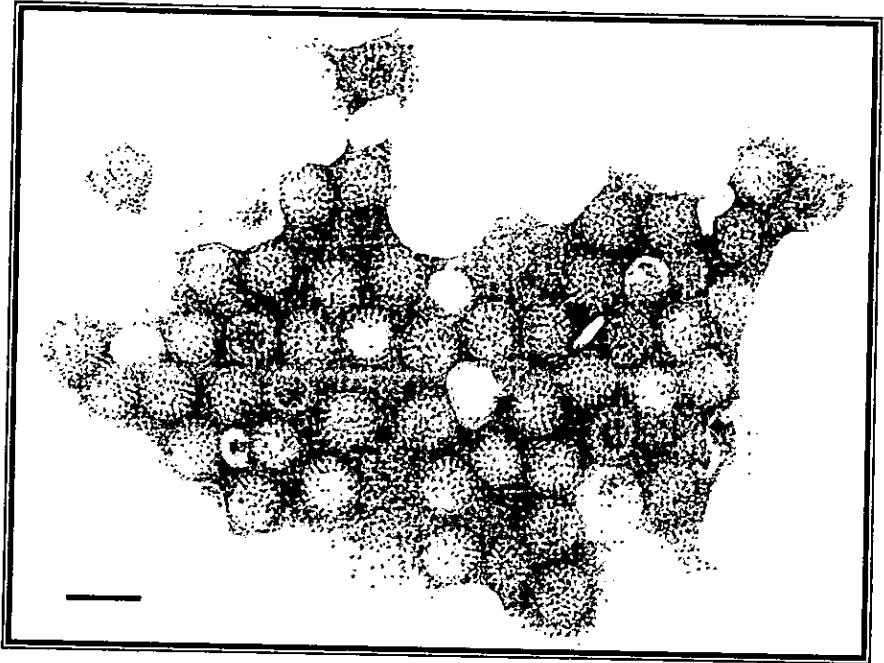
p=0.10

Gráfica 6. Gráfica de componentes en espacio rotado.



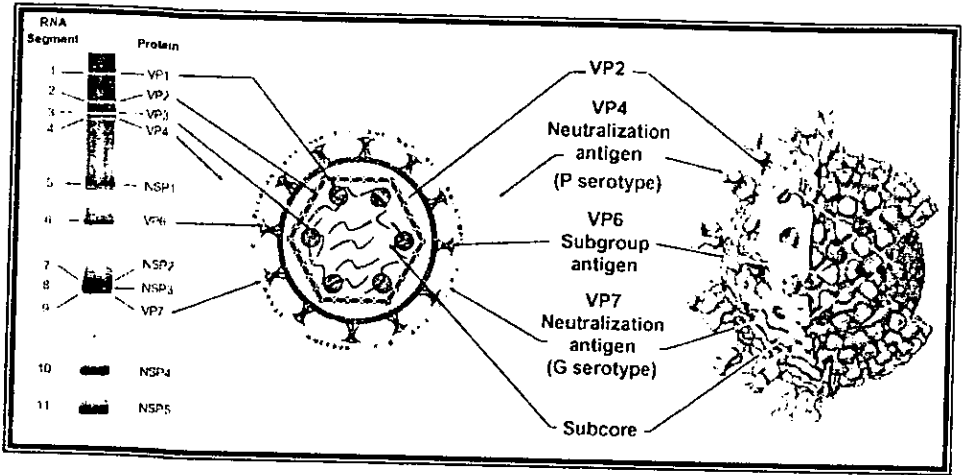
FIGURAS

Figura 1. Partículas de RVH demostradas por inmuno-microscopía electrónica en un filtrado de heces obtenido de un lactante con gastroenteritis aguda.



Tomada de: Midhun K, Kapikian AZ. Rotavirus Vaccines: an Overview. Clin Microb Rev 1996;9:423-34.

Figura 2. Asignaciones de codificación genética y estructura tridimensional de partículas de RVH. Segmentos de cadena de RNA separadas en gel de poliacrilamida. (izquierda) codificada por proteínas individuales, localizados en partículas virales esquemáticas (centro) ó en las diferentes capas proteicas del virus (derecha).



Tomado de: Estes MK. Advances in Molecular Biology. Impact on Rotavirus Vaccine Development. J Infect Dis 1996;174 (Supl 1) S39.

Figura 3. Morfología colonial de *Lactobacillus* spp.

