

Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, UNAN-León
Facultad de Ciencias Médicas
Departamento de Microbiología y Parasitología
Centro de Enfermedades Infecciosas
Maestría en Ciencias con Mención en Microbiología Médica



Tesis para optar a título de Máster en Ciencias con Mención en
Microbiología Médica

**Asociación entre infecciones sintomáticas por *Escherichia coli*
enteroagregativa durante el primer año de vida y su impacto en el
peso y la talla de infantes leoneses.**

Autor: Lic. Lester Iván Gutiérrez Pérez

Asistente de Investigación

Centro de Enfermedades Infecciosas (CEI)

Tutor: Samuel Vílchez, PhD

Profesor Titular

Departamento de Microbiología y Parasitología

Diciembre 2019

“A la libertad por la Universidad”



Resumen

Introducción: *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) es un agente importante de diarrea aguda y persistente tanto en niños como en adultos a nivel mundial, un estudio multicéntrico reportó que 90% de los niños llegan a infectarse por EAEC en los primeros dos años de vida. EAEC es conocida por su capacidad de provocar infecciones persistentes y se ha relacionado con inflamación crónica, daño del epitelio intestinal, reducción de la absorción intestinal y disminuciones en talla para-edad (TPE) y peso para-edad (PPE) en infantes.

Objetivo: Determinar la relación entre infecciones sintomáticas causadas por EAEC durante el primer año de vida y el efecto en el peso y talla de los infantes de la ciudad de León.

Metodología: Estudio longitudinal de nacimiento hasta los 12 meses de vida de 144 niños leoneses, de ellos se recolectó medidas antropométricas (peso y talla) a los 3, 6, 9 y 12 post-infección (PI) donde se detectó EAEC. Se calcularon los índices Z de TPE y PPE y fueron contrastados con los valores de referencia de la Organización Mundial de la Salud.

Resultados: De los 144 niños en seguimiento 75 tuvieron al menos un episodio por EAEC, encontrándose una incidencia acumulada de la primera detección de 0,52. 73/75 fueron seleccionados para estudiar el efecto PI en el peso y la talla. Se observó un déficit de crecimiento lineal a corto (TPE: -0,047) y mediano plazo (TPE: -0,231 y -0,450 a los 6 y 9 meses respectivamente) en los niños que tuvieron diarrea con detección de EAEC, una tendencia decreciente fue observada hasta 9 meses PI, siendo estadísticamente significativa entre los 6 y 9 meses PI ($p=0,037$), el déficit de crecimiento lineal ocurrió principalmente en el sexo masculino tanto a corto (TPE_{Masculino}: -0,19; TPE_{Femenino}: 0,38; $p=0,066$) como a mediano plazo (TPE_{Masculino}: -0,33; TPE_{Femenino}: 0,31; $p=0,029$). Por otro parte no se observó un efecto negativo en el PPE, sin embargo se obtuvo una tendencia decreciente (PPE: 0,448; 0,442; 0,337; 0,214 a los 3, 6, 9, y 12 meses PI respectivamente, valores $p \leq 0,044$). Los niños que tuvieron diarrea con detección de EAEC tuvieron mayor déficit de crecimiento lineal comparados con niños con diarrea sin detección de EAEC tanto a corto (TPE_{EAEC}: -0,19; TPE_{NO EAEC}: 0,38; $p=0,066$) como a mediano plazo (TPE_{EAEC}: -0,33; TPE_{NO EAEC}: 0,31; $p=0,029$).

Conclusión. Las infecciones sintomáticas asociadas a EAEC están relacionadas a déficit de crecimiento lineal en la talla de niños leoneses menores de 1 año de vida principalmente en el sexo masculino. No se observó un efecto negativo para el PPE.

Palabras claves: EAEC, Déficit de crecimiento lineal, talla, peso.



A mi familia.



Agradecimientos

En el camino que nos lleva a alcanzar nuestras metas, se necesita de mucho esfuerzo, sabiduría y de una mano amiga que nos ayude a seguir adelante.

Por ello agradezco a:

Mi tutor **Dr. Samuel Vílchez** por su tiempo y conocimiento brindado a lo largo del estudio.

Dr. Filemón Bucardo, Dra Sylvia Becker-Dreps investigadores principales de la cohorte SAGE que sirvió como fuente principal de la obtención de los datos.

Equipo SAGE, quienes llevaron a cabo paso a paso la recolección de información y muestras biológicas.

Christian Toval-Ruiz por su apoyo y tiempo en la obtención de los datos epidemiológicos

A todo el personal del Laboratorio de Microbiología y Parasitología que de manera directa e indirecta brindaron su ayuda.



Glosario

AA	Adherencia Agregativa
AAF	Fimbrias de Adherencia agregativa
DAEC	<i>Escherichia coli</i> adherente-difusa
DEC	<i>Escherichia coli</i> diarreogénica
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enterogregativa
EDA	Enfermedad diarreica aguda
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica
GEMS	Global Enteric Multicenter Study
ITU	Infección tracto urinario
MINSA	Ministerio de Salud
OMS	Organización Mundial de la Salud
<i>pAA</i>	Plásmido de Adherencia Agregativa
PAI	Isla de Patogenicidad
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
P.I	Post Infección
PPE	Peso para la Edad
PST	Peso según la talla
SPATE	Enterobacterias autotransportadoras de serina proteasa



Contenido

1. Introducción	1
2. Antecedentes	2
3. Justificación	4
4. Planteamiento del problema	5
5. Objetivos	6
6. Marco Teórico	7
6.1 Generalidades	7
6.2 <i>E coli</i> Enteroagregativa	8
6.2.1 Epidemiología	8
6.2.2 Manifestaciones clínicas	9
6.2.3 Mecanismo de patogenicidad	10
6.2.4 Detección de EAEC	14
6.2.5 Respuesta inmune del hospedero	16
6.2.6 Susceptibilidad genética del huésped	17
6.2.7 Asociación de EAEC y déficit nutricional	17
7. Diseño Metodológico	19
8. Resultados	26
8.1 Características clínicas y epidemiológicas	26
8.2 Carga de diarrea donde se detectó EAEC	27
8.3 Infecciones sintomáticas con detección de EAEC y su efecto en el peso y la talla	29
8.3.1 Disminuciones en TPE se asocian al sexo, no así PPE y TSP.	32
8.3.2 Efecto en peso y talla en niños con diarrea con y sin presencia de EAEC.	34
9. Discusión	37
10. Conclusión	39
11. Recomendaciones	40
12. Referencias bibliográficas	41
13. Anexos	49



1. Introducción

La diarrea es la segunda causa de morbilidad y la tercera de mortalidad en niños menores de 5 años a nivel mundial. Recientes estimaciones mundiales atribuyen más de un millón de muertes por año a la diarrea en todos los grupos de edad. A pesar que ha existido una reducción de la mortalidad, la morbilidad a causa de la diarrea sigue siendo una carga importante en los países de ingresos bajos y medios en África y Asia, donde la calidad del agua y el saneamiento es inadecuada^(1, 2). En Nicaragua, El Ministerio de Salud (MINSA) reportó un total de 15,725 egresos hospitalarios debido a diarreas y gastroenteritis infecciosa en 2016, y para el 2017 se reportó un total de 12,556, siendo en ambos años la segunda causa de egresos hospitalarios a nivel nacional.⁽³⁾

Escherichia coli enteroagregativa (EAEC) es un agente importante de diarrea aguda y persistente tanto en niños como en adultos en todo el mundo⁽⁴⁾ y representa entre el 8 y el 32 por ciento de los casos de diarrea aguda infantil en diferentes regiones del mundo⁽⁵⁻⁸⁾, llegando inclusive a asociarse al menos a un episodio hasta un 90% de infecciones en los primeros dos años de vida. Adicionalmente, otro rol importante de este agente etiológico es su asociación con diarreas persistente superior a los 14 días en niños de países en vías de desarrollo⁽⁹⁾. Esta persistencia de EAEC está relacionada a inflamación crónica, daño del epitelio intestinal y reducción de la absorción intestinal⁽¹⁰⁾, y por ende se ha visto asociaciones con disminuciones sustanciales en los valores z de la longitud-edad y peso-edad en niños con infecciones persistentes o infecciones recurrentes⁽¹¹⁾.

En Nicaragua, EAEC es uno de los principales agentes asociado a diarrea infantil⁽¹²⁾ y se conoce que las infecciones pueden incluso llevar a un déficit en el crecimiento lineal⁽¹¹⁾. Por tanto, un estudio longitudinal en una zona endémica como León, Nicaragua brindaría información que facilite el entendimiento del impacto de las infecciones sintomáticas asociadas a este grupo heterogéneo de bacterias en el desarrollo de los infantes leoneses a corto y mediano plazo.



2. Antecedentes

Desde su primera descripción por Nataro *et al*, en 1987⁽¹³⁾, EAEC ha sido reconocida cada vez más como un agente etiológico de la diarrea. Hoy en día, EAEC está ganando reconocimiento rápidamente tanto en los países desarrollados como en los países industrializados, incluidos los Estados Unidos^(14, 15). En algunas regiones del mundo, se ha demostrado que EAEC es la causa más común de diarrea pediátrica. En un estudio prospectivo en Suiza en 2003 realizado por Pabst WL *et al*, EAEC fue el patógeno bacteriano más comúnmente identificado en las muestras de heces de niños menores de 16 años. Este patógeno se encontró en el 12% de los niños con diarrea y se asoció principalmente con una historia de viajes recientes fuera de Suiza⁽¹⁶⁾.

En otras áreas del mundo, especialmente en las regiones en desarrollo, EAEC es la segunda causa más común de diarrea aguda de los viajeros, superada sólo por *E. coli* enterotoxigénica (ETEC). EAEC es un agente importante de diarrea aguda y persistente en muchas poblaciones ⁽⁴⁾. Se conoce que los brotes por EAEC son esporádicos, pero se han descrito varios brotes que afectan tanto a niños como a adultos donde rara vez la fuente de infección se ha logrado identificar. Dentro de estos brotes producidos por EAEC, el brote más grande de diarrea se describió en Japón (1997) por Itoh *et al*, dicho brote fue relacionado al consumo de alimentos contaminados, donde un total de 2697 de 6636 escolares (tasa de ataque del 40.6%) de 16 escuelas diferentes se vieron afectados⁽¹⁷⁾.

Diferentes estudios se han llevado a cabo tanto en pacientes con diarrea aguda como persistente. En 1995 en la Fortaleza, Brasil Fang *et al*, identificó 24 (46%) de 52 casos de diarrea persistente asociado a EAEC⁽¹⁸⁾. En 1996 Cobeljic *et al*, estudiaron en niños con diarrea aguda en Belgrado, Yugoslavia en donde 12 (75%) de 16 personas tenían diarrea aguda con presencia de EAEC⁽⁵⁾. En la India Pai *et al*, en 1997 describió un brote en toda una comunidad, dicho brote se asoció epidemiológicamente con el consumo de agua de pozos abiertos donde se identificó EAEC en las heces de 11 de 20 sujetos con diarrea y en 1 de las 11 muestras de control ($P = 0,02$)⁽¹⁹⁾. En Francia (1998), Marabito *et al*, describió un brote de síndrome urémico hemolítico debido al serogrupo O111 de EAEC atípico, donde las cepas



E. coli O111 productoras de toxina Shiga mostraba una adhesión agregativa a las células HEp-2 y albergaron plásmidos grandes que se hibridaron con la sonda de EAEC PCVD43, y dichas cepas presentaban una nueva combinación de factores de virulencia y podían ser tan patógenas para los humanos como la clásica *E. coli* enterohemorrágica⁽²⁰⁾.

En otras regiones industrializadas del mundo como Suiza, Svenungsson *et al*, identificaron la EAEC como una causa de diarrea aguda en el 2% de 760 pacientes suizos en año 2000, en comparación con el 1% de 203 personas asintomáticas⁽²¹⁾. Schultsz *et al*, en el año 2000 estudiaron a 169 pacientes europeos e identificaron la EAEC como una causa de diarrea aguda en el 10% de los pacientes con diarrea, en comparación con el 7% de las 108 personas asintomáticas⁽²²⁾

Okeke *et al*, en 2003 estudiaron pacientes nigerianos donde identificaron diarrea debida a infección por EAEC en 16% de 113 pacientes nigerianos, en comparación con 3% de 63 personas asintomáticas⁽²³⁾. En León, Nicaragua Vilchez *et al*, en 2009 identificaron a EAEC en niños sin diarrea (33.1%) y en niños con diarrea (27.8%) y a su vez estuvieron asociadas al 20.8% de los casos de diarrea severa que requirieron hospitalización⁽¹²⁾.

Un aspecto importante en la epidemiología de EAEC radica en que diferentes estudios han llegado a asociarla con malnutrición y déficit de crecimiento lineal^(24, 25). En 2014 Jiménez *et al*, detectó una disminución en los valores Z de peso para la edad (PPE) en niños panameños menores de 5 años que habían sido infectados con EAEC⁽²⁶⁾. En 2017, Un estudio de cohorte MAL-ED publicado por Rogawski *et al*, reportó que más del 90% de los niños de su estudio tuvieron EAEC una vez en dos años de vida y se asoció con disminuciones sustanciales en los valores Z de talla para la edad (TPE) pero no con los pesos para la edad (PPE). Sin embargo, identificaron que el mayor impacto en el desarrollo de los niños ocurrió en los niños con la mayor frecuencia de detección de EAEC durante los primeros 2 años de vida, lo que sugiere que las altas tasas de exposición repetidas o prolongada durante muchos meses es necesaria para observar el decrecimiento en la longitud total a los dos años de edad⁽¹¹⁾.



3. Justificación

EAEC es una causa importante de enfermedad diarreica aguda tanto adultos como en niños y se ha estimado que entre el 2 y el 68% de los pacientes con diarrea están infectados con este agente^(27, 28). Además, EAEC se ha convertido en un patógeno asociado a brotes de diarrea aguda tanto en países desarrollados^(29, 30) como en países en desarrollo⁽⁹⁾ y es uno de los principales agentes etiológicos de la diarrea del viajero⁽³¹⁾.

Paralelamente, EAEC es mejor conocida por causar diarrea persistente (≥ 14 días) en niños que viven en países en desarrollo⁽⁹⁾, convirtiéndola en una importante patógeno asociada a diarrea de mortalidad⁽²⁹⁾. Sin embargo, EAEC también resalta por el elevado número de infecciones asintomáticas que esta causa. Por ejemplo en un estudio realizado por Vilchez *et al*, en 2009 en León, Nicaragua identificaron a EAEC en un 33.1 % de niños sin diarrea y en 27.8% en niños con diarrea⁽¹²⁾. Así, la persistencia de EAEC en el intestino humano es una preocupación de salud pública en niños de países de bajos ingresos como el nuestro, puesto que también ha sido relacionada con desnutrición infantil caracterizada por una inflamación subclínica crónica, daño en el epitelio intestinal y reducción de la capacidad para absorber nutrientes⁽¹⁰⁾.

Un estudio de cohorte multicéntrico en 2017 estimó que el 90% de los niños en estudio tuvieron una infección por EAEC al menos una vez en los primeros dos años de vida, ya sea asociada a síntomas o no de enfermedad. Estas infecciones persistentes y recurrentes por EAEC son alarmantes puesto que se asocian con retardo en el crecimiento⁽¹¹⁾. Por tanto, un estudio de las infecciones por EAEC y las posibles afectaciones en el desarrollo de los niños durante el primer año de vida, ayuda a tener un mayor conocimiento sobre las infecciones por EAEC y el impacto en el desarrollo de los niños a corto y mediano plazo. Este estudio es el primero en relacionar infecciones por EAEC y su impacto en peso y talla de infantes leoneses y podrá ser una base fundamental para el desarrollo de posteriores estudios de intervención.



4. Planteamiento del problema

¿Existe relación entre infecciones sintomáticas causadas por EAEC durante el primer año de vida y pérdida de peso y déficit crecimiento lineal de infantes leoneses?



5. Objetivos

General

- Determinar la relación entre infecciones sintomáticas asociada a EAEC durante el primer año de vida y pérdida de peso y déficit crecimiento lineal de infantes leoneses.

Específicos

- Describir características clínicas y epidemiológicas de la población en estudio.
- Determinar la carga de diarrea por EAEC en niños menores de 12 meses.
- Describir el comportamiento del peso y la talla a corto y mediano plazo de infantes leoneses con infecciones sintomáticas por EAEC.



6. Marco Teórico

6.1 Generalidades

El género *Escherichia* está formado por bacilos gramnegativos anaeróbicos facultativos que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* lleva su nombre en honor al pediatra alemán Theodor Escherich, este género bacteriano⁽³²⁾. La especie de mayor importancia es *Escherichia coli* la cual está ampliamente distribuida ya que es el principal anaerobio facultativo que habita el intestino grueso de los humanos y los animales de sangre caliente⁽³³⁾.

Aunque la mayoría de las cepas de *E. coli* viven inofensivamente en el colon y rara vez causan enfermedades en individuos sanos, existen clones de *E. coli* altamente adaptados que han adquirido atributos de virulencia específicos, lo que le confiere una mayor capacidad de adaptación a nuevos nichos y les permite causar un amplio espectro de enfermedades⁽³⁴⁾. Estos atributos de virulencia se codifican con frecuencia en elementos genéticos móviles que pueden movilizarse en diferentes cepas con el objetivo de crear nuevas combinaciones de factores de virulencia y que con el tiempo pueden convertirse en parte del genoma principal. Solo las combinaciones más exitosas de factores de virulencia han persistido para convertirse en "patotipos" específicos de *E. coli* que son capaces de causar enfermedades en individuos sanos como diarrea aguda (EDA), infecciones del tracto urinario (ITU) y sepsis o meningitis⁽³⁴⁾.

Las enfermedades diarreicas son un grave problema de salud pública y una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en lactantes y niños pequeños y los patotipos de *E coli* diarreogénicas (DEC) son una de las más importantes causas de diarrea bacteriana y se han relacionado con mayor frecuencia a EDA en niños bajo cinco años de edad⁽²⁷⁾

Los patotipos de DEC difieren en cuanto a sus sitios de colonización de hospedadores preferenciales, los mecanismos de virulencia y los síntomas y consecuencias clínicos subsiguientes, y se clasifican como *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (productora de toxina Shiga) (EHEC / STEC), EAEC, ETEC y *E. coli* enteroinvasiva (EIEC)⁽²⁷⁾.



6.2 *E coli* Enteroagregativa

EAEC es causa importante de diarrea aguda y/o persistente, tanto en niños como en adultos en países en vías de desarrollo como países desarrollados⁽²⁹⁾. Se identifica con frecuencia en cuadros diarreicos en personas inmunocompetentes ya que es una causa importante de la enfermedad diarreica del viajero y de diarrea crónicas en niños. Además, es causante de diarrea en pacientes infectados por Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)^(29, 35). Este patotipo se adhiere a la mucosa intestinal, la coloniza y produce un efecto citotóxico que causa diarrea de tipo acuosa sin fiebre y con secreción de moco asociado con inflamación intestinal crónica^(36, 37).

6.2.1 Epidemiología

Diferentes estudios epidemiológicos sobre diarrea se han detallado en distintas parte del mundo, muchos de ellos asocian a EAEC como agentes etiológicos de la gastroenteritis infantil tanto en los países desarrollados como en los países en desarrollo y que a su vez, es una causa principal de diarrea persistente (≥ 14 días) vinculada a ingesta de alimentos y a consumo de agua como principales fuentes infección^(38, 39).

Las diarreas por EAEC ha sido confirmada tanto a niños y adultos⁽⁴⁰⁾. En infantes, es una causa importante de diarrea aguda y persistente y en adulto es causante de la diarrea del viajero^(13, 41). Aunque EAEC es un agente importante causante de distintos brotes a nivel mundial⁽¹⁷⁾, las características epidemiológicas exactas de la transmisión de EAEC no se conocen con claridad, probablemente representa una enfermedad infecciosa transmitida por los alimentos⁽³⁸⁾, así lo demuestra estudio en voluntario que demostró que la ingestión oral de 10^{10} unidades formadoras de colonias (UFC) de EAEC provoca diarrea⁽⁴²⁾, sin embargo la dosis infecciosa exacta es actualmente desconocida. Una dosis alta apoyaría el papel de la transmisión facilitada por consumo de alimentos, donde se pueden alcanzar los tamaños de inóculo pero dependería de ciertos factores de riesgo para el desarrollo de la infección por



EAEC que incluyen la refrigeración inadecuada de los alimentos, la contaminación de los alimentos y una higiene deficiente⁽³⁸⁾.

Aunque EAEC produce diarrea acuosa tanto a niños como adultos, la afectación en niños es más notable que en adultos que habitan en la misma área geográfica, esto es debido a que su sistema inmunológico de los niños no está bien desarrollado y los adultos han sido expuestos a múltiples infecciones⁽²⁹⁾.

La prevalencia de EAEC en menores de 2 años varía según las distintas zonas geográficas, por ejemplo en los países en vías de desarrollo como Belgrade, Yugoslavia se identificó EAEC en 12 de 16 (75%) niños con diarrea acuosa⁽⁵⁾ y en la Fortaleza, Brasil se identificó en 24 de 52 (46%)⁽¹⁸⁾, mientras en países desarrollados como en New Orleans, Louisiana, USA se encontró en 5 de 21 (24%) casos de diarrea acuosa⁽⁴³⁾. Existen diversos estudio que expresan prevalencia de EAEC en adultos con diarrea acuosa donde identifican 2% de 760⁽²¹⁾, 10% de 169⁽²²⁾ y 16% de 113 pacientes⁽²³⁾ en Suecia, pacientes europeos y pacientes nigerianos respectivamente.

Un estudio publicado en 2006 identificó a EAEC como la causa bacteriana más común de diarrea en los servicios de urgencias y clínicas ambulatorias de dos grandes hospitales académicos en Maryland y Connecticut⁽⁴⁴⁾. EAEC ha causado muchos brotes importantes incluidos un brote de un almuerzo escolar de 1997 en Japón que enfermó a 2,697 niños. En 1997, se produjo una epidemia de diarrea por EAEC en una aldea de la India y enfermó a aproximadamente el 15% de la población⁽¹⁹⁾.

Un dato importante en el estudio sobre la epidemiología es que muchas de las infecciones producidas por EAEC son asintomáticas y generalmente se producen en los primeros años de vida y se asociaron con déficits de crecimiento lineal⁽¹¹⁾. En León, Nicaragua EAEC se fue identificada mayormente en niños sin diarrea (33.1%) que en niños con diarrea (27.8%) y a su vez fue uno el patotipo más prevalentes en casos de diarrea persistente⁽¹²⁾

6.2.2 Manifestaciones clínicas



Las EAEC se asocian comúnmente con enfermedades diarreicas agudas y crónicas en niños (tanto en países en desarrollo como desarrollados o industrializados) y en viajeros con diarrea. El período de incubación de la EAEC diarreogénica es típicamente entre 8 y 18 horas⁽⁴⁵⁾. La infección con EAEC generalmente se presenta clínicamente como diarrea acuosa, a menudo con moco, náuseas y vómitos, con o sin fiebre⁽⁴⁶⁾. Otros síntomas menos comunes incluyen anorexia, borborigmo y tenesmo. Además, existe evidencia que sugiere que las probabilidades de desarrollar el Síndrome del Intestino Irritable postinfeccioso (SII) aumentan dramáticamente después de que se haya discutido la gastroenteritis infecciosa aguda con EAEC⁽⁴⁷⁾. Una característica predominante de la infección por EAEC en países de bajos ingresos es la propensión a causar diarrea persistente durante más de 2 semanas, lo que hace que estas bacterias sean una causa importante de mortalidad⁽²⁹⁾.

La preocupación de salud pública más importante derivada de las infecciones por EAEC en niños de países de bajos ingresos es la desnutrición, ya que las infecciones persistentes causan una inflamación crónica, que daña el epitelio intestinal y reduce su capacidad para absorber nutrientes⁽¹⁰⁾.

6.2.3 Mecanismo de patogenicidad

La patogenia de la EAEC es compleja ya que las cepas son heterogéneas. Los estudios de casos-control han documentado la prevalencia de genes de virulencia putativos; pero, en su mayor parte, no han podido correlacionar la presencia de genes específicos con la enfermedad. El modelo actual de patogénesis de la EAEC comprende tres pasos⁽¹⁰⁾ (Fig. 1):

1. Adherencia a la mucosa intestinal a través de fimbrias de adherencia agregativa.
2. Incremento de la producción de moco que conduce a una extensa formación de biopelículas en la superficie de los enterocitos, y
3. Secreción de toxinas e inducción de la respuesta inflamatoria.

Los factores de virulencia de EAEC descritos se codifican en largos plásmidos de virulencia designados como "adherencia agregativa (*pAA*)" o en islas de patogenicidad en el cromosoma

(Tabla 1). El regulador clave de la virulencia en los patotipos de EAEC es AggR, un miembro de la familia de reguladores transcripcionales bacterianos AraC / XylS, y el factor que define las cepas típicas de la EAEC. *aggR* se encuentra en el plásmido pAA y controla una serie de genes que codifican factores de virulencia putativos ubicados en el pAA y factores adicionales ubicados en el cromosoma⁽¹⁰⁾.

La expresión de las fimbrias de adherencia agregativa (AAF), la dispersina, el translocador de dispersina Aat y el sistema de secreción Aai tipo VI, está regulada por AggR⁽⁴⁸⁾. La fijación inicial de EAEC a la mucosa intestinal está mediada por AAF. Los AAF se consideran el principio de adhesina de EAEC y se encuentran exclusivamente en este patotipo⁽⁴⁹⁾. Los AAF se describieron por primera vez con respecto a su papel en la formación del patrón agregativo característico de ladrillos apilados en células HEp-2⁽¹³⁾. Tras la adhesión a la superficie epitelial, los AAF también se han asociado con la inflamación epitelial *in vitro*, como la secreción de interleucina, la interrupción de las uniones epiteliales y la migración desencadenante de leucocitos polimorfonucleares^(50, 51).

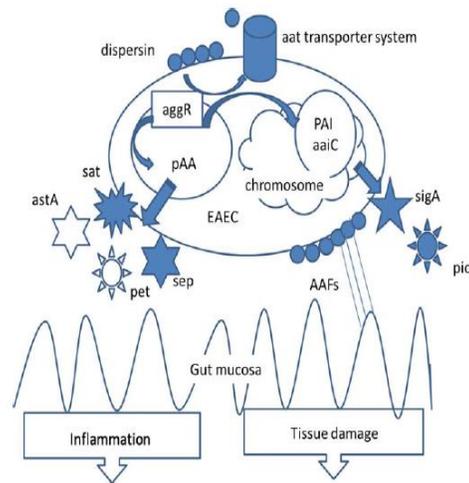


Fig. 1: Módulo actual de patogénesis de EAEC (adaptada de una figura de Erick Juncker Boll, Departamento de Infección y Control Microbiológico, Statens Serum Institute, Copenhague, Dinamarca)

Actualmente, se han identificado cinco variantes diferentes de AAF (AAF I – V), todas con un alto nivel de conservación de sus genes accesorios, a pesar del bajo nivel de identidad de aminoácidos entre las subunidades de la pilina⁽⁴⁹⁾

Los AAF son miembros del grupo fimbrial chaperona-usher, común a muchas bacterias Gram-negativas. El operón consta de cuatro proteínas: el usher, la chaperona, la subunidad de micropilina y la subunidad de pilina principal. Los AAF tienen un alto punto isoeléctrico (pI 8.9–9.4) en relación con otras adhesinas de la familia de chaperona-usher. En el intestino, donde el pH varía de 6 a 7,4, los AAF tienen una carga positiva alta, que puede desempeñar



un papel en la unión⁽⁵²⁾. El gen que codifica la dispersina (aap) se encuentra en el pAA que se encuentra inmediatamente corriente arriba del activador transcripcional AggR y está bajo el control de AggR⁽⁵³⁾

La dispersina es una proteína pequeña cargada positivamente que se une no covalentemente al lipopolisacárido de la membrana externa de la EAEC. Participa en la formación de una capa superficial que actúa para dispersar las bacterias, contrarrestando parcialmente la agregación mediada por fimbrias de adherencia agregativa que permiten que los AAF se extiendan desde la superficie de la bacteria⁽⁵²⁾. Además de los genes de virulencia en el pAA, se han identificado varias islas de patogenicidad (PAI) en el cromosoma de la EAEC. Una de estas islas consta de 25 genes contiguos (aaiA-Y), activados por AggR y ubicados en un PAI de 117 kb insertado a pheU en EAEC⁽⁵⁴⁾. Muchos de estos genes tienen homólogos en otras bacterias gramnegativas y se propuso recientemente que constituyen un sistema de secreción de tipo VI (T6SS). Los estudios de distribución indicaron que aaiA y aaiC se encuentran comúnmente en aislamientos de EAEC en todo el mundo, particularmente en instancias definidas como EAEC típicas. Estos datos apoyan la hipótesis de que AggR es un regulador global de los determinantes de virulencia de la EAEC tanto en el cromosoma como en el plásmido, y se basa en la hipótesis de que T6SS es un mediador importante de la patogenicidad⁽⁵⁴⁾.

Otro PAI se designa como SHE (también se encuentra en *Shigella flexneri*) y codifica el autotransportador de la proteasa de serina y las enterotoxinas ShET1⁽⁵²⁾. Los autotransportadores de serina proteasa de enterobacterias (SPATE) son una familia de proteasas extracelulares que se cree que desempeñan un papel en la patogénesis de la EAEC. Los SPATE se nombran por su motivo de serina proteasa que confiere capacidad proteolítica y se secretan a través de un sistema de secreción tipo V. Las SPATE están implicadas en la evasión inmune, el daño de la mucosa y la colonización. Las SPATE más comúnmente encontradas en EAEC incluyen: toxina codificada por plásmidos (Pet), proteína involucrada en la colonización intestinal (Pic), toxina autotransportadora secretada (Sat), homología de la proteasa similar a IgA de *Shigella* (SigA) y proteína secretada por *E. coli* (EspP)⁽⁵⁵⁾. Todas las SPATE encontradas en EAEC están ubicadas en el cromosoma, excepto Pet que se



encuentra en el pAA. Las cepas de EAEC a menudo producen una toxina estable al calor agregada (EAST1) codificada por los genes *astA* codificados por el plásmido y la hemolisina E (HlyE), pero como la ShET1, estas toxinas no son específicas de la EAEC⁽⁴⁵⁾.

Tabla 1: Genes y toxinas frecuentemente encontradas en patotipos EAEC

Factor EAEC	Descripción	Localización
<i>aggR</i>	Regulador maestro para los genes de virulencia de plásmidos de EAEC, incluidos los factores de adherencia agregados, fimbrias AAF/ I-AAF/ V y un gran conjunto de genes cromosómicos insertados en una isla de patogenicidad en el locus PheU	pAA
<i>aatA-P</i>	Codifica proteínas responsables del transporte de la dispersión, proteína fuera de la membrana externa de la EAEC.	pAA
<i>aap</i>	Codifica una proteína secretada de 10 kDa llamada dispersina y es responsable de "dispersar" la EAEC a través de la mucosa intestinal	pAA
<i>aggA</i>	Codifica AAF / I media la adherencia a la mucosa colónica y la hemaglutinación de los eritrocitos.	pAA
<i>aafA</i>	Codifica AAF / II, media la adherencia a la mucosa colónica y hemaglutinación de eritrocitos.	pAA
<i>agg3A</i>	Codifica la hemaglutinación AAF / III de los eritrocitos.	pAA
<i>agg4A</i>	Codifica AAF / IV media adherencia a la mucosa colónica y hemaglutinación de eritrocitos.	pAA
<i>agg5A</i>	Codifica AAF / V media la adherencia a la mucosa colónica y la hemaglutinación de los eritrocitos.	pAA
<i>aaiA-Y</i>	PAI que codifica un sistema de secreción de tipo VI (T6SS)	Cromosoma



<i>pet</i>	Una proteína autotransportadora de 108 kDa que funciona como una enterotoxina y citotoxina lábil al calor	pAA
<i>sigA</i>	Un homólogo similar a la proteasa IgA, enterotoxina y citotoxina	cromosoma
<i>pic</i>	Mucinasas, inmunomodulación, colonización, hemaglutinina de tipo lectina	cromosoma
<i>sepA</i>	Shigella enterotoxina extracelular	pAA
<i>Sat</i>	La toxina autotransportadora secretada. Enterotoxina y citotoxina, deterioro de las uniones estrechas, autofagia	pAA
<i>astA</i>	<i>astA</i> codifica la toxina estable al calor agregada (EAST-1), que tiene similitudes físicas y mecánicas con la enterotoxina STa de <i>E. coli</i>	pAA

6.2.4 Detección de EAEC

El método estándar para identificar EAEC es cultivar cinco colonias por paciente en caldo Luria estático a 37°C y luego infectar células HEp-2 durante 3 horas y buscar el patrón de adherencia agregativa (AA). Cuando se trata de esta manera, EAEC agrega y produce una apariencia distintiva de "ladrillo apilado", donde los bacilos se alargan y, a veces, se alinean en una sola capa sobre la superficie de la célula^(5, 13, 56). Sin embargo, este método no distingue entre cepas patógenas y no patógenas y no es adecuado para la vigilancia de brotes de EAEC, ya que requiere equipo especializado y requiere mucha mano de obra. En un metanálisis de cuatro estudios diferentes que examinaron la distribución de genes de EAEC en niños que estaban excretando EAEC, los genes *aafA*, *astA* y 4A18 se asociaron a enfermedades diarreicas agudas entre niños de regiones en desarrollo. Sin embargo, las cepas de EAEC en todos estos 4 estudios fueron heterogéneas, con la detección de estos genes en cada estudio bastante diferente⁽²⁹⁾. Además, en el mismo metanálisis, una sonda de ADN utilizada comúnmente para EAEC, que se basa en un fragmento de ADN de 1 kb del plásmido 60-MDa de la cepa 17-2 de EAEC, mostró un amplio rango de sensibilidad (15% a 89%), lo que



refleja la heterogeneidad entre las cepas de EAEC y la falta de propiedades de virulencia definidas en muchas cepas de EAEC ⁽²⁹⁾.

Históricamente, se pensó que el gen *aggR* era un candidato prometedor para la detección molecular, ya que codifica un regulador positivo para muchos factores de virulencia involucrados en la adherencia y la producción de toxinas por las cepas típicas de EAEC y es transportado por más del 70% de los aislamientos de EAEC de pacientes humanos^(45, 57). Sin embargo, las cepas de EAEC no diarreicas que llevan el gen *aggR* también se han aislado de pacientes sanos, y la detección de este gen en un aislado bacteriano de un paciente enfermo no puede considerarse concluyente de que sea el agente causante de la diarrea⁽⁵⁸⁾, ya que cepas que no llevan el gen *aggR* también se han aislado de brotes gastrointestinales⁽⁵⁾.

En la actualidad, la amplificación por PCR multiplex del gen *aatA* transportado por el plásmido o del loci *aaiC* portado cromosómicamente se considera suficiente para confirmar la EAEC en el GEMS recientemente lanzado, una iniciativa para identificar de manera general los principales patógenos entéricos rápidamente en sitios donde la carga diarreica es alta⁽⁵⁹⁾; *aatA* codifica una proteína de membrana externa que forma parte de un sistema transportador de proteínas^(60, 61). En un estudio de 2009 de 252 aislamientos de *E. coli* de niños con diarrea, *aatA* se amplificó solo en cepas de EAEC y no en otras cepas de *E. coli* diarreogénicas⁽⁶²⁾. El otro gen utilizado en GEMS, *aaiC*, codifica una proteína secretada por la cepa 042 de EAEC prototípica, con secreción de *AaiC* regulada por *AggR*. *aaiC* se detectó en 26 cepas de EAEC en un estudio de 35 cepas de EAEC de regiones geográficamente distintas, lo que indica que se puede encontrar en una alta prevalencia en EAEC⁽⁵⁴⁾

Sin embargo, la amplificación de cualquiera de estos genes no distingue de manera concluyente la EAEC diarreogénica de las cepas no diarreogénicas⁽⁶³⁾. En un estudio posterior de todas las cepas de EAEC que fueron positivas para *aaiC* o *aatA*, un conjunto de genes en combinación, *aaiC* y *agg3/4C* pero que carecen de *agg4A* y *orf61*, se asoció con casos de diarrea, y otro, *orf61* en ausencia de *pet* y *aafA*, se correlacionó con niños control⁽⁶³⁾. Además, como se revisó en la referencia 585, en los niños brasileños con diarrea en comparación con aquellos sin, la presencia de los genes *kps* (cápsula), *hly*, *aero* (aerobactina)



y *aggA* se asoció fuertemente con la enfermedad⁽⁶⁴⁾, lo que sugiere que el desarrollo de un ensayo para detectar estos genes puede ser un método prometedor para la detección de cepas de EAEC que causan enfermedades en niños en lugares no europeos y no estadounidenses. Si bien los estudios actuales para identificar marcadores concluyentes para cepas de EAEC con diarrea son prometedores, la identificación de marcadores moleculares para detección rápida seguirá siendo un desafío debido a la heterogeneidad de EAEC⁽⁶⁵⁾

6.2.5 Respuesta inmune del hospedero

La respuesta inflamatoria del huésped a la infección por EAEC depende del sistema inmune innato del huésped y de la cepa EAEC. El papel de los genes de virulencia putativos y los resultados clínicos no está claro. Las EAEC acarrea genes de "virulencia" que no siempre están asociadas con la enfermedad; sin embargo, los factores de virulencia están asociados con un aumento en los niveles de citocinas fecales y marcadores inflamatorios, como la interleucina (IL)-1ra, IL-1b, IL-8, interferón (INF)- γ , lactoferrina, leucocitos fecales y sangre oculta^(66, 67). La IL-8 es una quimioquina proinflamatoria importante involucrada en la patogénesis de la EAEC. La IL-8 es responsable del reclutamiento de neutrófilos en la mucosa epitelial sin lesión de la mucosa y facilita la secreción de líquido intestinal⁽⁶⁸⁾.

Los viajeros a México que desarrollaron una enfermedad sintomática debido a la infección por EAEC excretaron altas concentraciones de IL-8 fecal en comparación con los viajeros que no desarrollaron diarrea debido a la infección por EAEC⁽⁶⁹⁾. Además de IL-8, se ha demostrado que las células epiteliales intestinales infectadas con EAEC 042, la cepa prototipo, regulan al alza los siguientes genes: IL-6, factor de necrosis tumoral (TNF)-a, producto génico relacionado con el crecimiento (GRO)-a, GRO- γ , molécula de adhesión intercelular (ICAM)-1, factor estimulante de colonias de granulocitamacrófagos (GM-CSF) e IL-1a. Estas respuestas celulares están mediadas principalmente por la flagelina (*fliC*), una de las principales proteínas de la superficie bacteriana de la EAEC⁽⁵¹⁾. La flagelina causa la liberación de IL-8 de varias líneas celulares epiteliales al unirse al receptor 5 Tipo Toll (TLR5). El TLR5 señala a través de la proteína quinasa activadora de mitógeno P38 (MAPK) y el factor nuclear kappa B (NF- κ B) e inducen la transcripción de citoquinas



proinflamatorias de células epiteliales y monocíticas⁽⁷⁰⁾. MAPK es miembro de una familia de quinasas relacionadas con el estrés que influyen en una amplia gama de funciones celulares, incluidas las respuestas inflamatorias del huésped a productos microbianos⁽⁷⁰⁾. Está claro que múltiples factores contribuyen a la inflamación inducida por EAEC, y una mayor caracterización de la naturaleza de los factores proinflamatorios de EAEC mejorará en gran medida la comprensión de este patógeno emergente⁽⁷¹⁾.

6.2.6 Susceptibilidad genética del huésped

Las manifestaciones clínicas de la diarrea por EAEC varían de un individuo a otro, dependiendo de la composición genética del huésped⁽⁶⁹⁾. Se ha estudiado la distribución de genotipos de IL-8 en sujetos sintomáticos y asintomáticos infectados con EAEC. Se han identificado diferencias en las frecuencias alélicas de polimorfismos de T a A en la región promotora de IL-8 ubicada 2251 pb en sentido ascendente sitio de inicio de la transcripción⁽⁶⁹⁾. Un genotipo AA o AT en la posición 2251 en la región promotora de IL-8 da como resultado mayores posibilidades de desarrollar infección por EAEC sintomática en comparación con las del genotipo TT⁽⁶⁹⁾. Un genotipo AA también se asocia con mayores concentraciones de IL-8 fecal que las de los genotipos AT y TT. Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en regiones reguladoras y codón de otras quimiocinas y citoquinas son un área de investigación activa. Además de determinar la susceptibilidad del huésped a la infección por EAEC, los SNP son importantes en el estudio de la epidemiología, la evaluación de riesgos y la patogénesis de la EAEC. Estos factores pueden definir las poblaciones que se benefician de las intervenciones terapéuticas, como la terapia antibiótica profiláctica o la vacunación.

6.2.7 Asociación de EAEC y déficit nutricional

EAEC se asoció con disminuciones sustanciales en TPE a los dos años de edad. Sin embargo, los efectos fueron menos aditivos, de modo que una alta frecuencia de detección de ambos



patógenos se asoció con disminuciones similares a las asociadas con cualquiera de los patógenos solos⁽¹¹⁾. En contraste, EAEC no se asoció con PPE. El mayor impacto de EAEC en TPE ocurrió entre los niños con la mayor frecuencia de detección durante los primeros 2 años de vida, lo que sugiere que es necesaria altas tasas de exposición repetidas a EAEC prolongada durante muchos meses para que la manifestación de decrementos en la longitud total sea observada a los dos años de edad. ⁽¹¹⁾. En 2014 Jiménez *et al*, detectó una disminución en los valores Z de peso para la edad (PPE) en niños panameños menores de 5 años que habían sido infectados con EAEC⁽²⁶⁾

Las infecciones por EAEC a menudo son extremadamente subclínicas; las detecciones repetidas de EAEC se asociaron con déficits de crecimiento lineal a largo plazo y se ha sugerido más trabajo para cuantificar mejor la contribución de la inflamación intestinal causada por la EAEC al deterioro del crecimiento⁽¹¹⁾.



7. Diseño Metodológico

Tipo de estudio: Descriptivo longitudinal.

Periodo de estudio: junio 2017-diciembre 2018.

Población: 444 niños enrolados en el estudio de cohorte de Gastroenteritis por *Sapovirus* (SAGE) pertenecientes al sector sur-este de la ciudad de León. Enrolados desde el nacimiento.

Muestreo: No Probabilístico.

Muestra: Se analizaron un total de 144 niños, obteniendo de ellos todos los episodios de diarrea registrados a lo largo de los primeros 12 meses de vida.

Para el objetivo de Describir las características clínicas y epidemiológicas de la población en estudio, se colectó la información de la siguiente manera:

1. **Seguimiento activo cohorte SAGE:** Semanalmente, trabajadoras de campo de la cohorte del estudio SAGE (las cuales fueron entrenadas y capacitadas para la recolección de muestra e información) realizaron visitas a domicilio de los niños participantes y recolectaron información clínica y epidemiológica (ver anexo 1). Mensualmente, se hizo recolección de muestras de heces y valores antropométricos (peso y talla). Cuando uno de los participantes tuvo un episodio de diarrea, se registró la información haciendo uso del formulario de diarrea (ver anexo 2) y se recolectó muestra de heces que fue procesada para la identificación EAEC.

Para el objetivo de determinar la carga de diarrea por EAEC en niños menores de 12 meses: se analizaron un total de 242 episodios de diarrea para la identificación EAEC. Esto permite conocer la carga de diarrea asociada a este patógeno en la población de estudio; a su vez, se calculó la incidencia acumulada de la primera detección de EAEC.

Para el objetivo de describir el comportamiento del peso y la talla en los infantes con infecciones sintomáticas asociadas a EAEC: 73 infantes que experimentaron al menos un episodio de diarrea por EAEC fueron analizados para establecer relación entre la infección sintomática y el efecto en el peso y talla. En este objetivo se calculó los valores Z de cada



niño (peso para la edad, longitud para la edad y talla según peso) a corto y mediano plazo: 3 meses, 6 meses, 9 meses y 12 meses posteriores a la infección. Estos valores del índice Z fueron calculados de la siguiente manera:

$$\text{Valor } Z = \frac{(Y/X)^{\lambda^a} - 1}{S^a \cdot \lambda^a}$$

Donde Y= medida antropométrica obtenida en el mes correspondiente al análisis. Unidad de Longitud en cm, y peso en kg.

X= Media poblacional estandarizada por edad (en meses) y sexo en una población sana.

λ = Error permitido obtenido a partir de mediciones estandarizadas por edad y sexo en una población sana.

S= Coeficiente de variación poblacional estandarizada por edad y sexo en una población sana.

^a= Valor tomado de WHO Child Growth Standards WHO Child Growth Standards⁽⁷²⁾. Ver anexo 4.

Recolección y Análisis moleculares de las muestras de heces.

Recolección de muestras de heces fecales: Las muestras de heces diarreica o mensuales se recolectaron en frascos estériles o pañales desechables, éstas fueron transportadas al Laboratorio de Investigación del Centro de Enfermedades Infecciosas (CEI) de la UNAN-León, donde se realizó suspensiones 1/10 con PBS 1X. Éstas suspensiones fueron almacenadas a -20°C hasta su procesamiento.

Identificación de EAEC mediante PCR en tiempo real

Todas las muestras incluidas en el estudio (n=242) fueron analizadas mediante PCR en tiempo real para la identificación de los genes *aaIC* y *aatA* utilizados para la confirmación de EAEC. Para ello, se realizó extracciones de ADN utilizando QIAamp® DNA Stool Mini Kit (50) (cat. no. 51504) and the InhibitEX Tablets (100) (cat. no. 19590) siguiendo los pasos del fabricante.



Procedimiento de Extracción:

1. Pesar 180-220 mg de la muestra de heces y añadir en tubos eppendorf de 1.5 ul (colocar en hielo). Añadir 1.4 ml de buffer ASL a cada muestra.
2. Agregar 0.03 gramos de 212-300 um glass beads y vortear por 5 minutos.
3. Calentar la suspensión a 70°C por 5 minutos
4. Vortear por 15 segundos y centrifugar la muestra (máxima velocidad) por 1 minutos.
5. Pipetear 1.2 ml del sobrenadante dentro de un nuevo tubo de 1.5 ml.
6. Agregar 1 tableta de InhibitEX a cada muestra y vortear inmediatamente y continuamente por 1 min hasta que se suspenda continuamente e incubar a temperatura ambiente por 1 minuto
7. Centrifugar la muestra a máxima velocidad por 3 minutos.
8. Pipetear todo el sobrenadante a nuevo tubo de 1.5 ml y centrifugar la muestra a máxima velocidad por 3 minutos.
9. Agregar 15 ul de proteinasa K en un nuevo tubo de 1.5 ml y agregar 200 ul del sobrenadante obtenido en el paso 9.
10. Agregar 200 ul de Buffer AL y vortear por 15 segundos **NOTA: no agregar proteinasa K directamente al buffer, se debe mezclar primeramente con el lisado de la extracción.**
11. Incubar a 70°C por 10 minutos. Centrifugar brevemente para eliminar gotas en el interior del tubo (opcional)
12. Agregar 200 ul de etanol (96-100%) al lisado. Centrifugar brevemente para eliminar gotas en el interior del tubo (opcional)
13. Etiquete la tapa de una columna de QIAamp y colocarla en un tubo colector de 2 ml. Colocar cuidadosamente todo el lisado obtenido en el paso 13 en la columna tratando de no dejar porciones del lisado en los bordes. Cerrar la columna y centrifugar a máxima velocidad por 1 minuto. Colocar la columna en un nuevo tubo colector de 2 ml y descartar el tubo que contiene el filtrado.



14. Abrir cuidadosamente la columna y agregar 500 ul de Buffer AW1. Cierre la columna y centrifugar el contenido a máxima velocidad por 1 minuto. Colocar la columna en un nuevo tubo colector de 2 ml y descartar el tubo que contiene el filtrado.
15. Abrir cuidadosamente la columna y agregar 500 ul de Buffer AW2. Cierre la columna y centrifugar el contenido a máxima velocidad por 3 minuto. Colocar la columna en un nuevo tubo colector de 2 ml y descartar el tubo que contiene el filtrado.
16. Centrifugar a máxima velocidad por 1 min. Este paso ayudará eliminar restos de Buffer AW2
17. Transferir la columna de QIAamp a un eppenderf de 1.5 ml previamente etiquetado. Abrir cuidadosamente la columna y añadir 200 ul de Buffer AE directamente en la membrana. Incubar 1 minuto a temperatura ambiente y centrifugar a máxima velocidad por 1 min para eludir el ADN.

Procedimiento PCR en tiempo real.

El diagnóstico molecular de EAEC se realizó mediante la amplificación génica de *aaiC* (gen cromosómico) y *aatA* (gen de plásmido), que no tienen homólogos aparentes dentro de GenBank ⁽⁷³⁾. El PCR en tiempo real se realizó utilizando 12.5 ul de Bio-Rad iQ Multiplex Powermix, 1 ul de Primers/probe (mezcla de *aaiC*+*aatA*) 1 uM, 8.5 ul de agua libre de nucleasas y 3 ul de ADN extraído. Las condiciones del PCR fueron 3 minutos a 95°C para desnaturalización inicial, 40 ciclos de 95°C por 10 segundos y 60°C por 1 min.

Tabla 2: Primers para la detección de EAEC

Primers	Secuencia	Referencia
<i>aaiC</i>	F: 5'-ATTGTCCTCAGGCATTTTCAC -3'	Boisen N, 2008 (Modificada)
	R: 5'-ACGACACCCCTGATAAACA-3'	
	P: 5'-TAGTGCATACTCATCATTTAAG-3'	
<i>aatA</i>	F: 5'-CTGGCGAAAGACTGTATCAT-3'	Boisen N, 2008
	R: 5'-TTTTGCTTCATAAGCCGATAGA-3'	
	P: 5'-TGGTTCTCATCTATTACAGACAGC-3'	



Estadística

Los valores estadísticos fueron calculados usando IBM SPSS Statistics 21. Las características clínicas y epidemiológicas son presentadas como medidas de tendencia central ($\bar{x} \pm DS$) para las variables cuantitativas y valores absolutos y porcentajes para las variables cualitativas. Los episodios de diarrea por EAEC fueron presentados como incidencia acumulada de la primera detección. Los índices Z para la talla, el peso y el peso-talla a los 3, 6, 9 y 12 meses fueron comparados mediante la prueba de Wilcoxon Rang-Sum Test. Para todas las pruebas estadísticas empleadas un valor $P < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Consideraciones éticas

El estudio de Cohorte SAGE está aprobado por el comité de ética para las investigaciones biomédicas (CEIB) “Dr. Uriel Guevara Guerrero” bajo el título “Historia Natural, Inmunidad y patrones de transmisión de *Sapovirus* en una cohorte de niños nicaragüenses, seguidos desde el nacimiento”. Acta No.2; León, 18 de enero de 2017 (ver anexo 3). Enmiendas al protocolo original que contemplan estudios de otros agentes de gastroenteritis como EAEC fueron sometidas por los investigadores de la cohorte SAGE al CEIB de la UNAN-León para su aprobación.

**Operalización de Variable**

Variable	Concepto	Valor
<i>Características generales</i>		
Sexo	Conjunto de características fenotípicas y genotípicas que diferencian a las especies en hombre y mujer	Masculino Femenino
Edad	Tiempo transcurrido a partir del nacimiento de un individuo.	Número del mes que corresponde con la edad de la recolección de datos y muestra
Lactancia materna	Proceso por el que la madre alimenta con leche a su hijo (bebé) a través de sus senos.	Si. No. Se niega a responder
<i>Características epidemiológicas</i>		
Fuente de agua	Fuente de abastecimiento de agua para consumo humano.	Agua potable Agua de pozo comunitario Agua purificada Otro
Tratamiento a agua de consumo	Utilización de técnicas de purificación de agua para consumo (ej. Filtro de agua, hervir, utilización de cloro, filtro de arena o barro, etc.	Nunca A veces Siempre
Nivel socio-económico	Medida total económica y sociológica que combina la preparación laboral, económica y social en la familia, basada en sus ingresos, educación y empleo.	Extremadamente pobre Pobre No pobre
Lugar de deposición de excretas	Recipiente o lugar que sirve para depositar las excretas	Letrinas Inodoro Otro
Animales que viven en el domicilio.	Animales o mascotas que habitan en el misma casa de habitación	Ninguno, perro, gato, gallina, cerdo, vaca, ratones, loro, otros.
Habitantes en domicilio	Personas que habitan en el mismo espacio (casa)	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, >10
<i>Características clínicas</i>		
Infección	Colonización del organismo por gérmenes patógenos, que se establecen y se multiplican dentro del hospedero.	Infección sintomática Infección asintomática



Sangre visible en heces	Presencia de sangre visible en la materia fecal (Deposiciones de color rojizas)	Si. No.
Episodios de Diarrea	Deposición de 3 o más veces al día (o una frecuencia mayor que la normal para la persona) de heces sueltas o líquidas)	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, >7
Diarrea persistente	Episodio de diarrea con más de 14 días de duración	Si No
Diarrea por EAEC	Episodio de diarrea con identificación de EAEC	Si No
Tiempo Post-infección	Meses transcurrido posterior a la detección del episodio sintomático de diarrea por EAEC	Corto plazo (3 meses) Mediano Plazo (6-12 meses)
Hospitalización	Ingreso de una persona enferma o herida en un hospital para su examen, diagnóstico, tratamiento y curación por parte del personal médico.	Si. No. Se niega a responder
Hidratación intravenosa (IV)	Administración de sustancias líquidas directamente en una vena a través de una aguja o tubo (catéter) que se inserta en la vena, permitiendo el acceso inmediato al torrente sanguíneo para suministrar líquidos y medicamentos.	Si. No. Se niega a responder
Días de hidratación IV	Cantidad de días en que el paciente ha recibido hidratación intravenosa	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, >10
Uso de antibiótico	Uso de sustancia antimicrobiana utilizada con la finalidad de eliminar o impedir el crecimiento de los microorganismos sensibles	Si. No. No sabe/Se niega a responder
Días de terapia antimicrobiana	Cantidad de días en que el paciente ha recibido terapia antimicrobiana	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, >10



8. Resultados

8.1 Características clínicas y epidemiológicas

En este estudio se realizó seguimiento activo a 144 niños desde su nacimiento hasta su primer año de vida; todos ellos pertenecientes al sector de salud Perla María Norori de la ciudad de León, de ellos 80 (55,56%) fueron del sexo masculino y 64 (44,44%) del sexo femenino. De los 144 niños, 125 (86,81%) tenían acceso a agua potable y 95 (65,97%) utilizaban inodoro como depósito de excretas. Los domicilios contaban con un promedio de 4,48 (DS=4,20) habitantes y con nivel socio-económico pobre (50,69%), no pobre (44,44%) y extremadamente pobre (4,86%) siguiendo los parámetros de Pena *et al.*⁽⁷⁴⁾ (ver tabla 3a).

En el período de estudios establecido se registraron un total de 242 episodios de diarreas, los cuales presentaron un promedio de 5,8 (3,72-7,88) deposiciones por día y 5,6 (3,2-8,0) días de duración, 12 episodios de diarreas (4,96%) tuvieron sangre en las heces, 7 (2,89%) fueron tratados con antibiótico y únicamente 2 (0,83%) requirieron de hospitalización (ver tabla 3b).



Tabla 3. Características epidemiológicas y clínicas de la población en estudio

<i>a) Características epidemiológicas (n=144 niños)</i>	
Fuente de agua	
Potable	125 (86,81%)
Pozo	19 (13,19%)
Tratamiento al agua de consumo	
	16 (11,11%)
Deposición de Excreta	
Letrina	46 (31,94%)
Inodoro	95 (65,97%)
Ninguno	3 (2,08%)
Habitantes por domicilio^a	
	4,48 (2,28-6,68)
Estado socio-económico	
Extremadamente pobre	7 (4,86%)
Pobre	73 (50,69%)
No pobre	64 (44,44%)
<i>b) Características clínicas (n=242 episodios de diarreas)</i>	
Deposiciones al día^a	5,8 (3,72-7,88)
Días de diarrea^a	5,6 (3,2-8,0)
Sangre en heces	12 (4,96%)
Hospitalización	2 (0,83%)
Uso de Antibiótico	7 (2,89%)

^a Media (IC)

8.2 Carga de diarrea donde se detectó EAEC

De los 144 niños en seguimiento, 54 (37,5%) tuvieron al menos un episodio de diarrea donde se detectó a EAEC y 21 (14,6%) tuvieron dos o tres episodios de diarrea asociada a este patógeno dentro de su primer año de vida. (Ver tabla 4).



Tabla 4. Distribución de episodios de diarreas EAEC en los niños de estudio

Niños en seguimiento	144
Niños con diarreas con detección de EAEC	75 (52,1%)
<i>Números de episodios de diarreas asociadas a EAEC por niños n (%)</i>	
1 episodio	54 (72%)
2 episodios	17 (22,67%)
3 episodios	4 (5,33%)

La incidencia acumulada de la primera detección de EAEC fue de 0,52 (ver gráfico 1).

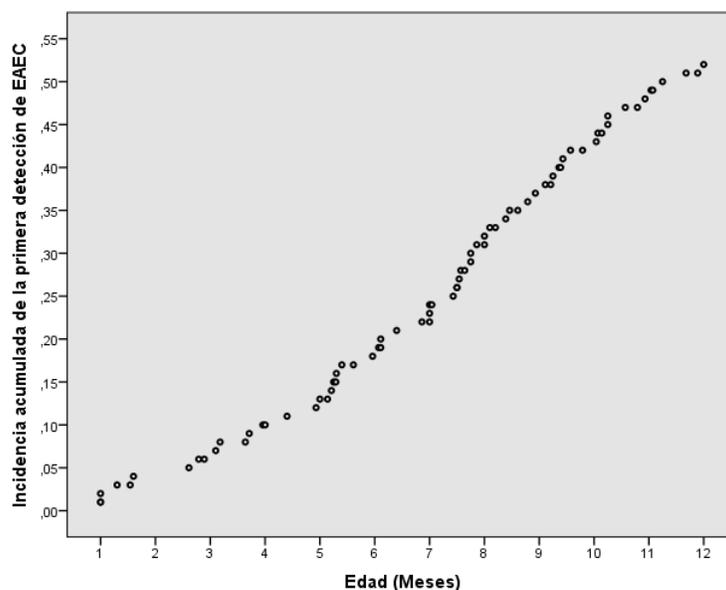


Gráfico #1. Incidencia acumulada de la primera detección de EAEC en el primer año de vida (n=144).

De los 242 episodios de diarreas registrados, 100 (41,3%) resultaron positivas para EAEC, las edades con mayor frecuencia de diarrea con detección de EAEC fueron 7-9 meses (38%) (Ver tabla 5)



Tabla #5. Episodios diarreas EAEC en los niños de estudios

Episodios de diarreas	242 (100%)
Diarreas asociadas a EAEC	100 (41,3%)

Distribución de los episodios de diarreas asociados a EAEC según edad y sexo (n=100)

Edades	Masculinos n (%)	Femeninos n (%)	Total n (%)
1-3 meses	4 (7,3)	8 (17,8)	12 (12%)
4-6 meses	16 (29,1)	7 (15,6)	23 (23%)
7-9 meses	23 (41,8)	15 (33,3)	38 (38%)
10-12 meses	12 (21,8)	15 (33,3)	27 (27%)

8.3 Infecciones sintomáticas con detección de EAEC y su efecto en el peso y la talla.

Para identificar asociación entre las infecciones sintomáticas y el peso y la talla de los infantes, se seleccionaron 73 niños que registraron episodios de diarreas asociadas a EAEC y a su vez contaban con mediciones antropométricas (peso y talla) a los 3, 6, 9 y 12 meses post-infección (PI). De los 73 niños, 42 (57,53%) eran masculinos y 31 (42,47%) femeninos; 53 niños (72,6%) tuvieron sólo una diarrea asociada a EAEC, 17 (23,3%) tuvieron dos episodios y 3 (4,1%) tuvieron 3 episodios. Se realizó un análisis de comparación de medias de peso y talla a corto y mediano plazo usando Wilcoxon Rank-Sum Test, tomando como base el trimestre en que cada niño sufrió la diarrea con detección de EAEC (ver gráfico #2).

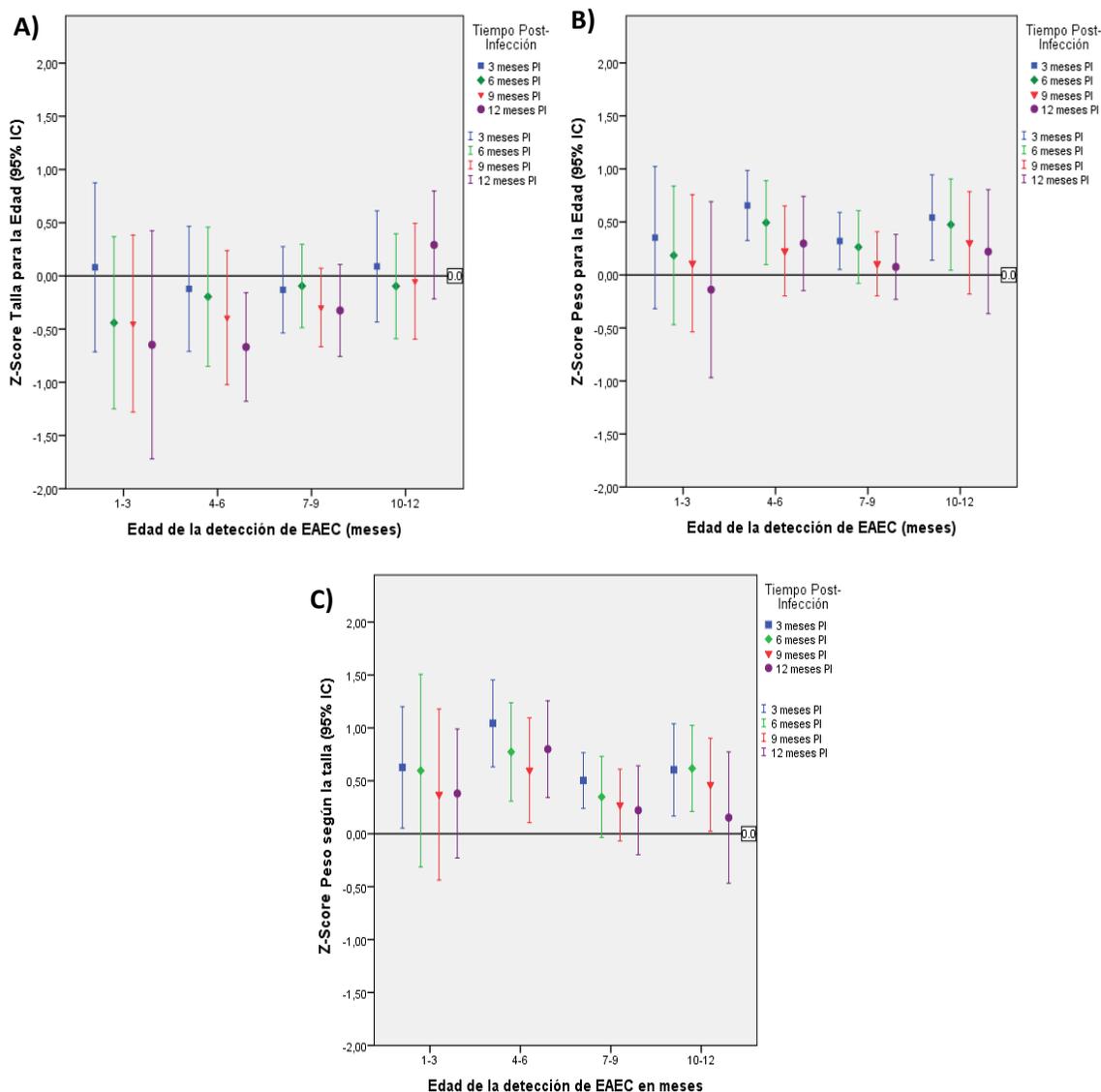


Gráfico #2. Índice Z de niños con diarrea según la edad detección de EAEC (n=100) y su impacto a corto y mediano plazo en talla y peso. Edad de detección de EAEC: 1-3 meses (n=12), 4-6 meses (n=23), 7-9 meses (n=38), 10-12 meses (n=27). **A)** índice Z de talla para edad. **B)** Índice Z de peso para la edad. **C)** Índice Z del peso según la talla. Índice Z de referencia fueron obtenido de WHO, Methods and development. Department of nutrition for Health and Development ⁽⁷²⁾



A lo largo del primer año de vida se observan índices Z para la talla por debajo del promedio estándar normal establecido por la OMS posterior a episodios sintomáticos con presencia de EAEC independiente del trimestre en que ocurre esta infección (ver gráfico #2a). Además, se observa una tendencia decreciente desde los 3 hasta los 12 meses P.I. (-0.047, -0.231, -0.450, -0.266), siendo este retardo mayormente marcado y estadísticamente significativo entre los meses 6-9, y posteriormente entre los meses 9-12 P.I (ver tabla #6).

Por otro lado, no se observó efecto negativo sobre el peso de los infantes P.I por EAEC (ver gráfico #2b). Sin embargo, se observó una disminución estadísticamente significativa hasta los 12 meses P.I. en el índice PPE, (ver tabla #6). Aunque, las disminuciones fueron estadísticamente significativas, el PPE hasta 12 P.I. los índices de PPE fueron superiores a la media esperada según la OMS. Un comportamiento similar se observó para la talla según el peso.

Tabla #6. Comparación de medias de TPE, PPE y TSP a los 3, 6, 9 y 12 meses P.I.

Meses PI	Mediana (RI)*	valor p
<i>Índice Z - Talla para la edad</i>		
3 meses PI	-0,047 (-0,98;0,73)	0,196
6 meses PI	-0,231 (-0,93;-0,62)	0,037
9 meses PI	-0,450 (-1,27;0,69)	
12 meses PI	-0,266 (-1,27;0,53)	0,056
<i>Índice Z - Peso para la edad</i>		
3 meses PI	0,448 (-0,18;1,08)	0,044
6 meses PI	0,442 (-0,30;1,01)	
9 meses PI	0,337 (-0,70;0,87)	0,001
12 meses PI	0,214 (-0,65;1,05)	0,027
<i>Índice Z - Peso según la talla</i>		
3 meses PI	0,639 (-0,76;1,21)	0,449
6 meses PI	0,528 (-0,20;1,38)	0,262
9 meses PI	0,370 (-0,28;1,16)	0,747
12 meses PI	0,370 (-0,26;1,13)	

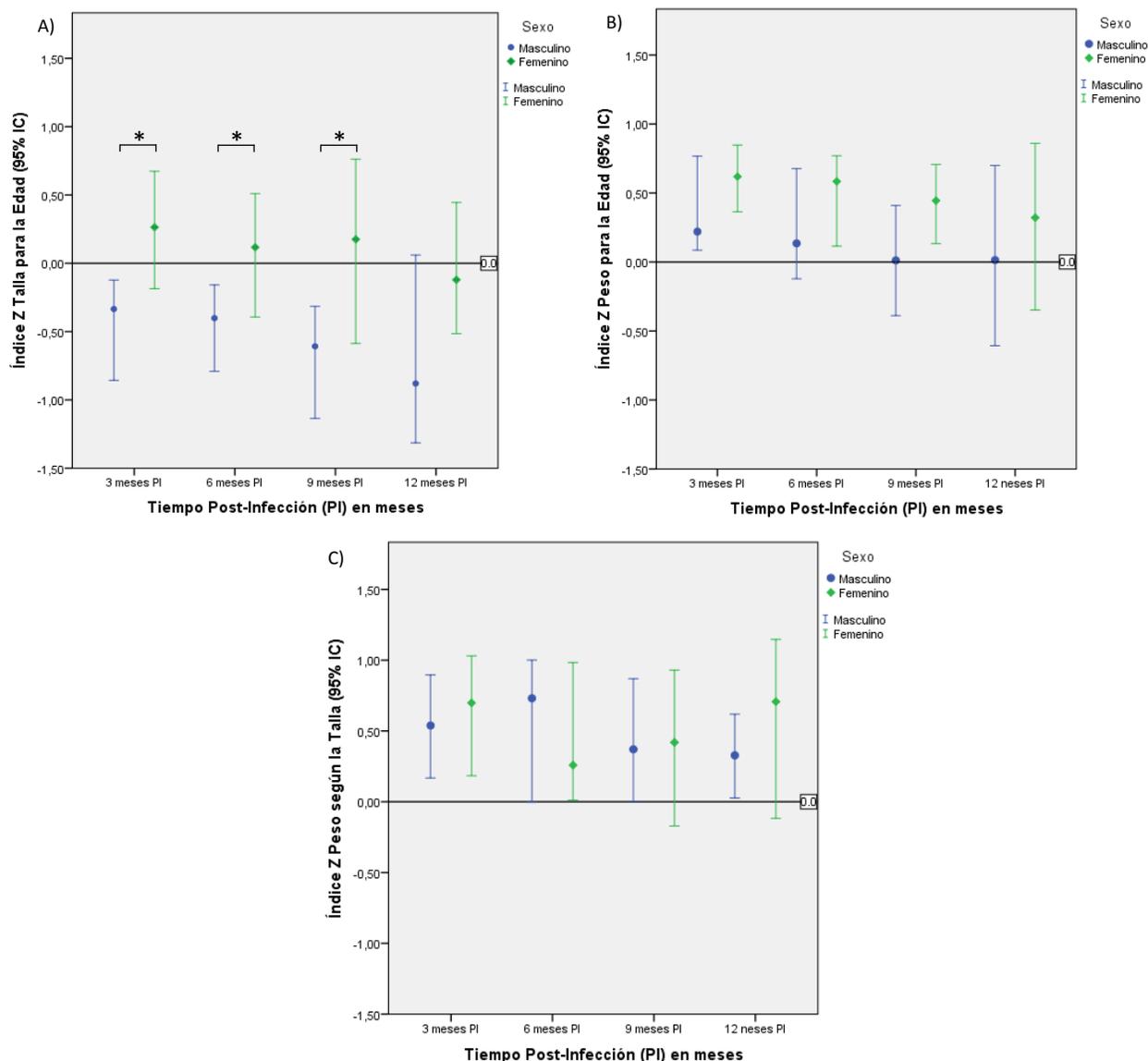
*Rango intercuartílicos (25;75); PI: Post-infección



8.3.1 Disminuciones en TPE se asocian al sexo, no así PPE y TSP.

De los 73 niños, 42 (57,53%) y 31 (42,47%) correspondían al sexo masculino y femenino respectivamente. Para comparar si las disminuciones en TPE, PPE y TSP se asocian al sexo, se compararon las medianas de los índices Z de cada grupo a los 3, 6, 9 y 12 meses P.I. para TPE, PPE y TSP (ver gráfico #3); en ella se observa que el sexo masculino tiene índices Z más bajos comparados con los índices Z del sexo femenino en TPE, PPE y TSP en los distintos meses P.I.

En TPE, se observó una mayor disminución en el sexo masculino a lo largo de los 12 meses P.I. comparado con el sexo femenino y estas disminuciones fueron estadísticamente significativa desde 3 hasta 9 meses P.I. (ver tabla #7). En PPE se observó una tendencia en que el sexo masculino tiene una mayor disminución; sin embargo, esta diferencia entre ambos sexos no es estadísticamente significativa. En el PST, se observa un patrón similar a PPE, donde se observa una tendencia decreciente en el sexo masculino (ver tabla 7).



Gráfico#3. Índices Z ajustado por sexo y meses post-infección (PI). **A)** Índice Z de talla para edad. **B)** Índice Z de peso para la edad. **C)** Índice Z del peso según la talla. Los valores Z de referencia fueron obtenidos de WHO, Methods and development. Department of nutrition for Health and Development ⁽⁷²⁾. *p<0.05



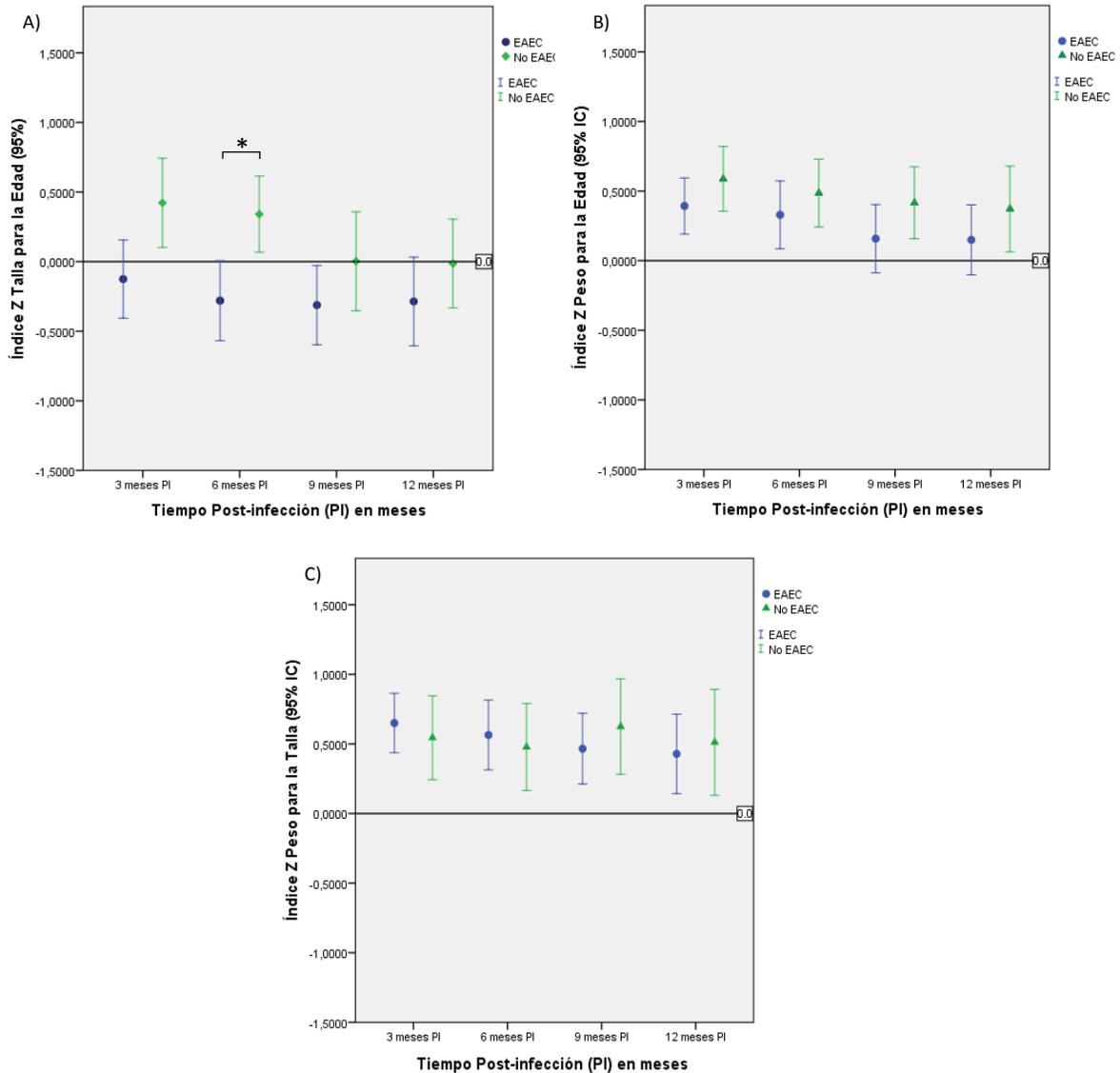
Tabla #7. Comparación de medias de peso y talla ajustadas por sexo y meses post-infección (n=73)

Tiempo Post Infección	Índice Z P.I. (TPE) ^a			Índice Z P.I. (PPE) ^a			Índice Z P.I. (TSP) ^a		
	Masculino	Femenino	valor p	Masculino	Femenino	valor p	Masculino	Femenino	valor p
3 meses	-0,33 (-1,11;0,45)	0,26 (-0,52;0,98)	0,017	0,22 (-0,29;1,20)	0,62 (-0,09;1,03)	0,285	0,54 (-0,08;1,18)	0,69 (-0,08;1,14)	0,788
6 meses	-0,40 (-0,96;0,48)	0,11 (-0,93;0,87)	0,043	0,14 (-0,43;1,07)	0,58 (-0,34;0,97)	0,449	0,73 (-0,20;1,37)	0,26 (-0,20;1,56)	0,464
9 meses	-0,61 (-1,53;0,36)	0,18 (-1,18;0,99)	0,008	0,11 (-0,74;0,86)	0,44 (-0,48;0,94)	0,339	0,37 (-0,23;1,09)	0,42 (-0,30;1,23)	0,955
12 meses	-0,88 (-1,47;0,32)	-0,12 (-0,79;0,77)	0,219	0,01 (-0,75;0,95)	0,32 (-0,63;1,16)	0,739	0,33 (-0,27;1,00)	0,70 (-0,26;1,27)	0,851

PI: Post-Infección, ^a Mediana y Rango Intercuartílico (25,75)

8.3.2 Efecto en peso y talla en niños con diarrea con y sin presencia de EAEC.

142/144 niños fueron seguidos hasta 12 meses P.I., 73 (51.4%) de ellos tuvieron detección de EAEC en episodios de diarrea y 69 (48.6%) sin detección de EAEC a lo largo de su primer año de vida. Los niños con detección de EAEC tuvieron mayor disminución en la talla comparados con los niños sin detección de EAEC (ver gráfico#4), principalmente en los primeros 6 meses post-infección (ver tabla 8).



Gráfico#4. Índices Z en niños con diarrea con y sin detección de EAEC (n=142). **A)** Índice Z de talla para edad. **B)** Índice Z de peso para la edad. **C)** Índice Z del peso según la talla. Los valores Z de referencia fueron obtenidos de WHO, Methods and development. Department of nutrition for Health and Development ⁽⁷²⁾. *p<0.05



Tabla #8. Comparación de los valores Z entre niños con diarrea asociada y no asociada a EAEC en los distintos meses post-infección (n=142).

Tiempo Post Infección	Indice Z P.I. (TPE) ^a			Indice Z P.I. (PPE) ^a			Indice Z P.I. (TSP) ^a		
	EAEC	No EAEC	valor p	EAEC	No EAEC	valor p	EAEC	No EAEC	valor p
3 meses	-0,19 (-0,97;0,63)	0,38 (-0,31;1,19)	0,066	0,36 (-0,22;1,04)	0,64 (-0,69;1,19)	0,241	0,53 (-0,13;1,21)	0,39 (-0,28;1,26)	0,859
6 meses	-0,33 (-1,09;0,49)	0,31 (-0,27;0,79)	0,029	0,43 (-0,31;1,04)	0,49 (-0,01;1,09)	0,580	0,56 (-0,21;1,42)	0,47 (-0,26;1,19)	0,363
9 meses	-0,47 (-1,26;0,69)	0,23 (-0,89;0,86)	0,530	0,32 (-0,74;0,90)	0,36 (-0,26;1,04)	0,404	0,49 (-0,27;1,39)	0,57 (-0,38;1,30)	0,431
12 meses	-0,32 (-1,26;0,60)	-0,04 (-0,57;0,58)	0,545	0,25 (-0,64;1,07)	0,30 (-0,14;1,03)	0,882	0,46 (-0,12;1,18)	0,53 (-0,11;1,39)	0,714

PI: Post-Infección, ^a Mediana y Rango Intercuartílico (25,75)



9. Discusión

EAEC es un importante un grupo heterogéneo de bacterias en León, Nicaragua. En 2009, Vilchez *et al*, reportaron a EAEC como la principal DEC presente en muestras diarreicas de niños menores de 5 años (27,8%) en dicha zona geográfica⁽¹²⁾ y en el presente estudio se identificó a EAEC en el 41,3% de los episodios de diarrea analizadas en niños menores de 1 año, donde el 28% de éstos niños tuvieron más de 1 episodio de diarrea asociado a este patógeno, llegando incluso a registrar una incidencia acumulada de la primera detección de 0,52 en el primer año de vida; la cual, es similar a la reportada en 2017 por Rogawski *et al*, quienes en su estudio multicéntrico registraron una incidencia acumulada de la primera detección de EAEC de 0,55 en los primero 12 meses de vida⁽¹¹⁾.

Las infecciones producidas por EAEC pueden provocar diarrea aguda, diarrea persistente o infección asintomática^(4, 5). Estas infecciones y/o persistencia de EAEC en el organismo, pueden estar relacionadas a inflamaciones crónicas mediada principalmente por niveles altos de mieloperoxidasa fecal, daño del epitelio y reducción de la absorción intestinal⁽¹⁰⁾ y por ende podría asociarse a disminuciones en los valores Z de TPE, PPE^(11, 26).

En 2017, Rogawski *et al*, reportaron disminuciones sustanciales en TPE en niños que tuvieron infecciones por EAEC en los primeros dos años de vida principalmente en países como Brasil (TPE: -0,89) y Sudáfrica (TPE: -0,70), pero no lo asociaron con PPE⁽¹¹⁾. El presente estudio concuerda con lo reportado por Rogawski *et al*, ya se observó un déficit de crecimiento lineal a corto (TPE: -0,047) y mediano plazo (TPE: -0,231 y -0,450 a los 6 y 9 meses respectivamente) en los niños que tuvieron diarrea con detección de EAEC, con una tendencia decreciente a lo largo del tiempo hasta 9 meses PI, siendo estadísticamente significativa entre los 6 y 9 meses PI ($p=0,037$), el efecto negativo en el crecimiento lineal fue visto principalmente en el sexo masculino (TPE: -0,19; -0,33; -0,47, -0,32 a los 3, 6, 9 y 12 meses PI) que en el femenino (TPE: 0,38; 0,31; 0,23; -0,04 a los 3, 6, 9 y 12 meses PI) con mayor diferencia en los primeros 6 meses ($p=0,066$ y $p=0,029$, a los 3 y 6 meses PI).

A diferencia del comportamiento de la talla, el peso en los infantes no mostró un efecto negativo a corto (TPE: 0,448) o mediano plazo (TPE: 0,442; 0,337 a los 6 y 9 meses PI). Aunque los índices Z fueron superiores a la media esperada, se observó una tendencia



decreciente estadísticamente significativa ($p \leq 0,044$) a lo largo del tiempo hasta 12 meses PI. Los datos del presente estudio concuerdan con los reportados por Rogawski *et al.*, quienes en su análisis multicéntrico no asocian la disminución de los índices Z en el PPE a las infecciones producidas por EAEC en niños menores de 2 años⁽¹¹⁾, pero difieren con Jiménez *et al.*, quienes en 2014 detectaron una disminución en los valores Z de peso para la edad (PPE) en niños panameños menores de 5 años que habían sido infectados con EAEC⁽²⁶⁾

En el presente estudio se observó un mayor déficit de crecimiento lineal en los niños que tuvieron diarrea con detección de EAEC comparado con los niños que presentaron diarrea sin detección de dicho agente, tanto a corto (TPE_{EAEC} : -0,19; $TPE_{NO EAEC}$: 0,38; $p=0,066$) como a mediano plazo (TPE_{EAEC} : -0,33; $TPE_{NO EAEC}$: 0,31; $p=0,029$). Esta evidencia de déficit de crecimiento lineal debe ser tomada con cautela debido a las limitantes del presente estudio ya que no fueron valoradas las posibles co-infecciones en las muestras de diarreas de los infantes y se conoce que *Campylobacter* spp., ETEC, *Shigella*/EIEC, Norovirus y *Giardia lamblia* están relacionados a disminuciones sustanciales en las medidas antropométricas⁽²⁴⁾. Sin embargo, aunque no se valoraron las infecciones asintomáticas causadas por EAEC, se conoce que este agente es capaz de producir infecciones persistentes en los infantes, y que la persistencia de ella con o sin presentación de sintomatología clínica es capaz de producir un déficit de crecimiento lineal⁽¹¹⁾. Por otro lado, el comportamiento del peso en los infantes no mostró una diferencia en estos grupos de comparación a corto (PPE_{EAEC} : 0,36; $PPE_{NO EAEC}$: 0,64; $p=0,241$) o mediano plazo (PPE_{EAEC} : 0,43; $PPE_{NO EAEC}$: 0,49; $p=0,580$).



10. Conclusión

Las infecciones sintomáticas con detección de EAEC se asocian a un déficit de crecimiento lineal a corto y mediano plazo comparado con los estándares de crecimiento establecido por la OMS, este déficit de crecimiento lineal se observa principalmente en el sexo masculino. Por otro lado, EAEC no se asocian a un efecto negativo en el peso de los infantes leoneses.

EAEC es un grupo heterogéneo de bacterias de gran importancia que afecta a los niños leoneses durante el primer año de vida, ya que llega asociarse hasta en un 41% de los episodios de diarreas estudiados y afectó al 52% de los niños en seguimiento. Además existe evidencia estadística que los niños que presentaron diarrea con detección de EAEC tuvieron un mayor déficit de crecimiento lineal comparados con los niños que tuvieron diarrea sin presencia de dicho agente.



11. Recomendaciones

Para comprender mejor el comportamiento del peso y la talla en los infantes con infecciones causadas por EAEC, es necesario realizar estudios que evidencien tanto los días de duración de las infecciones sintomáticas y asintomáticas como las edades de adquisición del patógeno y comparar el comportamiento de las medidas antropométricas a corto y mediano plazo. Además es necesario tomar en consideración la presencia de otros patógenos (co-infecciones) a lo largo del estudio.



12. Referencias bibliográficas

1. Liu L, *et al.* Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *Lancet.* 2012 Jun 9;379(9832):2151-2161. PubMed PMID: 22579125.
2. Mortality GBD, *et al.* Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet.* 2016 Oct 8;388(10053):1459-1544. PubMed PMID: 27733281. Pubmed Central PMCID: 5388903.
3. MINSA. Causas de egresos hospitalarios. Ministerio de Salud, Nicaragua. 2016-2017. Available from: <http://mapasalud.minsa.gob.ni/mapa-de-padecimientos-de-salud-de-nicaragua/>.
4. Okeke IN, *et al.* Heterogeneous virulence of enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from children in Southwest Nigeria. *The Journal of infectious diseases.* 2000 Jan;181(1):252-260. PubMed PMID: 10608774.
5. Cobeljic M, *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with an outbreak of diarrhoea in a neonatal nursery ward. *Epidemiology and infection.* 1996 Aug;117(1):11-16. PubMed PMID: 8760945. Pubmed Central PMCID: 2271665.
6. Gonzalez R, *et al.* Age-specific prevalence of *Escherichia coli* with localized and aggregative adherence in Venezuelan infants with acute diarrhea. *Journal of clinical microbiology.* 1997 May;35(5):1103-1107. PubMed PMID: 9114389. Pubmed Central PMCID: 232711.
7. Kang G, *et al.* Evaluation of a simplified HEp-2 cell adherence assay for *Escherichia coli* isolated from south Indian children with acute diarrhea and controls. *Journal of clinical microbiology.* 1995 Aug;33(8):2204-2205. PubMed PMID: 7559981. Pubmed Central PMCID: 228368.
8. Paul M, *et al.* The significance of enteroaggregative *Escherichia coli* in the etiology of hospitalized diarrhoea in Calcutta, India and the demonstration of a new honey-combed pattern of aggregative adherence. *FEMS microbiology letters.* 1994 Apr 15;117(3):319-325. PubMed PMID: 8200507.



9. Okeke IN, *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli*. *The Lancet Infectious diseases*. 2001 Dec;1(5):304-313. PubMed PMID: 11871803.
10. Jenkins C. Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Current topics in microbiology and immunology*. 2018;416:27-50. PubMed PMID: 30232602.
11. Rogawski ET, *et al.* Epidemiology of enteroaggregative *Escherichia coli* infections and associated outcomes in the MAL-ED birth cohort. *PLoS neglected tropical diseases*. 2017 Jul;11(7):e0005798. PubMed PMID: 28742106. Pubmed Central PMCID: 5542697.
12. Vilchez S, *et al.* Prevalence of diarrhoeagenic *Escherichia coli* in children from Leon, Nicaragua. *Journal of medical microbiology*. 2009 May;58(Pt 5):630-637. PubMed PMID: 19369525.
13. Nataro JP, *et al.* Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *The Pediatric infectious disease journal*. 1987 Sep;6(9):829-831. PubMed PMID: 3313248.
14. Huppertz HI, *et al.* Acute and chronic diarrhoea and abdominal colic associated with enteroaggregative *Escherichia coli* in young children living in western Europe. *Lancet*. 1997 Jun 7;349(9066):1660-1662. PubMed PMID: 9186384.
15. Smith HR, *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli* and outbreaks of gastroenteritis in UK. *Lancet*. 1997 Sep 13;350(9080):814-815. PubMed PMID: 9298029.
16. Pabst WL, *et al.* Prevalence of enteroaggregative *Escherichia coli* among children with and without diarrhea in Switzerland. *Journal of clinical microbiology*. 2003 Jun;41(6):2289-2293. PubMed PMID: 12791838. Pubmed Central PMCID: 156476.
17. Itoh Y, *et al.* Laboratory investigation of enteroaggregative *Escherichia coli* O untypeable:H10 associated with a massive outbreak of gastrointestinal illness. *Journal of clinical microbiology*. 1997 Oct;35(10):2546-2550. PubMed PMID: 9316905. Pubmed Central PMCID: 230008.
18. Fang GD, *et al.* Etiology and epidemiology of persistent diarrhea in northeastern Brazil: a hospital-based, prospective, case-control study. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 1995 Aug;21(2):137-144. PubMed PMID: 7472898.
19. Pai M, *et al.* An epidemic of diarrhoea in south India caused by enteroaggregative *Escherichia coli*. *The Indian journal of medical research*. 1997 Jul;106:7-12. PubMed PMID: 9248208.



20. Morabito S, *et al.* Enteroaggregative, Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111:H2 associated with an outbreak of hemolytic-uremic syndrome. *Journal of clinical microbiology*. 1998 Mar;36(3):840-842. PubMed PMID: 9508328. Pubmed Central PMCID: 104641.
21. Svenungsson B, *et al.* Enteropathogens in adult patients with diarrhea and healthy control subjects: a 1-year prospective study in a Swedish clinic for infectious diseases. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2000 May;30(5):770-778. PubMed PMID: 10816147.
22. Schultsz C, *et al.* Diarrheagenic *Escherichia coli* and acute and persistent diarrhea in returned travelers. *Journal of clinical microbiology*. 2000 Oct;38(10):3550-3554. PubMed PMID: 11015362. Pubmed Central PMCID: 87435.
23. Okeke IN, *et al.* Etiology of acute diarrhea in adults in southwestern Nigeria. *Journal of clinical microbiology*. 2003 Oct;41(10):4525-4530. PubMed PMID: 14532177. Pubmed Central PMCID: 254369.
24. Platts-Mills JA, *et al.* Association between enteropathogens and malnutrition in children aged 6-23 mo in Bangladesh: a case-control study. *The American journal of clinical nutrition*. 2017 May;105(5):1132-1138. PubMed PMID: 28381477. Pubmed Central PMCID: 5402031.
25. Tickell KD, *et al.* Impact of Childhood Nutritional Status on Pathogen Prevalence and Severity of Acute Diarrhea. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2017 Nov;97(5):1337-1344. PubMed PMID: 29140236. Pubmed Central PMCID: 5817755.
26. Jimenez Gutierrez E, *et al.* Enteric parasites and enteroaggregative *Escherichia coli* in children from Canazas County, Veraguas Province, Panama. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2014 Aug;91(2):267-272. PubMed PMID: 24980494. Pubmed Central PMCID: 4125247.
27. Nataro JP, *et al.* Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*. 1998 Jan;11(1):142-201. PubMed PMID: 9457432. Pubmed Central PMCID: 121379.
28. Wilson A, *et al.* Characterisation of strains of enteroaggregative *Escherichia coli* isolated during the infectious intestinal disease study in England. *European journal of epidemiology*. 2001;17(12):1125-1130. PubMed PMID: 12530772.



29. Huang DB, *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli* is a cause of acute diarrheal illness: a meta-analysis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2006 Sep 1;43(5):556-563. PubMed PMID: 16886146.
30. Scavia G, *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with a foodborne outbreak of gastroenteritis. *Journal of medical microbiology*. 2008 Sep;57(Pt 9):1141-1146. PubMed PMID: 18719185.
31. Paschke C, *et al.* Controlled study on enteropathogens in travellers returning from the tropics with and without diarrhoea. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2011 Aug;17(8):1194-1200. PubMed PMID: 21054662.
32. Ewing WH. *Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae*. 4th ed. New York: Elsevier; 1986.
33. Conway PL. Microbial ecology of the human large intestine. In: Gibson GR, Macfarlane GT, eds *Human Colonic Bacteria: Role in Nutrition, Physiology and Pathology* Boca Raton, FL, USA: CRC Press 1995. p. 1–24.
34. Kaper JB, *et al.* Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature reviews Microbiology*. 2004 Feb;2(2):123-140. PubMed PMID: 15040260.
35. Samie A, *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli* in Venda, South Africa: distribution of virulence-related genes by multiplex polymerase chain reaction in stool samples of human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative individuals and primary school children. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2007 Jul;77(1):142-150. PubMed PMID: 17620646.
36. Steiner TS, *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli* produce intestinal inflammation and growth impairment and cause interleukin-8 release from intestinal epithelial cells. *The Journal of infectious diseases*. 1998 Jan;177(1):88-96. PubMed PMID: 9419174.
37. Mohamed JA, *et al.* Association of putative enteroaggregative *Escherichia coli* virulence genes and biofilm production in isolates from travelers to developing countries. *Journal of clinical microbiology*. 2007 Jan;45(1):121-126. PubMed PMID: 17093030. Pubmed Central PMCID: 1828990.



38. Adachi JA, *et al.* Enteric pathogens in Mexican sauces of popular restaurants in Guadalajara, Mexico, and Houston, Texas. *Annals of internal medicine.* 2002 Jun 18;136(12):884-887. PubMed PMID: 12069562.
39. Bhan MK, *et al.* Descriptive epidemiology of persistent diarrhoea among young children in rural northern India. *Bulletin of the World Health Organization.* 1989;67(3):281-288. PubMed PMID: 2670297. Pubmed Central PMCID: 2491248
40. Bhan MK, *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with persistent diarrhea in a cohort of rural children in India. *The Journal of infectious diseases.* 1989 Jun;159(6):1061-1064. PubMed PMID: 2656875.
41. Adachi JA, *et al.* Natural history of enteroaggregative and enterotoxigenic *Escherichia coli* infection among US travelers to Guadalajara, Mexico. *The Journal of infectious diseases.* 2002 Jun 1;185(11):1681-1683. PubMed PMID: 12023779.
42. Nataro JP, *et al.* Heterogeneity of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence demonstrated in volunteers. *The Journal of infectious diseases.* 1995 Feb;171(2):465-468. PubMed PMID: 7844392.
43. Oberhelman RA, *et al.* Colonization with enteroadherent, enterotoxigenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* among day-care center attendees in New Orleans, Louisiana. *The Pediatric infectious disease journal.* 1998 Dec;17(12):1159-1162. PubMed PMID: 9877367.
44. Nataro JP, *et al.* Diarrheagenic *Escherichia coli* infection in Baltimore, Maryland, and New Haven, Connecticut. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America.* 2006 Aug 15;43(4):402-407. PubMed PMID: 16838226.
45. Harrington SM, *et al.* Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. *FEMS microbiology letters.* 2006 Jan;254(1):12-18. PubMed PMID: 16451173.
46. Huang DB, *et al.* Virulence characteristics and the molecular epidemiology of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from travellers to developing countries. *Journal of medical microbiology.* 2007 Oct;56(Pt 10):1386-1392. PubMed PMID: 17893178.
47. Sobieszczanska BM, *et al.* Association of enteroaggregative *Escherichia coli* with irritable bowel syndrome. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the*



European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2007 Apr;13(4):404-407. PubMed PMID: 17359324.

48. Morin N, *et al.* Characterization of the AggR regulon in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infection and immunity*. 2013 Jan;81(1):122-132. PubMed PMID: 23090962. Pubmed Central PMCID: 3536136.

49. Jonsson R, *et al.* Novel aggregative adherence fimbria variant of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infection and immunity*. 2015 Apr;83(4):1396-1405. PubMed PMID: 25624357. Pubmed Central PMCID: 4363450.

50. Boll EJ, *et al.* The fimbriae of enteroaggregative *Escherichia coli* induce epithelial inflammation in vitro and in a human intestinal xenograft model. *The Journal of infectious diseases*. 2012 Sep 1;206(5):714-722. PubMed PMID: 22723643. Pubmed Central PMCID: 3491746.

51. Harrington SM, *et al.* Aggregative adherence fimbriae contribute to the inflammatory response of epithelial cells infected with enteroaggregative *Escherichia coli*. *Cellular microbiology*. 2005 Nov;7(11):1565-1578. PubMed PMID: 16207244.

52. Jønsson R. Assessment of enteroaggregative *Escherichia coli* adhesion and virulence [Ph.D. thesis]: Roskilde University/Statens Serum Institute, Denmark; 2017.

53. Sheikh J, *et al.* A novel dispersin protein in enteroaggregative *Escherichia coli*. *The Journal of clinical investigation*. 2002 Nov;110(9):1329-1337. PubMed PMID: 12417572. Pubmed Central PMCID: 151617.

54. Dudley EG, *et al.* Proteomic and microarray characterization of the AggR regulon identifies a pheU pathogenicity island in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*. 2006 Sep;61(5):1267-1282. PubMed PMID: 16925558.

55. Boisen N, *et al.* Short report: high prevalence of serine protease autotransporter cytotoxins among strains of enteroaggregative *Escherichia coli*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2009 Feb;80(2):294-301. PubMed PMID: 19190229. Pubmed Central PMCID: 2660206.

56. Dudley EG, *et al.* An IncII plasmid contributes to the adherence of the atypical enteroaggregative *Escherichia coli* strain C1096 to cultured cells and abiotic surfaces. *Infection and immunity*. 2006 Apr;74(4):2102-2114. PubMed PMID: 16552039. Pubmed Central PMCID: 1418932.



57. Jenkins C, *et al.* Detection of enteroaggregative *Escherichia coli* in faecal samples from patients in the community with diarrhoea. *Journal of medical microbiology*. 2006 Nov;55(Pt 11):1493-1497. PubMed PMID: 17030907.
58. Cerna JF, *et al.* Multiplex PCR for detection of three plasmid-borne genes of enteroaggregative *Escherichia coli* strains. *Journal of clinical microbiology*. 2003 May;41(5):2138-2140. PubMed PMID: 12734261. Pubmed Central PMCID: 154749.
59. Panchalingam S, *et al.* Diagnostic microbiologic methods in the GEMS-1 case/control study. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2012 Dec;55 Suppl 4:S294-302. PubMed PMID: 23169941. Pubmed Central PMCID: 3502308.
60. Baudry B, *et al.* A sensitive and specific DNA probe to identify enteroaggregative *Escherichia coli*, a recently discovered diarrheal pathogen. *The Journal of infectious diseases*. 1990 Jun;161(6):1249-1251. PubMed PMID: 2189007.
61. Nishi J, *et al.* The export of coat protein from enteroaggregative *Escherichia coli* by a specific ATP-binding cassette transporter system. *The Journal of biological chemistry*. 2003 Nov 14;278(46):45680-45689. PubMed PMID: 12933818.
62. Monteiro BT, *et al.* The dispersin-encoding gene (*aap*) is not restricted to enteroaggregative *Escherichia coli*. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2009 Sep;65(1):81-84. PubMed PMID: 19679242.
63. Lima IF, *et al.* Prevalence of enteroaggregative *Escherichia coli* and its virulence-related genes in a case-control study among children from north-eastern Brazil. *Journal of medical microbiology*. 2013 May;62(Pt 5):683-693. PubMed PMID: 23429698. Pubmed Central PMCID: 3709657.
64. Regua-Mangia AH, *et al.* Frequency and characteristics of diarrhoeagenic *Escherichia coli* strains isolated from children with and without diarrhoea in Rio de Janeiro, Brazil. *The Journal of infection*. 2004 Feb;48(2):161-167. PubMed PMID: 14720492.
65. Estrada-Garcia T, *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli* pathotype: a genetically heterogeneous emerging foodborne enteropathogen. *FEMS immunology and medical microbiology*. 2012 Dec;66(3):281-298. PubMed PMID: 22775224.



66. Huang DB, *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli*: an emerging pathogen in children. *Seminars in pediatric infectious diseases*. 2004 Oct;15(4):266-271. PubMed PMID: 15494951.
67. Jiang ZD, *et al.* Rate of occurrence and pathogenic effect of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors in international travelers. *Journal of clinical microbiology*. 2002 Nov;40(11):4185-4190. PubMed PMID: 12409395. Pubmed Central PMCID: 139678.
68. Kucharzik T, *et al.* Acute induction of human IL-8 production by intestinal epithelium triggers neutrophil infiltration without mucosal injury. *Gut*. 2005 Nov;54(11):1565-1572. PubMed PMID: 15987794. Pubmed Central PMCID: 1774758.
69. Jiang ZD, *et al.* Genetic susceptibility to enteroaggregative *Escherichia coli* diarrhea: polymorphism in the interleukin-8 promotor region. *The Journal of infectious diseases*. 2003 Aug 15;188(4):506-511. PubMed PMID: 12898436.
70. Khan MA, *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli* flagellin-induced interleukin-8 secretion requires Toll-like receptor 5-dependent p38 MAP kinase activation. *Immunology*. 2004 Aug;112(4):651-660. PubMed PMID: 15270737. Pubmed Central PMCID: 1782538.
71. Huang DB, *et al.* A review of an emerging enteric pathogen: enteroaggregative *Escherichia coli*. *Journal of medical microbiology*. 2006 Oct;55(Pt 10):1303-1311. PubMed PMID: 17005776.
72. WHO. Length/height-for-age, weight-for-age, weight-for-length, weight-for-height and body mass index-for-age. *Methods and development*. Department of Nutrition for Health and Development. 2006.
73. Boisen N, *et al.* New adhesin of enteroaggregative *Escherichia coli* related to the Afa/Dr/AAF family. *Infection and immunity*. 2008 Jul;76(7):3281-3292. PubMed PMID: 18443096. Pubmed Central PMCID: 2446688.
74. Pena R, *et al.* The effect of poverty, social inequity, and maternal education on infant mortality in Nicaragua, 1988-1993. *American journal of public health*. 2000 Jan;90(1):64-69. PubMed PMID: 10630139. Pubmed Central PMCID: 1446115.



13. Anexos

Anexo 1. Ficha de recolección de datos en visitas mensuales del proyecto SAGE

ID: _____

Código de Nombre: _____

Historia Natural, Inmunidad y transmisión de patrones por Sapovirus:
En una cohorte de Nacimiento de Nicaragua.

Visita mensual

1- **INTRODUZCA LA FECHA DE HOY:** (dd/mm/aaaa) ____ / ____ / _____

2- Hora: __: __

3- **INTRODUZCA EL NÚMERO DE VISITA PARA ESTE NIÑO(A):** _____

4- ¿Amamantó a su niño(a) ayer?

- Sí
 No
 No sabe / Se niega a responder

5- ¿En el último mes, el niño (a) ha recibido un diagnóstico de alguna enfermedad, incluyendo enfermedades infecciosas o crónicas?

- Sí: _____
 NO
 No sabe / Se niega a responder

6- ¿Qué animales viven en la casa?

- | | |
|--|--|
| <input type="radio"/> Ninguno | <input type="radio"/> Conejo |
| <input type="radio"/> Perro | <input type="radio"/> Loro o ave de compañía |
| <input type="radio"/> Gato | <input type="radio"/> Tortuga |
| <input type="radio"/> Gallina | <input type="radio"/> Ratones |
| <input type="radio"/> Cerdo | <input type="radio"/> Murciélagos |
| <input type="radio"/> Vaca | <input type="radio"/> Otros _____ |
| <input type="radio"/> Cabra o pelibuey | <input type="radio"/> No sabe / Se niega a responder |

7- ¿Se lava típicamente las manos antes o después de estas actividades?

- | | |
|---------------------------------|--|
| *Antes de salir a la calle | <input type="radio"/> SI <input type="radio"/> NO <input type="radio"/> No sé / Se niega a responder |
| *Antes de comer | <input type="radio"/> SI <input type="radio"/> NO <input type="radio"/> No sé / Se niega a responder |
| *Antes de preparar comidas | <input type="radio"/> SI <input type="radio"/> NO <input type="radio"/> No sé / Se niega a responder |
| *Después de ir al baño | <input type="radio"/> SI <input type="radio"/> NO <input type="radio"/> No sé / Se niega a responder |
| *Después de cambiar los pañales | <input type="radio"/> SI <input type="radio"/> NO <input type="radio"/> No sé / Se niega a responde |
| *Después de lavar la ropa | <input type="radio"/> SI <input type="radio"/> NO <input type="radio"/> No sé / Se niega a responder |

8- ¿Con qué frecuencia usa un desinfectante para manos a base de alcohol cuando se lava las manos?

- Nunca
 Raramente
 A veces
 Siempre
 No sabe/ Se niega a responder



- 9- ¿Usted, o alguien de su casa, hace algo a su agua para que sea más seguro beber?
- SÍ (especifique): _____
- NO
- No sabe / Se niega a responder
- 10- ¿Cuántos inodoros tiene su casa? _____ (número)
- No sabe / Se niega a responder
- 11- ¿Cuántas letrinas tiene su casa? _____ (número)
- No sabe / Se niega a responder
- 12- En los últimos 7 días, ¿su niño (a) comió algún alimento fuera de su casa?
- SÍ
- NO
- No sabe / Se niega a responder
- 13- En los últimos 7 días, ¿su niño (a) tuvo contacto con una persona que vive DENTRO DE SU CASA que estaba sufriendo de DIARREA?
- SÍ
- NO
- No sabe / Se niega a responder
- 14- En los últimos 7 días, ¿Su niño (a) tuvo contacto con una persona que vive FUERA DE SU CASA que estaba sufriendo de DIARREA?
- SÍ
- NO
- No sabe / Se niega a responder
- 15- ¿Ha tenido el niño(a) diarrea en los últimos 7 días?
- SÍ --- *Complete el formulario para diarrea y/o vómito*
- NO
- No sabe / Se niega a responder
- 16- ¿Ha vomitado su niño (a) (no sólo regurgitación después de comer) en los últimos 7 días?
- SÍ --- *Complete el formulario para diarrea y/o vómito*
- NO
- No sabe / Se niega a responder

MEDICIONES ANTROPOMÉTRICAS

***PESE AL NIÑO(A) DOS VECES. SI LOS RESULTADOS SON DIFERENTES POR MÁS DE 100 GRAMOS, PESE AL NIÑO(A) UNA TERCERA VEZ, Y REGISTRE CADA PESO* INTRODUCZA EL PESO DEL NIÑO (SÓLO PAÑALES LIMPIOS):**

Primera vez: _____ g Peso en GRAMOS

Segunda vez: _____ g

Tercera vez: _____ g (SI LA DIFERENCIA ES MÁS DE 100g)



MIDE AL NIÑO(A) DOS VECES. SI LOS RESULTADOS SON DIFERENTES POR MAS QUE 1 CM, MIDE AL NIÑO(A) UNA TERCERA VEZ, Y REGISTRE CADA PESO.

INTRODUZCA LA TALLA (LONGITUD) DEL NIÑO(A) (<24 meses):

Primera vez: _____ cm Longitud en CM

Segunda vez: _____ cm

Tercera vez: _____ cm (SI LA DIFERENCIA ES MAS DE 1 CM)

RECOLECTE MUESTRAS DE HECES:

Muestra de heces del niño (a) (fecha) _____ (hora) _____

Esta muestra no se obtuvo (especifique) _____



Anexo 2. Formulario para episodio de diarrea y vómito

ID: _____

Código de Nombre: _____

Historia Natural, Inmunidad y transmisión de patrones por Sapovirus: En una cohorte de Nacimiento de Nicaragua.

Formulario de diarrea y vómito

1- INTRODUZCA LA FECHA DE HOY: (dd/mm/aaaa) ___ / ___ / _____

2- Hora: __: __

3- INTRODUZCA EL NÚMERO DE VISITA PARA ESTE NIÑO(A): _____

4- ¿El niño(a) ha tenido diarrea y/o vómito en los últimos 7 días? (MARQUE TODOS QUE SE APLICAN)

- Diarrea
 Vómito

5- ¿Cuál es la fecha en que comenzó la diarrea?

Nuevo episodio: ___ / ___ / _____ (dd / mm / aaaa)

6- ¿Cuál fue el número máximo de deposiciones por período de 24 horas que experimentó el niño (a) desde que comenzaron los síntomas?

- _____ (número)
 No sabe / se negó a responder

7- ¿Ha tenido su niño(a) fiebre desde que comenzaron los síntomas de diarrea y/o vómito?

- SÍ
 NO
 No sé / Se niega a responder

8- ¿Ha tenido su niña/a sangre visible en las heces desde que comenzaron los síntomas?

- SÍ
 NO
 No sé / Se niega a responder

9- ¿Recibió el niño (a) líquido intravenoso (líquido a través de la vena) desde que comenzaron los síntomas?

- SÍ
 NO
 No sabe / Se niega a responder

10- ¿Cuántos días recibió el niño (a) líquido intravenoso? _____ (número total de días)

11- ¿El niño (a) fue hospitalizado desde que comenzaron los síntomas?

- SÍ
 NO
 No sabe / Se niega a responder



12- En los últimos 7 días, ¿Comió su niño alguna fruta o verdura fresca o sin cocinar?

- SÍ
 NO
 No sabe / Se niega a responder

13- En los últimos 7 días, ¿su niño (a) comió algún alimento fuera de su casa?

- SÍ
 NO
 No sabe / Se niega a responder

14- En los últimos 7 días, ¿su niño (a) tuvo contacto con una persona que vive DENTRO DE SU CASA que estaba sufriendo de DIARREA?

- SÍ
 NO
 No sabe / Se niega a responder

15- En los últimos 7 días, ¿Su niño (a) tuvo contacto con una persona que vive FUERA DE SU CASA que estaba sufriendo de DIARREA?

- SÍ
 NO
 No sabe / Se niega a responder

16- En los últimos 7 días, ¿se ha interrumpido el abastecimiento de agua de su casa?

- SÍ
 NO
 No sabe / Se niega a responder

RECOLECTE MUESTRAS DE HECES:

Muestra de heces del niño (a) (fecha) _____ (hora) _____

Esta muestra no se obtuvo (especifique) _____



Anexo 3. Acta de aprobación del comité de ética para investigaciones biomédicas (CEIB).

**Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua**
Facultad de Ciencias Médicas
UNAN - León

Comité de Ética para Investigaciones Biomédicas (CEIB)
"Dr. Uriel Guevara Guerrero"
FWA00004523 / IRB00003342

León, 18 de enero de 2017

ACTA No. 2

Miembros Fundadores

- Dr. Uriel Guevara Guerrero
Médico Patólogo
- Dr. Jaime Granera Soto
Médico y Sacerdote
- Dra. Nubia Pacheco Solís
Médico y Dermatóloga

Comité Ejecutivo

- Dra. Nubia Pacheco Solís
Presidenta
- Dr. Efrén Castellón C.
Vice - Presidente
- Dr. Orlando Morales N.
Secretario

Miembros alternos

- Dr. Jorge Alemán Pineda
- MSc. Irella Romero S.
- Dr. William Ugarte

Dra. Sylvia Becker-Dreps
Dr. Filemón Bucardo
Investigadores
Sus Manos

Estimados Doctores:

El CEIB les comunica que recibió su trabajo de Investigación para que sea analizado por este Comité, titulado: **"Historia natural, inmunidad y patrones de transmisión de sapovirus en una cohorte de niños nicaragüenses, seguidos desde el nacimiento"**. Después de haber efectuado dicha revisión se determina lo siguiente: **Se aprueba la conducción de dicha Investigación, basados en que cumple con los principios delineados en la Declaración de Helsinki y reúne los principios éticos básicos.**

Como Comité de Ética, valoramos muy positivamente la importancia de este trabajo y esperamos que sus resultados sean positivos. Copia de esta carta debe estar presente en el Protocolo e informe final.

Sin otro particular, nos es grato suscribirnos.

Atentamente,

DRA. NUBIA A. PACHECO SOLÍS
Presidenta del CEIB
Facultad de CC. MM.

DR. ORLANDO MORALES N.
Secretario del CEIB
Facultad de CC. MM.

DRA. MERCEDES CACERES, PhD
Vice-Decano
Facultad de Ciencias Médicas

Cc: Archivo
NPS/rhl

A la libertad por la Universidad

Fundado en la Facultad de Ciencias Médicas UNAN - León Nicaragua Abril de 1995 comiteticauanleon@gmail.com Telf: 2311-4675

Expiration data 13/03/2017 IRB00003342



Anexo 4. Listas de valores estandarizados en población sana

Table 19 Length-for-age for boys, age in years and months (continued)

Year:Month	Month	L	M	S	SD	Z-scores (length in cm)						
						-3 SD	-2 SD	-1 SD	Median	1 SD	2 SD	3 SD
0: 0	0	1	49.8842	0.03795	1.8931	44.2	46.1	48.0	49.9	51.8	53.7	55.6
0: 1	1	1	54.7244	0.03557	1.9465	48.9	50.8	52.8	54.7	56.7	58.6	60.6
0: 2	2	1	58.4249	0.03424	2.0005	52.4	54.4	56.4	58.4	60.4	62.4	64.4
0: 3	3	1	61.4292	0.03328	2.0444	55.3	57.3	59.4	61.4	63.5	65.5	67.6
0: 4	4	1	63.8860	0.03257	2.0808	57.6	59.7	61.8	63.9	66.0	68.0	70.1
0: 5	5	1	65.9026	0.03204	2.1115	59.6	61.7	63.8	65.9	68.0	70.1	72.2
0: 6	6	1	67.6236	0.03165	2.1403	61.2	63.3	65.5	67.6	69.8	71.9	74.0
0: 7	7	1	69.1645	0.03139	2.1711	62.7	64.8	67.0	69.2	71.3	73.5	75.7
0: 8	8	1	70.5994	0.03124	2.2055	64.0	66.2	68.4	70.6	72.8	75.0	77.2
0: 9	9	1	71.9687	0.03117	2.2433	65.2	67.5	69.7	72.0	74.2	76.5	78.7
0:10	10	1	73.2812	0.03118	2.2849	66.4	68.7	71.0	73.3	75.6	77.9	80.1
0:11	11	1	74.5388	0.03125	2.3293	67.6	69.9	72.2	74.5	76.9	79.2	81.5
1: 0	12	1	75.7488	0.03137	2.3762	68.6	71.0	73.4	75.7	78.1	80.5	82.9
1: 1	13	1	76.9186	0.03154	2.4260	69.6	72.1	74.5	76.9	79.3	81.8	84.2
1: 2	14	1	78.0497	0.03174	2.4773	70.6	73.1	75.6	78.0	80.5	83.0	85.5
1: 3	15	1	79.1458	0.03197	2.5303	71.6	74.1	76.6	79.1	81.7	84.2	86.7
1: 4	16	1	80.2113	0.03222	2.5844	72.5	75.0	77.6	80.2	82.8	85.4	88.0
1: 5	17	1	81.2487	0.03250	2.6406	73.3	76.0	78.6	81.2	83.9	86.5	89.2
1: 6	18	1	82.2587	0.03279	2.6973	74.2	76.9	79.6	82.3	85.0	87.7	90.4
1: 7	19	1	83.2418	0.03310	2.7553	75.0	77.7	80.5	83.2	86.0	88.8	91.5
1: 8	20	1	84.1996	0.03342	2.8140	75.8	78.6	81.4	84.2	87.0	89.8	92.6
1: 9	21	1	85.1348	0.03376	2.8742	76.5	79.4	82.3	85.1	88.0	90.9	93.8
1:10	22	1	86.0477	0.03410	2.9342	77.2	80.2	83.1	86.0	89.0	91.9	94.9
1:11	23	1	86.9410	0.03445	2.9951	78.0	81.0	83.9	86.9	89.9	92.9	95.9
2: 0	24	1	87.8161	0.03479	3.0551	78.7	81.7	84.8	87.8	90.9	93.9	97.0



Table 28 Length-for-age for girls, age in years and months (continued)

Year:Month	Month	L	M	S	SD	Z-scores (length in cm)						
						-3 SD	-2 SD	-1 SD	Median	1 SD	2 SD	3 SD
0: 0	0	1	49.1477	0.03790	1.8627	43.6	45.4	47.3	49.1	51.0	52.9	54.7
0: 1	1	1	53.6872	0.03640	1.9542	47.8	49.8	51.7	53.7	55.6	57.6	59.5
0: 2	2	1	57.0673	0.03568	2.0362	51.0	53.0	55.0	57.1	59.1	61.1	63.2
0: 3	3	1	59.8029	0.03520	2.1051	53.5	55.6	57.7	59.8	61.9	64.0	66.1
0: 4	4	1	62.0899	0.03486	2.1645	55.6	57.8	59.9	62.1	64.3	66.4	68.6
0: 5	5	1	64.0301	0.03463	2.2174	57.4	59.6	61.8	64.0	66.2	68.5	70.7
0: 6	6	1	65.7311	0.03448	2.2664	58.9	61.2	63.5	65.7	68.0	70.3	72.5
0: 7	7	1	67.2873	0.03441	2.3154	60.3	62.7	65.0	67.3	69.6	71.9	74.2
0: 8	8	1	68.7498	0.03440	2.3650	61.7	64.0	66.4	68.7	71.1	73.5	75.8
0: 9	9	1	70.1435	0.03444	2.4157	62.9	65.3	67.7	70.1	72.6	75.0	77.4
0:10	10	1	71.4818	0.03452	2.4676	64.1	66.5	69.0	71.5	73.9	76.4	78.9
0:11	11	1	72.7710	0.03464	2.5208	65.2	67.7	70.3	72.8	75.3	77.8	80.3
1: 0	0	1	74.0150	0.03479	2.5750	66.3	68.9	71.4	74.0	76.6	79.2	81.7
1: 1	1	1	75.2176	0.03496	2.6296	67.3	70.0	72.6	75.2	77.8	80.5	83.1
1: 2	2	1	76.3817	0.03514	2.6841	68.3	71.0	73.7	76.4	79.1	81.7	84.4
1: 3	3	1	77.5099	0.03534	2.7392	69.3	72.0	74.8	77.5	80.2	83.0	85.7
1: 4	4	1	78.6055	0.03555	2.7944	70.2	73.0	75.8	78.6	81.4	84.2	87.0
1: 5	5	1	79.6710	0.03576	2.8490	71.1	74.0	76.8	79.7	82.5	85.4	88.2
1: 6	6	1	80.7079	0.03598	2.9039	72.0	74.9	77.8	80.7	83.6	86.5	89.4
1: 7	7	1	81.7182	0.03620	2.9582	72.8	75.8	78.8	81.7	84.7	87.6	90.6
1: 8	8	1	82.7036	0.03643	3.0129	73.7	76.7	79.7	82.7	85.7	88.7	91.7
1: 9	9	1	83.6654	0.03666	3.0672	74.5	77.5	80.6	83.7	86.7	89.8	92.9
1:10	22	1	84.6040	0.03688	3.1202	75.2	78.4	81.5	84.6	87.7	90.8	94.0
1:11	23	1	85.5202	0.03711	3.1737	76.0	79.2	82.3	85.5	88.7	91.9	95.0
2: 0	24	1	86.4153	0.03734	3.2267	76.7	80.0	83.2	86.4	89.6	92.9	96.1



Table 39 Weight-for-age for boys, age in years and months

Year: Month	Month	L	M	S	1st	3rd	5th	15th	25th	50th	75th	Percentiles (weight in kg)						
												85th	95th	97th	99th			
0: 0	0	0.3487	3.3464	0.14602	2.3	2.5	2.6	2.9	3.0	3.3	3.7	3.9	4.2	4.3	4.6			
0: 1	1	0.2297	4.4709	0.13395	3.2	3.4	3.6	3.9	4.1	4.5	4.9	5.1	5.5	5.7	6.0			
0: 2	2	0.1970	5.5675	0.12385	4.1	4.4	4.5	4.9	5.1	5.6	6.0	6.3	6.8	7.0	7.4			
0: 3	3	0.1738	6.3762	0.11727	4.8	5.1	5.2	5.6	5.9	6.4	6.9	7.2	7.7	7.9	8.3			
0: 4	4	0.1553	7.0023	0.11316	5.4	5.6	5.8	6.2	6.5	7.0	7.6	7.9	8.4	8.6	9.1			
0: 5	5	0.1395	7.5105	0.11080	5.8	6.1	6.2	6.7	7.0	7.5	8.1	8.4	9.0	9.2	9.7			
0: 6	6	0.1257	7.9340	0.10958	6.1	6.4	6.6	7.1	7.4	7.9	8.5	8.9	9.5	9.7	10.2			
0: 7	7	0.1134	8.2970	0.10902	6.4	6.7	6.9	7.4	7.7	8.3	8.9	9.3	9.9	10.2	10.7			
0: 8	8	0.1021	8.6151	0.10882	6.7	7.0	7.2	7.7	8.0	8.6	9.3	9.6	10.3	10.5	11.1			
0: 9	9	0.0917	8.9014	0.10881	6.9	7.2	7.4	7.9	8.3	8.9	9.6	10.0	10.6	10.9	11.4			
0:10	10	0.0820	9.1649	0.10891	7.1	7.5	7.7	8.2	8.5	9.2	9.9	10.3	10.9	11.2	11.8			
0:11	11	0.0730	9.4122	0.10906	7.3	7.7	7.9	8.4	8.7	9.4	10.1	10.5	11.2	11.5	12.1			
1: 0	12	0.0644	9.6479	0.10925	7.5	7.8	8.1	8.6	9.0	9.6	10.4	10.8	11.5	11.8	12.4			
1: 1	13	0.0563	9.8749	0.10949	7.6	8.0	8.2	8.8	9.2	9.9	10.6	11.1	11.8	12.1	12.7			
1: 2	14	0.0487	10.0953	0.10976	7.8	8.2	8.4	9.0	9.4	10.1	10.9	11.3	12.1	12.4	13.0			
1: 3	15	0.0413	10.3108	0.11007	8.0	8.4	8.6	9.2	9.6	10.3	11.1	11.6	12.3	12.7	13.3			
1: 4	16	0.0343	10.5228	0.11041	8.1	8.5	8.8	9.4	9.8	10.5	11.3	11.8	12.6	12.9	13.6			
1: 5	17	0.0275	10.7319	0.11079	8.3	8.7	8.9	9.6	10.0	10.7	11.6	12.0	12.9	13.2	13.9			
1: 6	18	0.0211	10.9385	0.11119	8.4	8.9	9.1	9.7	10.1	10.9	11.8	12.3	13.1	13.5	14.2			
1: 7	19	0.0148	11.1430	0.11164	8.6	9.0	9.3	9.9	10.3	11.1	12.0	12.5	13.4	13.7	14.4			
1: 8	20	0.0087	11.3462	0.11211	8.7	9.2	9.4	10.1	10.5	11.3	12.2	12.7	13.6	14.0	14.7			
1: 9	21	0.0029	11.5486	0.11261	8.9	9.3	9.6	10.3	10.7	11.5	12.5	13.0	13.9	14.3	15.0			
1:10	22	-0.0028	11.7504	0.11314	9.0	9.5	9.8	10.5	10.9	11.8	12.7	13.2	14.2	14.5	15.3			
1:11	23	-0.0083	11.9514	0.11369	9.2	9.7	9.9	10.6	11.1	12.0	12.9	13.4	14.4	14.8	15.6			
2: 0	24	-0.0137	12.1515	0.11426	9.3	9.8	10.1	10.8	11.3	12.2	13.1	13.7	14.7	15.1	15.9			



Table 50 Weight-for-age for girls, age in years and months

Year: Month	Month	L	M	S	1st	3rd	5th	15th	25th	50th	75th	Percentiles (weight in kg)						
												85th	95th	97th	99th			
0: 0	0	0.3809	3.2322	0.14171	2.3	2.4	2.5	2.8	2.9	3.2	3.6	3.7	4.0	4.2	4.4			
0: 1	1	0.1714	4.1873	0.13724	3.0	3.2	3.3	3.6	3.8	4.2	4.6	4.8	5.2	5.4	5.7			
0: 2	2	0.0962	5.1282	0.13000	3.8	4.0	4.1	4.5	4.7	5.1	5.6	5.9	6.3	6.5	6.9			
0: 3	3	0.0402	5.8458	0.12619	4.4	4.6	4.7	5.1	5.4	5.8	6.4	6.7	7.2	7.4	7.8			
0: 4	4	-0.0050	6.4237	0.12402	4.8	5.1	5.2	5.6	5.9	6.4	7.0	7.3	7.9	8.1	8.6			
0: 5	5	-0.0430	6.8985	0.12274	5.2	5.5	5.6	6.1	6.4	6.9	7.5	7.8	8.4	8.7	9.2			
0: 6	6	-0.0756	7.2970	0.12204	5.5	5.8	6.0	6.4	6.7	7.3	7.9	8.3	8.9	9.2	9.7			
0: 7	7	-0.1039	7.6422	0.12178	5.8	6.1	6.3	6.7	7.0	7.6	8.3	8.7	9.4	9.6	10.2			
0: 8	8	-0.1288	7.9487	0.12181	6.0	6.3	6.5	7.0	7.3	7.9	8.6	9.0	9.7	10.0	10.6			
0: 9	9	-0.1507	8.2254	0.12199	6.2	6.6	6.8	7.3	7.6	8.2	8.9	9.3	10.1	10.4	11.0			
0:10	10	-0.1700	8.4800	0.12223	6.4	6.8	7.0	7.5	7.8	8.5	9.2	9.6	10.4	10.7	11.3			
0:11	11	-0.1872	8.7192	0.12247	6.6	7.0	7.2	7.7	8.0	8.7	9.5	9.9	10.7	11.0	11.7			
1: 0	12	-0.2024	8.9481	0.12268	6.8	7.1	7.3	7.9	8.2	8.9	9.7	10.2	11.0	11.3	12.0			
1: 1	13	-0.2158	9.1699	0.12283	6.9	7.3	7.5	8.1	8.4	9.2	10.0	10.4	11.3	11.6	12.3			
1: 2	14	-0.2278	9.3870	0.12294	7.1	7.5	7.7	8.3	8.6	9.4	10.2	10.7	11.5	11.9	12.6			
1: 3	15	-0.2384	9.6008	0.12299	7.3	7.7	7.9	8.5	8.8	9.6	10.4	10.9	11.8	12.2	12.9			
1: 4	16	-0.2478	9.8124	0.12303	7.4	7.8	8.1	8.7	9.0	9.8	10.7	11.2	12.1	12.5	13.2			
1: 5	17	-0.2562	10.0226	0.12306	7.6	8.0	8.2	8.8	9.2	10.0	10.9	11.4	12.3	12.7	13.5			
1: 6	18	-0.2637	10.2315	0.12309	7.8	8.2	8.4	9.0	9.4	10.2	11.1	11.6	12.6	13.0	13.8			
1: 7	19	-0.2703	10.4393	0.12315	7.9	8.3	8.6	9.2	9.6	10.4	11.4	11.9	12.9	13.3	14.1			
1: 8	20	-0.2762	10.6464	0.12323	8.1	8.5	8.7	9.4	9.8	10.6	11.6	12.1	13.1	13.5	14.4			
1: 9	21	-0.2815	10.8534	0.12335	8.2	8.7	8.9	9.6	10.0	10.9	11.8	12.4	13.4	13.8	14.6			
1:10	22	-0.2862	11.0608	0.12350	8.4	8.8	9.1	9.8	10.2	11.1	12.0	12.6	13.6	14.1	14.9			
1:11	23	-0.2903	11.2688	0.12369	8.5	9.0	9.2	9.9	10.4	11.3	12.3	12.8	13.9	14.3	15.2			
2: 0	24	-0.2941	11.4775	0.12390	8.7	9.2	9.4	10.1	10.6	11.5	12.5	13.1	14.2	14.6	15.5			



Table 57 Weight-for-length for boys (continued)

Length (cm)	Z-scores (weight in kg)										
	L	M	S	-3 SD	-2 SD	-1 SD	Median	1 SD	2 SD	3 SD	
45.0	-0.3521	2.4410	0.09182	1.9	2.0	2.2	2.4	2.7	3.0	3.3	
45.5	-0.3521	2.5244	0.09153	1.9	2.1	2.3	2.5	2.8	3.1	3.4	
46.0	-0.3521	2.6077	0.09124	2.0	2.2	2.4	2.6	2.9	3.1	3.5	
46.5	-0.3521	2.6913	0.09094	2.1	2.3	2.5	2.7	3.0	3.2	3.6	
47.0	-0.3521	2.7755	0.09065	2.1	2.3	2.5	2.8	3.0	3.3	3.7	
47.5	-0.3521	2.8609	0.09036	2.2	2.4	2.6	2.9	3.1	3.4	3.8	
48.0	-0.3521	2.9480	0.09007	2.3	2.5	2.7	2.9	3.2	3.6	3.9	
48.5	-0.3521	3.0377	0.08977	2.3	2.6	2.8	3.0	3.3	3.7	4.0	
49.0	-0.3521	3.1308	0.08948	2.4	2.6	2.9	3.1	3.4	3.8	4.2	
49.5	-0.3521	3.2276	0.08919	2.5	2.7	3.0	3.2	3.5	3.9	4.3	
50.0	-0.3521	3.3278	0.08890	2.6	2.8	3.0	3.3	3.6	4.0	4.4	
50.5	-0.3521	3.4311	0.08861	2.7	2.9	3.1	3.4	3.8	4.1	4.5	
51.0	-0.3521	3.5376	0.08831	2.7	3.0	3.2	3.5	3.9	4.2	4.7	
51.5	-0.3521	3.6477	0.08801	2.8	3.1	3.3	3.6	4.0	4.4	4.8	
52.0	-0.3521	3.7620	0.08771	2.9	3.2	3.5	3.8	4.1	4.5	5.0	
52.5	-0.3521	3.8814	0.08741	3.0	3.3	3.6	3.9	4.2	4.6	5.1	
53.0	-0.3521	4.0060	0.08711	3.1	3.4	3.7	4.0	4.4	4.8	5.3	
53.5	-0.3521	4.1354	0.08681	3.2	3.5	3.8	4.1	4.5	4.9	5.4	
54.0	-0.3521	4.2693	0.08651	3.3	3.6	3.9	4.3	4.7	5.1	5.6	
54.5	-0.3521	4.4066	0.08621	3.4	3.7	4.0	4.4	4.8	5.3	5.8	
55.0	-0.3521	4.5467	0.08592	3.6	3.8	4.2	4.5	5.0	5.4	6.0	
55.5	-0.3521	4.6892	0.08563	3.7	4.0	4.3	4.7	5.1	5.6	6.1	
56.0	-0.3521	4.8338	0.08535	3.8	4.1	4.4	4.8	5.3	5.8	6.3	
56.5	-0.3521	4.9796	0.08507	3.9	4.2	4.6	5.0	5.4	5.9	6.5	
57.0	-0.3521	5.1259	0.08481	4.0	4.3	4.7	5.1	5.6	6.1	6.7	
57.5	-0.3521	5.2721	0.08455	4.1	4.5	4.9	5.3	5.7	6.3	6.9	
58.0	-0.3521	5.4180	0.08430	4.3	4.6	5.0	5.4	5.9	6.4	7.1	
58.5	-0.3521	5.5632	0.08406	4.4	4.7	5.1	5.6	6.1	6.6	7.2	
59.0	-0.3521	5.7074	0.08383	4.5	4.8	5.3	5.7	6.2	6.8	7.4	
59.5	-0.3521	5.8501	0.08362	4.6	5.0	5.4	5.9	6.4	7.0	7.6	



Table 57 Weight-for-length for boys (continued)

Length (cm)	Z-scores (weight in kg)									
	L	M	S	-3SD	-2SD	-1SD	Median	1SD	2SD	3SD
60.0	-0.3521	5.9907	0.08342	4.7	5.1	5.5	6.0	6.5	7.1	7.8
60.5	-0.3521	6.1284	0.08324	4.8	5.2	5.6	6.1	6.7	7.3	8.0
61.0	-0.3521	6.2632	0.08308	4.9	5.3	5.8	6.3	6.8	7.4	8.1
61.5	-0.3521	6.3954	0.08292	5.0	5.4	5.9	6.4	7.0	7.6	8.3
62.0	-0.3521	6.5251	0.08279	5.1	5.6	6.0	6.5	7.1	7.7	8.5
62.5	-0.3521	6.6527	0.08266	5.2	5.7	6.1	6.7	7.2	7.9	8.6
63.0	-0.3521	6.7786	0.08255	5.3	5.8	6.2	6.8	7.4	8.0	8.8
63.5	-0.3521	6.9028	0.08245	5.4	5.9	6.4	6.9	7.5	8.2	8.9
64.0	-0.3521	7.0255	0.08236	5.5	6.0	6.5	7.0	7.6	8.3	9.1
64.5	-0.3521	7.1467	0.08229	5.6	6.1	6.6	7.1	7.8	8.5	9.3
65.0	-0.3521	7.2666	0.08223	5.7	6.2	6.7	7.3	7.9	8.6	9.4
65.5	-0.3521	7.3854	0.08218	5.8	6.3	6.8	7.4	8.0	8.7	9.6
66.0	-0.3521	7.5034	0.08215	5.9	6.4	6.9	7.5	8.2	8.9	9.7
66.5	-0.3521	7.6206	0.08213	6.0	6.5	7.0	7.6	8.3	9.0	9.9
67.0	-0.3521	7.7370	0.08212	6.1	6.6	7.1	7.7	8.4	9.2	10.0
67.5	-0.3521	7.8526	0.08212	6.2	6.7	7.2	7.9	8.5	9.3	10.2
68.0	-0.3521	7.9674	0.08214	6.3	6.8	7.3	8.0	8.7	9.4	10.3
68.5	-0.3521	8.0816	0.08216	6.4	6.9	7.5	8.1	8.8	9.6	10.5
69.0	-0.3521	8.1955	0.08219	6.5	7.0	7.6	8.2	8.9	9.7	10.6
69.5	-0.3521	8.3092	0.08224	6.6	7.1	7.7	8.3	9.0	9.8	10.8
70.0	-0.3521	8.4227	0.08229	6.6	7.2	7.8	8.4	9.2	10.0	10.9
70.5	-0.3521	8.5358	0.08235	6.7	7.3	7.9	8.5	9.3	10.1	11.1
71.0	-0.3521	8.6480	0.08241	6.8	7.4	8.0	8.6	9.4	10.2	11.2
71.5	-0.3521	8.7594	0.08248	6.9	7.5	8.1	8.8	9.5	10.4	11.3
72.0	-0.3521	8.8697	0.08254	7.0	7.6	8.2	8.9	9.6	10.5	11.5
72.5	-0.3521	8.9788	0.08262	7.1	7.6	8.3	9.0	9.8	10.6	11.6
73.0	-0.3521	9.0865	0.08269	7.2	7.7	8.4	9.1	9.9	10.8	11.8
73.5	-0.3521	9.1927	0.08276	7.2	7.8	8.5	9.2	10.0	10.9	11.9
74.0	-0.3521	9.2974	0.08283	7.3	7.9	8.6	9.3	10.1	11.0	12.1
74.5	-0.3521	9.4010	0.08289	7.4	8.0	8.7	9.4	10.2	11.2	12.2



Table 66 Weight-for-length for girls (continued)

Length (cm)	Z-scores (weight in kg)									
	L	M	S	-3 SD	-2 SD	-1 SD	Median	1 SD	2 SD	3 SD
45.0	-0.3833	2.4607	0.09029	1.9	2.1	2.3	2.5	2.7	3.0	3.3
45.5	-0.3833	2.5457	0.09033	2.0	2.1	2.3	2.5	2.8	3.1	3.4
46.0	-0.3833	2.6306	0.09037	2.0	2.2	2.4	2.6	2.9	3.2	3.5
46.5	-0.3833	2.7155	0.09040	2.1	2.3	2.5	2.7	3.0	3.3	3.6
47.0	-0.3833	2.8007	0.09044	2.2	2.4	2.6	2.8	3.1	3.4	3.7
47.5	-0.3833	2.8867	0.09048	2.2	2.4	2.6	2.9	3.2	3.5	3.8
48.0	-0.3833	2.9741	0.09052	2.3	2.5	2.7	3.0	3.3	3.6	4.0
48.5	-0.3833	3.0636	0.09056	2.4	2.6	2.8	3.1	3.4	3.7	4.1
49.0	-0.3833	3.1560	0.09060	2.4	2.6	2.9	3.2	3.5	3.8	4.2
49.5	-0.3833	3.2520	0.09064	2.5	2.7	3.0	3.3	3.6	3.9	4.3
50.0	-0.3833	3.3518	0.09068	2.6	2.8	3.1	3.4	3.7	4.0	4.5
50.5	-0.3833	3.4557	0.09072	2.7	2.9	3.2	3.5	3.8	4.2	4.6
51.0	-0.3833	3.5636	0.09076	2.8	3.0	3.3	3.6	3.9	4.3	4.8
51.5	-0.3833	3.6754	0.09080	2.8	3.1	3.4	3.7	4.0	4.4	4.9
52.0	-0.3833	3.7911	0.09085	2.9	3.2	3.5	3.8	4.2	4.6	5.1
52.5	-0.3833	3.9105	0.09089	3.0	3.3	3.6	3.9	4.3	4.7	5.2
53.0	-0.3833	4.0332	0.09093	3.1	3.4	3.7	4.0	4.4	4.9	5.4
53.5	-0.3833	4.1591	0.09098	3.2	3.5	3.8	4.2	4.6	5.0	5.5
54.0	-0.3833	4.2875	0.09102	3.3	3.6	3.9	4.3	4.7	5.2	5.7
54.5	-0.3833	4.4179	0.09106	3.4	3.7	4.0	4.4	4.8	5.3	5.9
55.0	-0.3833	4.5498	0.09110	3.5	3.8	4.2	4.5	5.0	5.5	6.1
55.5	-0.3833	4.6827	0.09114	3.6	3.9	4.3	4.7	5.1	5.7	6.3
56.0	-0.3833	4.8162	0.09118	3.7	4.0	4.4	4.8	5.3	5.8	6.4
56.5	-0.3833	4.9500	0.09121	3.8	4.1	4.5	5.0	5.4	6.0	6.6
57.0	-0.3833	5.0837	0.09125	3.9	4.3	4.6	5.1	5.6	6.1	6.8
57.5	-0.3833	5.2173	0.09128	4.0	4.4	4.8	5.2	5.7	6.3	7.0
58.0	-0.3833	5.3507	0.09130	4.1	4.5	4.9	5.4	5.9	6.5	7.1
58.5	-0.3833	5.4834	0.09132	4.2	4.6	5.0	5.5	6.0	6.6	7.3
59.0	-0.3833	5.6151	0.09134	4.3	4.7	5.1	5.6	6.2	6.8	7.5
59.5	-0.3833	5.7454	0.09135	4.4	4.8	5.3	5.7	6.3	6.9	7.7



Table 66 Weight-for-length for girls (continued)

Length (cm)	Z-scores (weight in kg)									
	L	M	S	-3SD	-2SD	-1SD	Median	1SD	2SD	3SD
60.0	-0.3833	5.8742	0.09136	4.5	4.9	5.4	5.9	6.4	7.1	7.8
60.5	-0.3833	6.0014	0.09137	4.6	5.0	5.5	6.0	6.6	7.3	8.0
61.0	-0.3833	6.1270	0.09137	4.7	5.1	5.6	6.1	6.7	7.4	8.2
61.5	-0.3833	6.2511	0.09136	4.8	5.2	5.7	6.3	6.9	7.6	8.4
62.0	-0.3833	6.3738	0.09135	4.9	5.3	5.8	6.4	7.0	7.7	8.5
62.5	-0.3833	6.4948	0.09133	5.0	5.4	5.9	6.5	7.1	7.8	8.7
63.0	-0.3833	6.6144	0.09131	5.1	5.5	6.0	6.6	7.3	8.0	8.8
63.5	-0.3833	6.7328	0.09129	5.2	5.6	6.2	6.7	7.4	8.1	9.0
64.0	-0.3833	6.8501	0.09126	5.3	5.7	6.3	6.9	7.5	8.3	9.1
64.5	-0.3833	6.9662	0.09123	5.4	5.8	6.4	7.0	7.6	8.4	9.3
65.0	-0.3833	7.0812	0.09119	5.5	5.9	6.5	7.1	7.8	8.6	9.5
65.5	-0.3833	7.1950	0.09115	5.5	6.0	6.6	7.2	7.9	8.7	9.6
66.0	-0.3833	7.3076	0.09110	5.6	6.1	6.7	7.3	8.0	8.8	9.8
66.5	-0.3833	7.4189	0.09106	5.7	6.2	6.8	7.4	8.1	9.0	9.9
67.0	-0.3833	7.5288	0.09101	5.8	6.3	6.9	7.5	8.3	9.1	10.0
67.5	-0.3833	7.6375	0.09096	5.9	6.4	7.0	7.6	8.4	9.2	10.2
68.0	-0.3833	7.7448	0.09090	6.0	6.5	7.1	7.7	8.5	9.4	10.3
68.5	-0.3833	7.8509	0.09085	6.1	6.6	7.2	7.9	8.6	9.5	10.5
69.0	-0.3833	7.9559	0.09079	6.1	6.7	7.3	8.0	8.7	9.6	10.6
69.5	-0.3833	8.0599	0.09074	6.2	6.8	7.4	8.1	8.8	9.7	10.7
70.0	-0.3833	8.1630	0.09068	6.3	6.9	7.5	8.2	9.0	9.9	10.9
70.5	-0.3833	8.2651	0.09062	6.4	6.9	7.6	8.3	9.1	10.0	11.0
71.0	-0.3833	8.3666	0.09056	6.5	7.0	7.7	8.4	9.2	10.1	11.1
71.5	-0.3833	8.4676	0.09050	6.5	7.1	7.7	8.5	9.3	10.2	11.3
72.0	-0.3833	8.5679	0.09043	6.6	7.2	7.8	8.6	9.4	10.3	11.4
72.5	-0.3833	8.6674	0.09037	6.7	7.3	7.9	8.7	9.5	10.5	11.5
73.0	-0.3833	8.7661	0.09031	6.8	7.4	8.0	8.8	9.6	10.6	11.7
73.5	-0.3833	8.8638	0.09025	6.9	7.4	8.1	8.9	9.7	10.7	11.8
74.0	-0.3833	8.9601	0.09018	6.9	7.5	8.2	9.0	9.8	10.8	11.9
74.5	-0.3833	9.0552	0.09012	7.0	7.6	8.3	9.1	9.9	10.9	12.0



Table 66 Weight-for-length for girls (continued)

Length (cm)	Z-scores (weight in kg)									
	L	M	S	-3SD	-2SD	-1SD	Median	1SD	2SD	3SD
75.0	-0.3833	9.1490	0.09005	7.1	7.7	8.4	9.1	10.0	11.0	12.2
75.5	-0.3833	9.2418	0.08999	7.1	7.8	8.5	9.2	10.1	11.1	12.3
76.0	-0.3833	9.3337	0.08992	7.2	7.8	8.5	9.3	10.2	11.2	12.4
76.5	-0.3833	9.4252	0.08985	7.3	7.9	8.6	9.4	10.3	11.4	12.5
77.0	-0.3833	9.5166	0.08979	7.4	8.0	8.7	9.5	10.4	11.5	12.6
77.5	-0.3833	9.6086	0.08972	7.4	8.1	8.8	9.6	10.5	11.6	12.8
78.0	-0.3833	9.7015	0.08965	7.5	8.2	8.9	9.7	10.6	11.7	12.9
78.5	-0.3833	9.7957	0.08959	7.6	8.2	9.0	9.8	10.7	11.8	13.0
79.0	-0.3833	9.8915	0.08952	7.7	8.3	9.1	9.9	10.8	11.9	13.1
79.5	-0.3833	9.9892	0.08946	7.7	8.4	9.1	10.0	10.9	12.0	13.3
80.0	-0.3833	10.0891	0.08940	7.8	8.5	9.2	10.1	11.0	12.1	13.4
80.5	-0.3833	10.1916	0.08934	7.9	8.6	9.3	10.2	11.2	12.3	13.5
81.0	-0.3833	10.2965	0.08928	8.0	8.7	9.4	10.3	11.3	12.4	13.7
81.5	-0.3833	10.4041	0.08923	8.1	8.8	9.5	10.4	11.4	12.5	13.8
82.0	-0.3833	10.5140	0.08918	8.1	8.8	9.6	10.5	11.5	12.6	13.9
82.5	-0.3833	10.6263	0.08914	8.2	8.9	9.7	10.6	11.6	12.8	14.1
83.0	-0.3833	10.7410	0.08910	8.3	9.0	9.8	10.7	11.8	12.9	14.2
83.5	-0.3833	10.8578	0.08906	8.4	9.1	9.9	10.9	11.9	13.1	14.4
84.0	-0.3833	10.9767	0.08903	8.5	9.2	10.1	11.0	12.0	13.2	14.5
84.5	-0.3833	11.0974	0.08900	8.6	9.3	10.2	11.1	12.1	13.3	14.7
85.0	-0.3833	11.2198	0.08898	8.7	9.4	10.3	11.2	12.3	13.5	14.9
85.5	-0.3833	11.3435	0.08897	8.8	9.5	10.4	11.3	12.4	13.6	15.0
86.0	-0.3833	11.4684	0.08895	8.9	9.7	10.5	11.5	12.6	13.8	15.2
86.5	-0.3833	11.5940	0.08895	9.0	9.8	10.6	11.6	12.7	13.9	15.4
87.0	-0.3833	11.7201	0.08895	9.1	9.9	10.7	11.7	12.8	14.1	15.5
87.5	-0.3833	11.8461	0.08895	9.2	10.0	10.9	11.8	13.0	14.2	15.7
88.0	-0.3833	11.9720	0.08896	9.3	10.1	11.0	12.0	13.1	14.4	15.9
88.5	-0.3833	12.0976	0.08898	9.4	10.2	11.1	12.1	13.2	14.5	16.0
89.0	-0.3833	12.2229	0.08900	9.5	10.3	11.2	12.2	13.4	14.7	16.2
89.5	-0.3833	12.3477	0.08903	9.6	10.4	11.3	12.3	13.5	14.8	16.4