

ESTUDIO DE PURISCAL V. INFECCION ENTERICA EN NIÑOS MENORES DE DOS AÑOS

Marcela Vives* Leonardo Mata* Bernardo Castro* Alberto Simhon* y
Patricia Jiménez*

INTRODUCCION

Universalmente se reconoce la importancia de la enfermedad diarreica como causa principal de morbilidad y mortalidad principalmente en niños de países en desarrollo (32) particularmente cuando se asocia a la desnutrición. Mientras que la situación epidemiológica de la diarrea en Latinoamérica es grave, en Costa Rica, la mortalidad por diarrea ha experimentado una disminución importante en los últimos sesenta años, declinando de 400 muertes por 100,000 habitantes en la década de 1920 a 4,5 por 100,000 en 1980.

Por otra parte el descubrimiento y reconocimiento de nuevos agentes etiológicos de la diarrea como rotavirus (2,11), enterobacteriáceas toxigénicas (25), *Campylobacter fetus jejuni* (6,26), *Yersinia enterocolitica* (1,12) y *Vibrio parahaemolyticus* (22), ha permitido establecer la etiología en más del 60% de los casos de diarrea aguda que se observan en la población general o que asiste a los hospitales. La mayoría de los estudios de causalidad han sido realizados en países desarrollados y en pacientes hospitalizados, existiendo pocas investigaciones prospectivas de las diversas etiologías en poblaciones rurales de países en desarrollo (3, 18, 20, 23).

La presente investigación se inició en setiembre de 1979 y tuvo como principal objetivo, determinar la prevalencia y etiología de las infecciones entéricas en niños menores de dos años seguidos prospectivamente en una zona rural de Costa Rica.

Se investigaron rotavirus, enterobacteriáceas toxigénicas, *Campylobacter fetus jejuni*, *Yersinia enterocolitica* y *Vibrio parahaemolyticus*, así como agentes patógenos tradicionales, *Shigella*, *Salmonella* y parásitos.

MATERIAL Y METODOS

La investigación abarcó 24 meses de seguimiento de niños del cantón de Puriscal, zona rural localizada a 42 kilómetros de la provincia de San José con características ya descritas (21).

Se estudiaron 279 niños diarreicos menores de 20 meses de edad y 198 testigos equiparados por edad, sexo y lugar de residencia, ambos grupos pertenecientes

*Instituto de Investigaciones en Salud (INISA) Ciudad Universitaria Rodrigo Facio
Universidad de Costa Rica COSTA RICA

a las falanges (cohortes) 1 y 2 del Estudio de Puriscal. La falange 1 está constituida por 605 niños nacidos entre el 19 de setiembre de 1979 y el 18 de setiembre de 1980; la falange 2 tiene 633 niños nacidos entre el 19 de setiembre de 1980 y el 18 de setiembre de 1981.

La captación de los niños diarreicos se realizó por medio de visitas domiciliarias del médico y del personal de campo de INISA o durante las consultas médicas impartidas en los Puestos de Salud de los distritos de Candelarita y Barbacoas y en la Estación de Campo en Santiago, cabecera del Cantón. Además, algunos de los casos estudiados fueron referidos por el personal de la Clínica de la Caja Costarricense de Seguro Social (CCSS) o del Centro de Salud del Ministerio de Salud.

Los testigos seleccionados fueron visitados en sus hogares para realizar la toma de muestras necesaria, en forma simultánea al estudio de los casos.

Se consideró como diarrea aguda, la emisión de cuatro o más deposiciones líquidas y abundantes en un período de 24 horas. Un médico o una enfermera graduada realizó el examen físico de los niños enfermos y anotó en formularios precodificados datos clínicos importantes del episodio como estado de hidratación, presencia de fiebre, anorexia, número y características de las deposiciones. Además, una auxiliar de enfermería y dos técnicas de laboratorio dieron instrucciones acerca del uso del SUERORAL (mezcla de sales para hidratación oral de la CCSS), a la madre o persona encargada del cuidado del niño como parte de un estudio de transferencia de la tecnología sobre rehidratación oral al hogar (14).

Se tomó una muestra de heces de cada niño para realizar estudios virológicos, bacteriológicos y parasitológicos, tanto en el laboratorio de la Estación de Campo del INISA en Puriscal, como en los laboratorios del INISA en la Universidad de Costa Rica.

Para la detección de rotavirus se prepararon suspensiones de heces al 20% (v/v) en medio de infusión cerebro-corazón (BBL) las cuales se guardaron a 4°C durante siete días aproximadamente; se hizo una prueba de ELISA de doble "sandwich" (30, 31) usando sueros hiperinmunes de cabra y cobayo anti-rotavirus humanos. Todos los positivos presuntivos fueron confirmados mediante pruebas de bloqueo usando suero de ternero convaleciente (15).

Para el estudio bacteriológico, cada muestra de heces se inoculó al lado del paciente en los siguientes medios de cultivo: agares MacConkey, Salmonella-Shigella (SS), Tergitol-7 con cloruro de trifetil tetrazolio al 0,04% (T7T) (16), Tiosulfato-Citrato-Sales Biliares-Sacarosa (TCBS) y agar Brucella (Difco, BBL).

El agar Brucella se utilizó para el aislamiento de *C. fetus jejuni* adicionándole sangre de caballo al 10% y antibióticos (26). Las placas de agar Brucella inoculadas, se incubaron en jarra para anaerobiosis (BBL) con sobres generadores Gas-Pak (BBL) sin catalizador a 42°C por 48 horas (7). Las colonias sospechosas se identificaron mediante examen microscópico para identificar movilidad en "dardo", pruebas bioquímicas y prueba de sensibilidad al ácido nalidixico (27).

El agar MacConkey se usó para investigar *Yersinia enterocolitica* incubando las placas a temperatura ambiente (22°C a 24°C) durante 48 horas (1) y el TCBS para *Vibrio parahaemolyticus* se incubó a 37°C por 18 a 24 horas al igual que el SS y el T7T. Las salmonellas y shigellas se identificaron por medio de pruebas serológicas y bioquímicas establecidas (8).

Para la investigación de enterobacteriáceas toxigénicas, se transfirieron seis colonias diferentes del agar T7T a tubos de agar triple azúcar hierro (TSI) inclinado para identificarlas bioquímicamente y luego se inocularon en matraces de 50 ml conteniendo caldo de casaminoácidos con extracto de levadura, CYE (Difco). Los matraces se colocaron en baño de agitación continua a 37°C y a 86 oscilaciones por minuto durante 18 a 24 horas. Los cultivos se centrifugaron a 11.000 x g a 4°C por 20 minutos, y los extractos bacterianos obtenidos se analizaron mediante inoculación por vía oral en ratones lactantes, para detectar la presencia de toxina termoestable (28) y por el ensayo inmunosorbentes de enzima conjugada (ELISA) para determinar la toxina termolábil (29). Para los ensayos de ambas toxinas se usaron extractos de *E. coli* H-1040 y K-12 como testigos positivo y negativo respectivamente.

Los parásitos intestinales se investigaron mediante observación microscópica directa de las heces utilizando soluciones de lugol y salina fisiológica. Además se prepararon suspensiones fecales en alcohol polivinílico (PVA) al 7,50/o y en formalina para estudios posteriores cuyos resultados serán informados en una publicación posterior.

RESULTADOS

El Cuadro 1 muestra la distribución de los agentes encontrados en 279 niños con diarrea aguda y en 198 testigos. Los rotavirus fueron los agentes más frecuentes presentándose en forma "pura" (como agente único) en el 150/o de los casos y en el 50/o de los testigos. En segundo lugar figuraron las enterobacteriáceas toxigénicas, con porcentajes similares en casos y testigos de 90/o y 100/o respectivamente. El *Campylobacter fetus jejuni* se identificó como agente único en el

CUADRO 1

Agentes patógenos diagnosticados en 279 casos con diarrea y 198 casos sin diarrea observación prospectiva de dos falanges, Puriscal, 1979 81

Agente	279 con diarrea		198 sin diarrea	
	Posit. (%)	% Acum.	Posit. (%)	% Acum.
Rotavirus*	43(15)		10(5)	
Bacterias enterotoxigénicas	26(9)	24	19(10)	15
<i>C. f. jejuni</i> **	17(6)	30	4(2)	17
<i>Shigella</i>	6(2)	32	0	
<i>Salmonella</i>	2(1)	33	0	
<i>Giardia</i>	1(<1)		0	

$$*X^2 = 12,6, p < 0,005$$

$$**X^2 = 4,5, p < 0,05$$

80/o de los niños con diarrea y en el 20/o de los niños sanos. Las shigelas y salmonelas se identificaron en el 20/o y 10/o de los casos respectivamente, estos agentes no se detectaron en las heces de niños sanos. Ningún caso fue positivo por *Yersinia enterocolitica* o *Vibrio parahaemolyticus*.

La observación microscópica directa de las heces reveló la presencia de trofozoítos de *Giardia* en un caso de diarrea. No se detectaron helmintos en preparaciones al fresco.

Se diagnosticaron infecciones "puras" (por un solo agente) en el 340/o de los niños diarreicos y en el 170/o de los testigos (Cuadro 2). Se detectaron uno o más agentes patógenos en el 420/o de los niños diarreicos y en el 180/o de los testigos. En los niños diarreicos las infecciones mixtas más frecuentes fueron por rotavirus más *Campylobacter* (30/o) y rotavirus más enterobacteriáceas toxigénicas (30/o)

CUADRO 2

Frecuencia de agentes enteropatógenos en casos y testigos, observación prospectiva de dos falanges, Purical, 1979-81

Número de* agentes	Con diarrea	Sin diarrea
	N=279	N=198
Uno	94(34)**	33(17)
Dos	23(8)	3(1)
Tres	1(<1)	0
Uno o más	118(42)	36(18)

*Agentes investigados: rotavirus, bacterias toxigénicas, *C.f. jejuni*, *Shigella*, *Salmonella* y parásitos

**Número (%)

(Cuadro 3). Además se detectaron infecciones por rotavirus y *Shigella* en el 10/o de los niños diarreicos. Un niño diarreico y uno sin diarrea excretaron *Campylobacter* más enterobacteriáceas toxigénicas.

El Cuadro 4 muestra la frecuencia de signos y síntomas en los casos de diarrea con infecciones simples. El cuadro clínico de la mayoría de los episodios se caracterizó por la presencia de fiebre, vómitos y anorexia, siendo éstos más acentuados en los niños excretores de rotavirus. Se presentó deshidratación leve o moderada en el 100/o de los niños con rotavirus y en el 40/o de aquellas con enterobacteriáceas toxigénicas. Se detectó la presencia de sangre macroscópica en las heces del 830/o de los niños diarreicos de los que se aisló *Shigella* y en el 250/o de los que se aisló *Campylobacter*. Uno de los niños que presentaron infección por *Salmonella* tuvo deshidratación moderada.

CUADRO 3

Infecciones múltiples en casos con diarrea y sin diarrea, observación
prospectiva de dos falanges, Puriscal, 1979-81

Agente	279 con diarrea		198 sin diarrea	
	Posit. (%)	% Acum.	Posit. (%)	% Acum.
Rotavirus+C. f. jejuni	9(3)		1(<1)	
Rotavirus+bacterias toxigénicas	9(3)	6	1(<1)	1
Rotavirus+Shigella	4(1)	7	0	
C. f. jejuni+bacterias toxigénicas	1(<1)	7	1(<1)	
Rotavirus+C. f. jejuni+ bacterias toxigénicas	1(<1)	8	0	1

CUADRO 4

Signos y síntomas de la diarrea específica, casos puros, estudios prospectivo,
Puriscal, 1979-81

Agentes	Fiebre	Vómitos	Deshidra- tación	Anorexia	Sangre en heces
Rotavirus N=38	22(58)*	18(47)	4(10)	15(39)	0
Bacterias toxigénicas N=23	4(17)	8(35)	1(4)	7(30)	1(4)
C. f. jejuni N=16	7(44)	6(37)	0	8(50)	4(25)
Shigella N=6	3(50)	0	0	3(50)	5(83)
Salmonella N=2	1	1	1	0	0

* Número con el signo o síntoma (%)

La distribución de casos y testigos por edad y agente patógeno identificado, se muestra en el Cuadro 5. El 54% de los niños estudiados tenían entre cero y cinco meses. Las infecciones puras por rotavirus fueron más frecuentes en niños de tres a cinco meses de edad (19%) y en aquellos niños de un año (20%). Las enterobacteriáceas toxigénicas mostraron una mayor prevalencia en niños con edades entre tres y ocho meses, a diferencia de las infecciones por *Campylobacter* que fueron más frecuentes en los niños de nueve a once meses de edad.

Con respecto a la distribución mensual de las infecciones por los distintos agentes investigados (Figura 1), se observó la presencia de dos picos en los que hubo un exceso de casos positivos por rotavirus a través de los 24 meses de estudio, en marzo de 1980 y enero de 1981 (50% y 54% respectivamente). Durante el resto de los meses de seguimiento, las frecuencias oscilaron entre cero y 38%.

CUADRO 5

Agentes patógenos diagnosticados en 279 casos con diarrea y 198 casos sin diarrea observación prospectiva de dos falanges, Puriscal, 1979-81

Edad, meses	Niños	279 con diarrea			Niños	198 sin diarrea		
		Rota-virus	Bacterias toxigénicas	<i>C. fetus jejuni</i>		Rota-virus	Bacterias toxigénicas	<i>C. fetus jejuni</i>
0-2	71	10(14)*	4(6)	4(6)	40	4(10)	4(10)	0
3-5	79	15(19)	12(15)	4(5)	60	3(4)	6(9)	1(1)
6-8	67	9(13)	7(10)	3(4)	50	2(4)	6(12)	1(2)
9-11	38	5(13)	2(5)	6(16)	29	1(3)	3(10)	2(7)
12-14	15	3(20)	1(7)	0				
15-17	5	0	0	0				
18-20	4	1(25)	0	0				

* Positivos (%)

Las enterobacterias patógenas estudiadas (enterotoxigénicas, *Campylobacter*, *Shigella* y *Salmonella*), mostraron frecuencias entre 30% y 42% durante los meses de baja prevalencia de rotavirus.

DISCUSION

Los rotavirus han sido reconocidos mundialmente como los agentes más importantes en la causalidad de la enfermedad diarreica en niños (33). En este estudio prospectivo en niños menores de dos años de un área rural de Costa Rica los rotavirus fueron los agentes más frecuentemente detectados, encontrándose en el 24% de todas las diarreas analizadas ya sea en infecciones simples o mixtas. La diferencia de frecuencias de rotavirus en niños diarreicos y testigos fue significati-

PREVALENCIA ESTACIONAL DE AGENTES ENTERICOS,
PURISCAL, 1979 - 1981

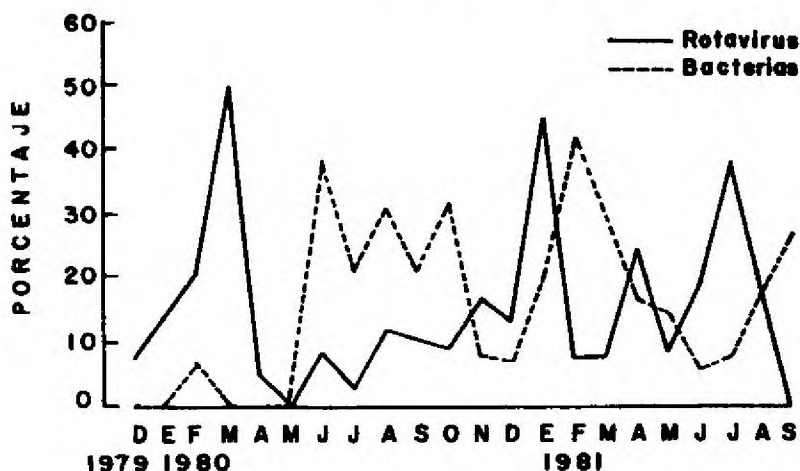


FIGURA 1

Prevalencia mensual de rotavirus y bacterias enteropatógenas (toxigénicas, *Campylobacter*, *Shigella*, *Salmonella*) en niños diarreicos menores de dos años, Puriscal, Costa Rica, 1979-81.

va, $p < 0,005$. Esta frecuencia resultó menor que la informada en una investigación reciente en niños diarreicos que asistieron a consulta externa de la Sala de Emergencias del Hospital Nacional de Niños, en los que estos agentes se identificaron en más del 40% de casos con diarrea (21). Los pacientes de este hospital provienen de zonas urbanas y rurales del Valle Central.

Las enterobacteriáceas toxigénicas se identificaron en el 13% de casos y 12% de testigos, lo cual sugeriría una importancia dudosa de estos agentes en la etiología de la enfermedad diarreica en esta zona rural. En niños diarreicos de consulta externa del Hospital Nacional de Niños la frecuencia de cepas toxigénicas fue de 13%; en niños diarreicos y no diarreicos hospitalizados en esta institución las diferencias en prevalencia de bacterias toxigénicas fueron significativas, demostrándose el potencial patogénico de estos agentes.

Esos resultados plantean la necesidad de realizar además de estudios de toxigenicidad, estudios para detectar la presencia de factores de colonización ya que, para que una bacteria toxigénica sea patógena, debe poseer la capacidad de producir toxina (termoestable y/o termolábil) y adherirse a la mucosa intestinal a través de estructuras especializadas llamadas "pili" o fimbrias (10). En el estudio realizado en Puriscal se identificó un número mayor de cepas de *Escherichia coli* productoras de toxina termolábil y en el Hospital Nacional de Niños las cepas de *E. coli* con toxina termoestable fueron más frecuentes. Los porcentajes encontrados en Costa Rica son menores que los informados en México y Bangladesh (47% y 28% respectivamente) (4,9).

Esta investigación permitió demostrar la presencia de *Campylobacter fetus jejuni* en infecciones simples (como agente único) en el 6^o/o de los casos y combinado con otros agentes en un 4^o/o. En las diarreas de la Sala de Emergencias del Hospital Nacional de Niños la prevalencia fue de 5^o/o en infecciones simples y de 3^o/o en mixtas. Estudios en marcha han demostrado la existencia de *Campylobacter* en las heces de la mayoría de los animales domésticos comunes en Puriscal, los que servirían de posibles fuentes de infección de niños y adultos en el área rural. Los resultados de Puriscal contrastan con los de otros países en vías de desarrollo en los que ha sido posible detectar estos agentes hasta en el 40^o/o de casos (5), (1979). Por el contrario en países industrializados la infección por *Campylobacter* puede ser trazada como una infección alimentaria y las frecuencias de aislamiento oscilan entre 7^o/o y 10^o/o (7).

La frecuencia de *Shigella* y *Salmonella* en infecciones sencillas fue de 2^o/o y 1^o/o respectivamente. Estos porcentajes fueron menores que los encontrados en los niños diarreicos del Hospital Nacional de Niños (8,4^o/o combinadas). Las frecuencias encontradas en Costa Rica, son considerablemente menores que las informadas en un estudio de niños mexicanos en el que estos dos agentes se encontraron en el 26^o/o de los casos (23). Estas diferencias podrían atribuirse a la existencia en Costa Rica de mejores condiciones sanitarias. El coprocultivo seriado, podría resultar en la obtención de frecuencias más altas de shigellas en vista de la labilidad de las mismas.

La observación microscópica de suspensiones fecales en solución salina y lugol mostró una muy baja frecuencia (< 1^o/o) de parásitos intestinales tanto en casos como en testigos, lo cual indica que estos agentes tienen un papel poco importante en la causalidad de la diarrea aguda, no así en las diarreas de curso crónico donde estos agentes podrían ser más importantes.

El 40^o/o de las infecciones investigadas se presentaron en niños mayores de ocho meses. Esta edad coincide en muchos casos con el destete del niño de Puriscal. (19). En estas condiciones ocurre un exceso de morbilidad por enfermedad diarreica (17). La diarrea del destete probablemente es consecuencia de la ingestión de alimentos contaminados y de un descenso en los niveles de anticuerpos y otros principios anti-infecciosos contenidos en la leche materna (13).

Las infecciones por rotavirus presentaron mayor prevalencia en los meses secos del año: enero y marzo, durante los cuales se registró una temperatura promedio de 23,4^oC; y se mantuvieron endémicos a través de todo el año. Los niveles más altos de infecciones por bacterias patógenas (toxigénicas, *Campylobacter*, *Shigella* y *Salmonella*) se presentaron durante los meses de baja prevalencia de rotavirus. En febrero de 1981 se detectó un exceso de infecciones por estos agentes.

Los principales síntomas de las infecciones por los distintos agentes fueron: fiebre, vómitos y anorexia. La enteritis por *Shigella* y *Campylobacter* se diferenció de otras infecciones por la presencia de sangre macroscópica en las heces. La deshidratación fue más frecuente en las diarreas por rotavirus y enterobacteriáceas toxigénicas, tal y como se ha informado en otros estudios (4). No se presentó ningún niño con deshidratación severa. La rehidratación con soluciones electrolíticas por vía oral (24), y el mejor conocimiento de las madres sobre las causas de la diarrea así como acerca de la forma de prevenir o curar la deshidratación en el hogar (14), han contribuido para que cada vez menos niños sufran

severas o mueran por enfermedad diarreica.

Lo anterior lo comprueba el hecho de que el 79% de los niños a los que se les diagnosticó deshidratación leve o moderada lograron recuperarse mediante hidratación oral en el lugar de consulta (Estación de Campo de INISA, Centro o Puesto de Salud, Clínica de CCSS) o en el hogar y sólo el 21% recibió rehidratación intravenosa en el hospital.

Los niños de Puriscal mostraron una prevalencia de enfermedad diarreica de 0,65 episodios por niño por año, la cual es baja si se compara con la informada en otros estudios similares (4,18) en los que se detectaron hasta siete episodios por niño por año y donde la enfermedad diarreica continua siendo una de las principales causas de mortalidad infantil.

La baja frecuencia de morbilidad y total ausencia de mortalidad por enfermedad diarreica en niños menores de dos años de Puriscal es probablemente el resultado de mejoras dramáticas en los campos de la educación, saneamiento ambiental y nutrición y además de intervenciones como promoción de lactancia materna y rehidratación oral, así como del seguimiento intensivo de que son objeto estos niños.

AGRADECIMIENTO

Esta investigación recibió el apoyo financiero del Préstamo AID-515-T-026 y de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica. Los autores agradecen la colaboración administrativa de la Lic. Carmen María Valverde, Directora Ejecutiva del Préstamo y la ayuda técnica de las siguientes personas: Ana V. Acosta, Norma Valverde, Eliceth León, Guillermo Vargas, Roberto Padilla y Julio C. Gamboa.

RESUMEN

Se estudió la presencia de agentes enteropatógenos en 279 niños diarreicos y 198 niños sanos pertenecientes a la población infantil de una zona rural de Costa Rica, la cual es objeto de un estudio multidisciplinario y prospectivo. Tanto los casos como los testigos pertenecen a dos falanges anuales de niños captados desde el nacimiento. Los rotavirus fueron los agentes patógenos más comunes ya que se presentaron en el 24% de los casos de diarrea (en infecciones simples o mixtas) y en el 6% de los testigos ($p < 0,005$). Las enterobacteriáceas toxigénicas se identificaron con igual frecuencia en casos y testigos. El *Campylobacter fetus jejuni* ocupó el tercer lugar con un 10% en casos y 2% en testigos ($p < 0,05$). Se encontró *Shigella* en el 3% de los casos y *Salmonella* en el 1%. Los niños de Puriscal sufrieron una baja tasa de enfermedad diarreica equivalente a 0,65 episodios por niño por año, no registrándose ninguna muerte por esta enfermedad durante el período de estudio. La baja frecuencia de diarrea y la ausencia de muertes pueden atribuirse a la existencia de un estado nutricional adecuado en los niños y a la hidratación oral en forma oportuna.

ABSTRACT

The presence of enteric pathogens was studied in 279 diarrheic and 198 non-diarrheic children in a rural area of Costa Rica whose childhood population are the object of a prospective multidisciplinary study. Cases and controls belong to two consecutive yearly cohorts recruited at birth from September 1979 to September 1981. The agents most frequently identified were rotaviruses (24% of cases) in single and mixed infections and 6% of controls. Enterotoxigenic *Enterobacteriaceae* were identified with similar frequency in cases and controls. *Campylobacter fetus jejuni* ranked third (10% and 2% respectively), and *Shigella* and *Salmonella* were present in 3% and 1% of cases respectively, but were absent in healthy children. Cohort children experienced a low attack rate of diarrhea (0.65 episodes per child per year). No fatalities were recorded in the study period; due to the adequate nutritional status (in turn the result of the low diarrhea attack) and to prompt oral rehydration, recovery from diarrhea was rapid.

REFERENCIAS

1. Bercovier H., D.J. Brenner & Ursing
Characterization of *Yersinia enterocolitica sensu stricto*.
Current Microbiol., 4: 201, 1980.
2. Bishop, R.F., G.P. Davidson, I.H. Holmes & B.J. Ruck
Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with gastroenteritis. Lancet, 2: 1281, 1973.
3. Black, R.E., M.H. Merson, A.S. Rahman, M. Yanus, A.R. Alim, I. Hug, R.H. Yolken & G.T. Curlin
A two year study of bacterial, viral and parasitic agents associated with diarrhea in rural Bangladesh. J. Infect. Dis., 142:660, 1980.
4. Black, R.E., I.Hug, M.H.Merson, A.R. Alim & M. Yanus
Incidence and severity of rotavirus and *Escherichia coli* diarrhea in rural Bangladesh. Implications for vaccine development. Lancet, 17: 141, 1981.
5. Bokkenheuser, V.D., N.J. Richardson, J.H. Bryner, D.J. Roux, A.B. Schutte, H.J. Koorhof, I. Freiman & E. Hartmon
Detection of enteric campylobacteriosis in children.
J. Clin. Microbiol., 9: 227, 1979.
6. Butzler, J.P., P. Dekeyser, M.Detrain & F. Dehaen
"Related vibrio" in stools. J. Pediat., 82: 493, 1973.
7. Butzler, J. P. & M.B. Skirrow
Campylobacter enteritis. Clinica Gastroenterol., 8: 737, 1979.

8. Edwards, P.R. & W.H. Ewing
Identification of *Enterobacteriaceae*. 3rd ed. Burgess
Pub. Co., Minneapolis, Minnesota, 1972.
9. Evans, D.G., J. Olarte, H.L. DuPont, D.J. Evans, A. Galindo, B.L. Portnoy
& R.H. Conklin
Enteropathogens associated with pediatric diarrhea in Mexico City.
J. Pediat., 91: 65, 1977.
10. Evans, D.G. & D.J. Evans
New surface associated heat-labile colonization factor antigen (CFA/II)
produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* of serogroups O6 and O8.
Infect. Immun., 21: 638, 1978.
11. Flewett, T.H., H.A. Davis, A.S. Bryden & M.J. Robertson
Diagnostic electron microscopy of faeces. II. Acute gastroenteritis associated
with reovirus-like particles.
J. Clin. Pathol., 27: 608, 1974.
12. Highsmith, A.H., J.C. Feely & G.K. Morris
1977. *Yersinia enterocolitica*: A review of the bacterium and recommended
laboratory methodology. *Health Lab. Sci.*, 14: 253, 1977.
13. Holmgren, J., A.M. Svennerholm & C. Ahrén
Nonimmunoglobulin fraction of human milk inhibits bacterial adhesion
(hemagglutination) and enterotoxin binding of *Escherichia coli* and *Vibrio*
cholerae. *Infect. Immun.*, 33: 136, 1981.
14. Jiménez, P., L. Mata, M.E. García & W. Vargas
Estudio de Puriscal. VI. Transferencia de la tecnología de rehidratación oral
del hospital al hogar rural. *Rev. Med. Hosp. Nal. Niños*, 1982. (este mismo No.)
15. Kapikian, A.Z., R.H. Yolken, H.G. Greenberg, R.G. Wyatt, A.R. Kalica,
R.M. Chanock & H.W. Kim
Gastroenteritis viruses. In: E.H. Lennette y N.J. Schmidt (ed).
Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections. 5th. ed.
American Public Health Association, Washington, D.C. pp. 927-995, 1979.
16. Mata, L.J., E.J. Gangarosa, A. Cáceres, D.R. Perera & M.L. Mejicanos

Epidemic Shiga bacillus dysentery in Central America. I. Etiologic
investigations in Guatemala, 1969. *J. Infect. Dis.*, 122: 170, 1970.
17. Mata, L.J., R.A. Kronmal & B. García
Breastfeeding, weaning and the diarrhoeal syndrome in a Guatemala Indian
village. In: Acute Diarrhoeal syndrome in childhood, Ciba Found. Symp. 42
(New Series). Elsevier/North Holland, Amsterdam. pp. 311-330, 1976.

18. Mata L.

The Children of Santa María Cauqué. A prospective field study of health and growth. The MIT Press. Cambridge, Mass., pp. 228-253, 1978.

19. Mata, L., P.Jiménez, M.A.Allen, W. Vargas, M.E. García, J.J. Urrutia & R.G. Wyatt.

Diarrhea and manutrition: Breastfeeding intervention in a transitional population. In: T. Holme, J. Homgren, M.H.Merson y R.Mollby (ed). Acute Enteric Infections in Children. New Prospects for Treatment and Prevention. Elsevier/North Holland, Amsterdam. pp. 233-251, 1981.

20. Mata, L.

Estudio de Puriscal. I. Bases filosóficas, desarrollo y estado actual de la investigación aplicada en nutrición.
Rev.Méd.Hosp.Nal.Niños, 1982 (este mismo número)

21. Mata, L., A. Simhon, R.Padilla, M.M. Gamboa, G.Vargas, F. Hernández, E. Mohs, C. Lizano, R.G. Wyatt & R.H. Yolken

Diarrhea associated with rotaviruses, enterotoxigenic *Escherichia coli*, *Campylobacter* and other agents in Costa Rican children. Enviado a: Am. J. Trop. Med. Hyg. 1982.

22. Nickelson, R. & C. Vanderzant

Vibrio parahaemolyticus. A review. J. Milk Food Technol., 34: 447, 1971.

23. Pickering, L.K., D.J. Evans, O. Muñoz, H.L.DuPont, P.Coello Ramírez, J.J. Vollet, R.H. Conklin, J. Olarte & Kohl

Prospective study of enteropathogens in children with diarrhea in Houston and Mexico. J. Pediat., 93: 383, 1978.

24. Pizarro, D., G.Posada, L.Mata, D.Nalin & E. Mohs

Oral rehydration of neonates with dehydration diarrhoeas.
Lancet, 2: 1209, 1979.

25. Sack, R.B., S.L. Gorbach & J.G. Banwell

Enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from patients with severe cholera like disease. J.Infect. Dis., 123: 378, 1974.

26. Skirrow,, M.G.

Campylobacter enteritis: a new disease. Brit.Med.J.,2: 9, 1977.

27. Skirrow, M.B. & J. Benjamin

"1001" campylobacters: cultural characteristics of intestinal campylobacters from man and animals. J. Hyg. (Cambridge), 85: 427, 1980

28. Stavric, S. & D. Jeffrey

A modified bioassay for heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin.
Can J. Microbiol., 23: 331, 1977.

29. Yolken, R.H., H.B. Greenberg, M. H. Merson, R.B. Sack & A.Z. Kapikian
Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Escherichia coli* heat labile enterotoxin. *J. Clin.Microbiol.*, 6: 439, 1977.
30. Yolken, R.H., H.W. Kim, T. Clem, R.G. Wyatt, A.R. Kalica, R.M. Chanock & A.Z. Kapikian
Enzyme-linked immunoassay (ELISA) for detection of human reovirus -like agents of infantile gastroenteritis.
Lancet, 2: 263, 1977.
31. Yolken, R.H., R.G. Wyatt & A.Z. Kapikian
ELISA for rotavirus. *Lancet*, 2: 818, 1977.
32. W. H. O.
Scientific working group reports, 1978-1980. W.H.O. Geneva, 1980.
33. W. H. O. Scientific working group
Rotavirus and other viral diarrheas. *Bull. W.H.O.*, 58: 153, 1980.