

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
SOCIEDAD DE BENEFICENCIA ESPAÑOLA, I.A.P
HOSPITAL ESPAÑOL DE MÉXICO**

**Utilidad del Perfil Molecular de Diarrea en pacientes ingresados por
Gastroenteritis Aguda en el Hospital Español de México**

TESIS DE POSGRADO

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE SUBESPECIALISTA EN:

GASTROENTEROLOGÍA

PRESENTA:

DRA. LUZ MARIA CASTRO REYES

TUTOR DE TESIS:

Dr. Ricardo Humberto Raña Garibay



HOSPITAL ESPAÑOL

Ciudad Universitaria, Ciudad de México, México Julio 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatoria y Agradecimientos

Se lo dedico a mi familia, que sin ellos no lo hubiera podido lograr, además a mis profesores que me ayudaron en todo el proceso.

INDICE

1. Resumen.....	4
2. Antecedentes.....	5
3. Justificación.....	17
4. Objetivos.....	18
5. Hipótesis.....	18
6. Criterios operacionales.....	18
7. Variables del estudio.....	19
8. Clasificación de la investigación.....	20
9. Material y métodos.....	20
10. Descripción del proceso.....	21
11. Análisis estadístico e interpretación de los datos.....	21
12. Consideraciones éticas.....	23
13. Carta de consentimiento informado.....	23
14. Cronograma.....	23
15. Resultados.....	24
16. Discusión	33
17. Conclusiones.....	34
18. Referencias.....	34

1. RESUMEN

I. OBJETIVO

1. Analizar los resultados del perfil molecular de diarrea (PMD) para conocer los gérmenes más frecuentes en pacientes hospitalizados con gastroenteritis en un periodo de 3 años.
2. Hacer la comparación entre el perfil molecular de diarrea y el coprocultivo.

II. DISEÑO DEL ESTUDIO

El estudio es observacional, transversal y descriptivo, en un grupo en el cual se incluyen pacientes hospitalizados con diagnóstico de gastroenteritis aguda en el Hospital Español de México.

III. SITIO DE REALIZACIÓN DEL ESTUDIO

Áreas de Urgencias y Hospitalización del Hospital Español de México.

IV. FECHA EN QUE SE LLEVARÁ A CABO

El estudio será observacional, transversal y descriptivo de enero del 2013 a diciembre del 2016.

V. MATERIAL

El material utilizado para este protocolo fue la hoja de recolección de datos (anexada) así como los expedientes clínicos de los pacientes estudiados.

VI. MÉTODOS

Se tomarán los datos del expediente clínico de los pacientes que cumplan con los criterios de inclusión que hayan presentado diagnóstico clínico de gastroenteritis infecciosa con toma del PCR perfil molecular de diarrea. Se registrarán todas las variables a su ingreso considerando edad, sexo, comorbilidades, uso previo de antibióticos, presentación clínica (número de evacuaciones, duración, presencia de fiebre), biometría hemática, electrolitos séricos, química sanguínea, perfil molecular de diarrea (PMD/seeplex) por medio de la reacción de cadena de la polimerasa (PCR) del *adenovirus*, *astrovirus*, *norovirus GI*, *norovirus GII*, *rotavirus Grupo "A"*, *aeromonas spp*, *campylobacter spp*, *clostridium difficile toxina B*, *clostridium*

perfringens toxina, *E. coli* enterotoxigenica, *E. coli* 0157, *E coli* H7, *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *Vibrio* spp, *Yersinia enterocolitica* en heces fecales, coprocultivo, coprológico, coproparasitoscopico y toxinas A-B.

Se registrarán las intervenciones terapéuticas empíricas dirigidas contra la gastroenteritis aguda, el tiempo de estancia hospitalaria, así como su evolución clínica.

2. ANTECEDENTES DEL PROYECTO

Las infecciones gastrointestinales agudas están entre las enfermedades infecciosas más comunes en todo el mundo, siendo superadas sólo por infecciones del tracto respiratorio⁽¹⁾. La Gastroenteritis aguda se define por la presencia de evacuaciones de menor consistencia y de mayor frecuencia que la habitual; >3 evacuaciones anormales en 24 horas que puede o no ir acompañado de vómitos, dolor abdominal y/o fiebre con una duración menor de 2 semanas de evolución⁽²⁾.

Se calcula que anualmente la enfermedad diarreica aguda ocurre entre 6 y 60 mil millones de casos en el mundo, siendo el 15% de origen bacteriano con predominio de infecciones por *Salmonella* sp. seguida por el *Campylobacter jejuni*⁽³⁾.

En el Reino Unido se realizó un estudio de enfermedades gastrointestinales el cual estimó que alrededor del 25% de sus habitantes tienen una infección gastrointestinal cada año. En los Estados Unidos es una de las principales causas de enfermedad gastrointestinal con un promedio estimado de 179 millones de episodios anuales. Se considera una carga importante para los servicios de salud, con los costos socioeconómicos estimados en €345 millones en los Países Bajos, \$ 343 millones en Australia y \$ 3.700 millones en Canadá⁽⁴⁾. En México es una de las primeras causas de consulta médica y también una de las primeras causas de muerte, por ello se considera un problema de salud pública, que afecta a personas de cualquier edad y condición social, aunque los grupos más vulnerables son los niños y los ancianos. Se tiene una mayor incidencia de gastroenteritis vírica en otoño-invierno; mientras que las bacterias afectan preferentemente en primavera-verano⁽⁵⁾.

Los agentes etiológicos de la gastroenteritis aguda pueden ser bacterias, virus o parásitos; la prevalencia de los diferentes microorganismos depende de varios aspectos como: el tipo de contagio si fue en la comunidad o nosocomial, la edad, estado económico del país; viajes frecuentes a países con alta prevalencia de gastroenteritis (diarrea del viajero) y el estado inmunológico del sujeto. Por lo tanto, la identificación de los agentes etiológicos es importante para el tratamiento adecuado. Dentro de las causas de diarrea bacteriana más comunes son las producidas por diversos tipos de *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella*

spp, *Shigella spp*, *Yersinia enterocolítica*, *Vibrio cholerae* y *Clostridium difficile*. Actualmente se conocen 171 antígenos somáticos de *E. coli* y 56 antígenos flagelares, con 6 tipos diferentes productores de diarrea: entero patógeno, entero toxigénico, entero invasivo, entero hemorrágico, entero agregativo y de adhesividad difusa ^(5,6).

En general la forma de adquisición de la infección es vía fecal-oral, o bien por el consumo de agua y alimentos contaminados. Por ejemplo, la *E. coli enterohemorrágico* es por la ingesta de carne cruda. *Campylobacter jejuni* coloniza los tractos gastrointestinales de aves de corral, ganado vacuno, ovejas, cerdos y animales domesticados, como perros y gatos. El *Clostridium difficile* la forma más frecuente es intrahospitalaria, registrándose en algunas series hasta un 87% de casos de infección nosocomial ⁽⁶⁾.

De acuerdo al tiempo de evolución es diarrea aguda si tiene una duración < 14 días y diarrea crónica si es >14 días. Desde el punto de vista fisiopatológico la diarrea osmótica se caracteriza por la presencia de una cantidad elevada de sustancias osmóticamente activas en el lumen intestinal teniendo un mecanismo mediado por enterotoxinas encontrando ausencia de leucocitos en heces de estos los agentes etiológicos son el *Rotavirus*, *E.coli enterotoxigénica*, *E. coli enteropatogena*, *Salmonella spp*, *Cryptosporidium*, *Vibrio cholerae*, *C. perfringens*, *Bacillus cereus*, *S. aureus*, *Giardia lamblia*, *Virus Norwalk*, *Adenovirus*, *Campylobacter jejuni* y *Aeromonas*; en comparación con la diarrea secretora presenta un incremento exagerado de las secreciones del tubo digestivo, teniendo un mecanismo inflamatorio por invasión del epitelio intestinal presentando moco y leucocitos en heces. Los agentes que presentan diarrea secretora son la *Shigella spp*, *Entamoeba histolytica*, *E.coli enterohemorrágica*, *E. coli enteroinvasiva*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella entérica*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium difficile* y *Aeromonas spp* ⁽⁷⁾.

En la tabla 1 se muestran los agentes etiológicos más frecuentes según grupo etario (7)

	Adultos	Adultos mayores
Virus	Norovirus /Rotavirus	Norovirus
Bacterias	<i>E. coli enterotoxigenica</i> <i>Salmonella spp</i> <i>Shigella ssp</i> <i>Campylobacter</i> <i>Vibrio cholerae</i> <i>Clostridium difficile</i>	<i>E. coli enterotoxigenica</i> <i>E. coli enteropatógena</i> <i>Clostridium difficile</i> <i>Salmonella spp</i> <i>Shigella spp</i> <i>Vibrio cholerae</i>
Párasitos	<i>Giardia intestinalis</i> <i>Cryptosporidium ssp </i>	<i>Giardia intestinalis</i> <i>Cryptosporidium ssp </i>

Algunas de las características que presentan ciertas bacterias dentro de la patogenicidad son como el *Campylobacter jejuni* el cual es la primera causa diarrea bacteriana en Estados Unidos. Se transmite por vía fecal-oral a través del contacto con deyecciones de aves de corral, leche no pasteurizada y agua contaminada. Su periodo de incubación es de 3 a 6 días (7).

Shigella flexneri en México se presenta en el 60% y la *Shigella dysenteriae* tipo 1 predominan en países subdesarrollados. Son gérmenes invasores por excelencia, que rompen el epitelio y se acompañan de respuesta inflamatoria y ulceración de la mucosa. Después de un periodo de incubación de 1 a 4 días aparece fiebre, malestar, anorexia, vómito ocasional y una diarrea acuosa que progresa a la disentería en un lapso de pocas horas a varios días. Las manifestaciones extraintestinales, como el síndrome urémico hemolítico en los niños y la púrpura trombocitopénica trombótica en adultos, son infrecuentes (7).

Yersinia enterocolitica predomina en climas fríos y tiene un periodo de incubación de 3 a 7 días. Se encuentra en el norte de Europa, la península escandinava, Canadá, Estados Unidos y Japón. El cerdo es su mayor reservorio; causa

enterocolitis, diarrea prolongada (de 14 a 22 días) y excreción de la bacteria durante 7 semanas. En México, se desconoce la presencia de *Y. enterocolitica* ⁽⁷⁾.

Vibrio cholerae se caracteriza por el aspecto de la evacuación suele ser en “agua de arroz”. La mayoría de las infecciones son asintomáticas o se manifiestan de forma leve. La exotoxina colérica es el principal factor de virulencia. Otros factores de virulencia los conforman las adhesinas, el antígeno somático (O), pirógeno del lipopolisacárido, el antígeno H del flagelo, que permite la instalación de la bacteria en la mucosa del intestino delgado, las hemolisinas y la neuraminidasa ⁽⁷⁾.

Clostridium difficile es un bacilo Gram negativo, anaerobio estricto, formador de esporas, lo que le permite persistir en el ambiente. Es la causa más frecuente de diarrea bacteriana secretora en pacientes hospitalizados. Puede producir desde una diarrea leve hasta colitis pseudomembranosa y megacolon tóxico fatal; 25% de los casos de diarrea asociada al uso de antibióticos se atribuyen a este germen. La enterotoxina A induce quimiotaxis y producción de citocinas, estimula la hipersecreción de fluidos y lleva a necrosis hemorrágica. La toxina B (citotoxina) provoca la despolimerización de la actina con la pérdida del citoesqueleto celular. El factor de adhesión interviene en la unión a las células colónicas y la hialuronidasa promueve la actividad hidrolítica⁽⁷⁾.

Las *Aeromonas* puede sobrevivir a bajas temperaturas (-2 a 10°C) y producir diversos factores de virulencia en una variedad de productos alimenticios, como carne de res, cerdo, pescado congelado, queso y leche. La contaminación se produce por el contacto del alimento con agua en la que esté presente dicho microorganismo ⁽⁸⁾.

La *E. coli enterotoxigénica (ECET)* la cual se relaciona con la elaboración de una o más enterotoxinas (termolábil y termoestable), que no invaden ni dañan el epitelio intestinal, sino que actúan alterando el mecanismo celular de AMP cíclico y guanilato-ciclasa, desencadenando una diarrea osmótica. La toxina termolábil altera el tránsito intestinal; la termoestable aumenta la secreción. Estos gérmenes se asocian a la mitad de los casos de diarrea del viajero. Tienen un período de incubación corto 14 a 30 horas. El grupo de *E. coli enteroinvasivo (ECEI)* se distingue porque sus características genéticas, bioquímicas y clínicas son muy parecidas a las de *Shigella*, por lo que causa diarrea sanguinolenta en niños y adultos (cuadros de enterocolitis). Son bacterias móviles, no fermentadoras de lactosa. Las cepas de *E. coli enterohemorrágico (ECEH)* producen potentes citotoxinas, semejantes a la toxina de Shiga, que causan colitis hemorrágica y eventualmente síndrome urémico hemolítico en 5 a 10% de los afectados (anemia hemolítica microangiopática, insuficiencia renal y trombocitopenia). Estas bacterias se hallan en 20 a 30% de pacientes que presentan diarrea con sangre. Se produce de 3 a 9 días después de haber ingerido el alimento ⁽⁸⁾.

La *Salmonella typhi* y *Salmonella paratyphi* son bacilos Gram negativos que sólo colonizan al ser humano. Su periodo de incubación varía de 5 a 21 días ⁽⁸⁾.

Respecto a las enfermedades infecciosas intestinales de origen viral se presentan en el 90%, fundamentalmente por el rotavirus siendo el virus más frecuente y peligroso por los altos índices de deshidratación que ocasiona, y es la infección más frecuente durante los meses fríos y secos ⁽⁹⁾.

El agente *Norwalk* fue el primer virus que se identificó como causante de gastroenteritis en humanos, los norovirus son ahora reconocidos como la principal causa de epidemias de gastroenteritis, esporádica tanto en niños como en adultos, es generalmente leve y de corta duración. Período de incubación de 12 a 48 horas ⁽¹⁰⁾. El *Vibrio parahaemolyticus* es auto-limitante. El inicio suele ocurrir dentro de las 24 horas de comer alimentos contaminados. La patogenicidad de este microorganismo se atribuye a la producción de una hemolisina directa termoestable ⁽¹¹⁾.

La presentación clínica de la diarrea acuosa es la forma más común de gastroenteritis se caracteriza por evacuaciones frecuentes, líquidas, abundantes. A comparación con la diarrea invasiva o disentería la cual comienza con evacuaciones frecuentes, de menor volumen pueden contener sangre, moco y/o pus. Se presenta habitualmente con fiebre, malestar general, dolor abdominal, vómito y diarrea; como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2.-

ETIOLOGIA	PRESENTACION CLINICA
<i>Rotavirus</i>	Incuba 1-3 días. Fiebre, vómito y diarrea dura habitualmente 3-7 días
<i>Norovirus</i>	Incuba 12-48 horas, Vómito y diarrea. Dura 2-5 días. Fiebre ocasional.
<i>Shigella spp</i>	Incuba 12-48 horas. Fiebre, anorexia, náusea, dolor abdominal, diarrea acuosa y autolimitada.
<i>Campylobacter spp.</i>	Incuba 1-7 días. Diarrea acuosa o disentería. Fiebre, dolor abdominal → Guillan Barré.
<i>Clostridium difficile</i>	Se asocia a diarrea acuosa o disentería, podrían aparecer pseudomembranas. Fiebre y deshidratación severa.

Diagnóstico

Los antecedentes epidemiológicos (edad, historia reciente de viajes fundamentalmente a países tropicales, aparición esporádica o como parte de un brote, tipo de alimento sospechoso, periodo de incubación), la existencia de factores predisponentes (inmunosupresión), la presencia de signos y síntomas clínicos (fiebre, dolor abdominal, náuseas y vómitos), y el tipo de diarrea (acuosa o disintérica) pueden orientar para identificar al microorganismo implicado. No obstante, el diagnóstico definitivo solo se puede obtener mediante pruebas de laboratorio ⁽¹¹⁾.

Dentro de las técnicas convencionales de laboratorio el coprocultivo sigue siendo el estándar de oro para los enteropatógenos bacterianos, a pesar de que tiene una sensibilidad relativamente baja y es laborioso. Puede tardar hasta tres días el resultado y no ser tan sensible como los métodos basados en pruebas moleculares. El rendimiento diagnóstico de cultivos fecales oscila entre 1.5% y el 5.6%; los métodos como el examen de microscopía electrónica (EM) y los ensayos inmunológicos son poco sensibles y no están disponibles para todos los patógenos; se han utilizado para virus como el *norovirus*, *rotavirus* y *adenovirus*; debido a que no se pueden cultivar ⁽¹²⁾.

Dentro de las nuevas herramientas diagnosticas establecidas para la detección del agente etiológico en las infecciones gastrointestinales, la reacción de la cadena de polimerasa (PCR) multiplex es una herramienta establecida la cual intenta de manera simultánea detectar e identificar los patógenos ⁽¹³⁾. La prueba está diseñada para analizar el DNA o RNA de los virus, bacterias y parásitos directamente de muestras de heces y producir resultados en un plazo más corto que las técnicas de microbiología tradicionales, que pueden implicar múltiples pruebas y cultivo de microorganismos ⁽¹⁴⁾.

Existen diferentes paneles moleculares de diarrea entre ellos se encuentra el Seeplex, Luminex xTAG, ImmunoCard Stat Campy ⁽¹⁴⁾.

El panel de diarrea Seeplex tiene la característica de hacer la detección simultánea de virus y / o bacterias causantes de diarrea directamente. Tiene alta sensibilidad y especificidad mediante la aplicación de la tecnología oligonucleótido de doble cebado (DPO), sistema preciso para la interpretación de los resultados y tiene el sistema de prevención de contaminación ⁽¹⁵⁾.

Realiza el análisis en 3 grupos como se muestra en la tabla 3.-

Tabla 3.- Sistema seeplex

Panel de virus (Panel V)	Panel 1 Bacteriano (Panel B1)	Panel 2 Bacteriano (Panel B2)
-Rotavirus Grupo A	-Salmonella spp (S. bongori, entérica)	-Clostridium perfringens
-Adenovirus entérico	-Shigella spp (S. flexneri, boydii, sonnei, dysenteria)	-Yersinia enterocolitica
-Norovirus GI/GII	-Vibrio spp (V. cólera, V. parahemolitico)	-Aeromonas spp.
-Astrovirus	-Campylobacter spp(C. jejuni)	- E. coli O157:H7
	-Clostridium difficile Toxina B	-E. coli productor en verocitotoxina

Varios estudios se han realizado con el sistema Seeplex en el cual Coupland detectó 81 patógenos en 75 muestras, este proporciona una capacidad diagnóstica adicional significativa para el diagnóstico sindrómico de la gastroenteritis aguda con una mayor sensibilidad para la mayoría de los patógenos. Así mismo en un estudio retrospectivo realizado por Higgins y colegas comparo el Panel de Virus de Diarrea de Seeplex con PCR en tiempo real mostrando sensibilidades diagnósticas estimadas del 100% para *adenovirus*, *rotavirus* y *norovirus GI* y 97% para *norovirus GII*. El ensayo identificó coinfecciones virales en el 6,8% de las muestras de heces examinadas en este estudio. El tiempo total de respuesta observado para un ensayo de 96 muestras fue de 9 a 10 horas. El panel de detección de la Diarrea-B1 también se evaluó por su capacidad para detectar especies de *Campylobacter* en muestras de heces en comparación con el cultivo y los inmunoensayos ⁽¹⁵⁾.

Luminex xTAG (Luminex Molecular Diagnostics, Toronto, Canadá) es una prueba molecular multiplex capaz de detectar simultáneamente *adenovirus*, *rotavirus A*, *norovirus GI / GII*, *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.* (*Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* y *Campylobacter lari*), *Shigella spp.*, *Shigella boydii*, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri* y *Shigella dysenteriae*), *Clostridium difficile*, *Escherichia coli enterotoxigénica (ETEC)*, *E. coli enterohemorrágica (EHEC) O157*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholera*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* y *Cryptosporidium spp.* (*Cryptosporidium parvum* y *Cryptosporidium hominis*). Este método tiene un tiempo de respuesta de aproximadamente 5 horas e incluye etapas separadas de extracción, amplificación e hibridación de ácido nucleico ⁽¹⁶⁾. En la figura 1 se muestra el proceso de la muestra. Halligan et. al el cual comparo la prueba Luminex con las pruebas convencionales durante 8 meses para determinar la precisión diagnóstica, los tiempos de respuesta, los costos de laboratorio, el uso

de las instalaciones de aislamiento y la aceptabilidad del usuario. Un total de 262 pacientes (12%) tenían un patógeno detectado por métodos convencionales en comparación con 483 (22,1%) por el perfil molecular. El tiempo de respuesta fue de 41,8 horas más rápido que el cultivo bacteriano que duro 66.5 horas y la investigación de parásitos 66.5 horas, pero más lento que el ensayo convencional para *Clostridium difficile* de 17.3 horas y los virus con 27 horas ⁽¹⁷⁾.

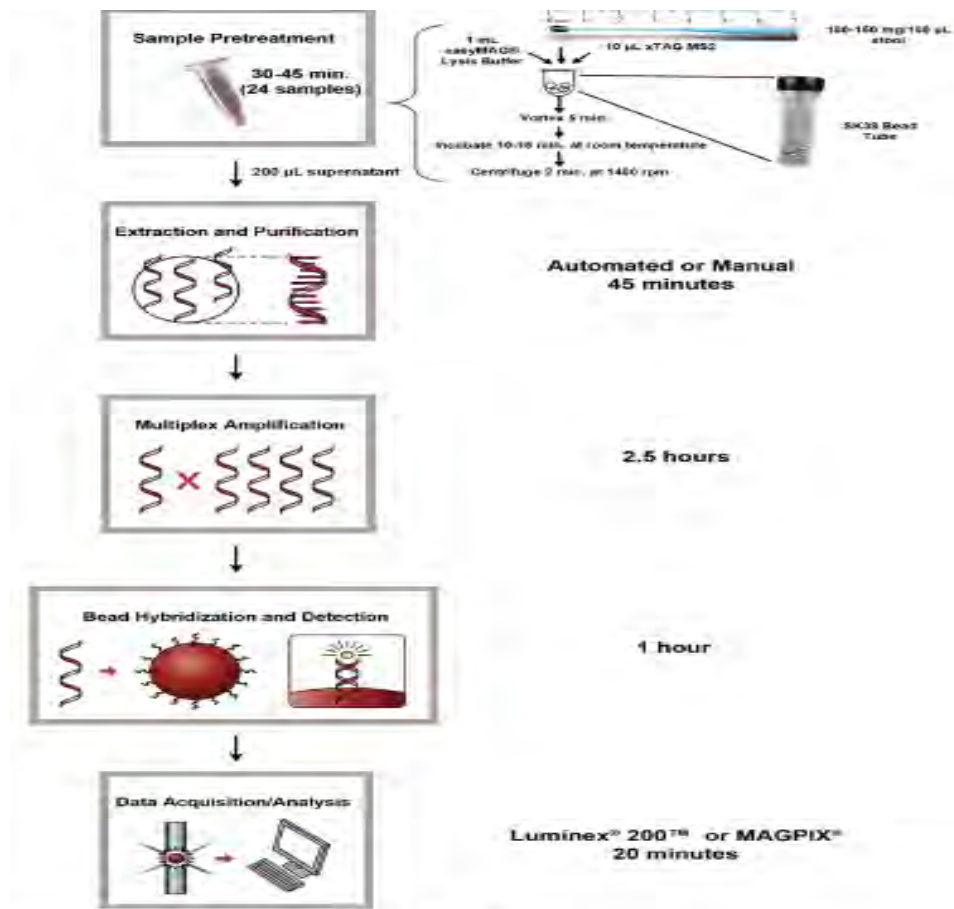


Fig. 1. Overview of the xTAG GPP assay workflow.

Figura 1.

En el estudio que se realizó por G.N. McAuliffe et al. en pacientes con gastroenteritis aguda usando el panel molecular observaron el aumento de la detección de patógenos gastroentéricos de 18% a 30%. Así mismo Mona Z Zaghloul, et.al reportan la sensibilidad de la PCR múltiplex fue mayor que la de las pruebas ELISA y ImmunoCard Stat Campy (100%, 95,6% y 86,9%, respectivamente), mientras que la ImmunoCard Stat Campy tuvo mayor especificidad que la prueba de ELISA y Multiplex PCR (98,7%, 98,1% y 97,9%, respectivamente) ⁽¹⁸⁾.

Las principales ventajas de las pruebas moleculares para diagnosticar la gastroenteritis son que el rendimiento diagnóstico el cual se incrementa principalmente para algunos microorganismos específicos tales como *Shigella*, *Campylobacter*, *C. difficile toxigénico*, *Giardia*, etc; mejora el tiempo de trabajo ya que los métodos convencionales para aislar las bacterias pueden tardar más de 24 horas y con estos enfoques moleculares el tiempo de respuesta está entre 1 y 5 horas dependiendo del método utilizado; el tiempo de intervención también se reduce ya que las bacterias, los virus y los parásitos pueden detectarse en un panel, lo que reduce considerablemente el tiempo necesario para los métodos convencionales que implican cultivos, la preparación de muestras para visualizar los parásitos mediante microscopía o las herramientas utilizadas para detectar virus tales como inmunocromatografía; pueden tener un impacto en el control y los costos de la infección. Los ensayos basados en PCR muestran una alta especificidad y sensibilidad ⁽¹⁹⁾.

En comparación con las técnicas como la microscopía y ELISA, el ensayo multiplex PCR ofrece resultados atractivos, un tiempo de respuesta optimizado y es capaz de hacer una rápida identificación de la ameba patógena *E. histolytica* ⁽²⁰⁾.

Sin embargo, varios de estos métodos moleculares pueden tener algunas desventajas, como algunos microorganismos pueden ser eliminados en las heces durante varias semanas después de la infección y la PCR detecta bajos niveles del microorganismo, puede no ser clínicamente relevante, los umbrales cuantitativos para diferenciar infecciones sintomáticas y asintomáticas han sido estimados para algunos enteropatógenos; no ofrecen susceptibilidad antibacteriana y el costo es elevado ⁽²¹⁾.

Dunbar et al. Realizaron una comparación de los métodos de laboratorio para la detección e identificación de los patógenos que causan gastroenteritis ⁽²²⁾.

Tabla 4.- Diferentes métodos diagnósticos.

Método de prueba	Aplicabilidad actual	Cobertura de patógenos	Ventajas	Desventajas
Microscopia electrónica	D	Virus; tal como norovirus	Rápido	Aplicación limitada, subjetivo, menos específico

Cultivo	A	Bacterias como Salmonella y Shigella	Gold estándar, antibiograma	Resultado tardado
Antígeno rápido	B	Virus, bacterias y algunas toxinas	Rápido	Sensibilidad variada /Antígeno por prueba
Multiplex	A-C	Rango de patógenos de interés	Alta sensibilidad y especificada. Proporciona múltiples respuestas	La sensibilidad para cada patógeno puede ser variada; inhibidores relacionados con falsos negativos.

A) ensayos utilizados rutinariamente en el diagnóstico clínico B) los ensayos utilizados rutinariamente en el diagnóstico clínico con un rendimiento limitado C) ensayos con potencial para ser utilizados en el diagnóstico clínico; D) Ensayos disponibles sólo en investigación y no disponibles en el diagnóstico clínico.

Previamente el inmunoensayo enzimático era el estudio más utilizado para establecer el diagnóstico de infección por *Clostridium Difficile*, debido a que es una prueba rápida y fácil de realizar, no obstante, recientemente muchos hospitales han adoptado en sus laboratorios pruebas PCR multiplex basadas en ADN para detección de cepas toxigénicas, reportando una mayor sensibilidad y especificidad en comparación con ELISA. Esto es para confirmar el *Clostridium difficile* como la causa de la infección, ya que es la toxina producida por el patógeno que resulta la causante de la enfermedad gastrointestinal más que en la presencia del propio patógeno; la PCR puede detectar la presencia del gen de la toxina pero no puede confirmar que el gen se expresa y consecuentemente, que la toxina ha sido producida ⁽²³⁾.

Respecto a la infección por *Clostridium Difficile* la endoscopia generalmente está reservada para situaciones especiales. El Colegio Americano de Gastroenterología (ACG) recomienda realizar endoscopia cuando es necesario establecer un diagnóstico rápido, cuando existe retraso en la obtención de resultados de estudios de toxinas, cuando existe un resultado inicial negativo en un paciente con elevada sospecha, cuando no hay disponibilidad de muestra de materia fecal en presencia de íleo y para descartar otros diagnósticos diferenciales ⁽²⁴⁾. Los hallazgos

endoscópicos característicos son presencia de placas blanquecinas (pseudomembranas) que varían de 10 hasta 20 mm. En casos avanzados pueden ser confluentes, dejando una zona de denudación en la mucosa subyacente. La mucosa circundante entre las placas puede ser normal, eritematosa o edematosa (25).

Los diagnósticos diferenciales para la gastroenteritis incluyen infecciones no gastrointestinales (por ejemplo, neumonía, infección del tracto urinario o VIH), síndrome del intestino irritable, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad celíaca, efectos secundarios de los medicamentos, endocrinopatía (por ejemplo, diabetes o hipertiroidismo) y tumores secretores (26).

Tratamiento

La gastroenteritis infecciosa suele ser autolimitada y el tratamiento no es necesario. Sin embargo, se puede incluir medicamentos antidiarreicos no se recomienda si una persona tiene sangre o moco en las evacuaciones o fiebre, el diagnóstico ya sea confirmado o sospechado de *Escherichia coli* O157, *Shigella* o *Clostridium difficile*; los medicamentos antieméticos se recomiendan para controlar los síntomas, dependiendo del patógeno causante. Los antibióticos no son apropiados si la diarrea es de patología desconocida. Si el patógeno causante ha sido microbiológicamente confirmado, se pueden recomendar antibióticos para la *Entamoeba histolytica*, *Campylobacter*, *Giardia*, *Shigella* y *Clostridium difficile* (27).

De acuerdo a las guías de práctica clínica mexicanas recomiendan el tratamiento farmacológico específico para cada agente causal identificado (28). Ver tabla 5.

Tabla 5.-

Patógeno	Recomendaciones para adultos
<i>Shigella sp.</i>	Ciprofloxacino 500 mg dos veces al día. Por 1-3 días. Alternativa: Alternativa: trimetoprim/sulfametoxazol 800/160 mg dos veces al día
<i>Salmonella sp, especies no typhi</i>	Trimetoprim/sulfametoxazol 800/160 mg; ciprofloxacino 500 mg dos veces al día durante cinco a siete días.
<i>E. coli</i>	Ciprofloxacino, 500 mg dos veces al día. Tratamiento de uno a tres días

	Alternativa: trimetoprim/sulfametoxazol 800/160 mg durante siete días.
<i>Yersinia sp.</i>	Doxiciclina 300 mg y aminoglucósidos. Alternativa: trimetoprim/sulfametoxazol.
<i>Vibrio cholerae</i>	Dosis única de doxiciclina, 300 mg. Tetraciclinas, 500 mg cuatro veces al día durante tres días. Alternativa: ciprofloxacino, dosis única.

El metronidazol y la vancomicina oral han sido la base del tratamiento de la infección *Clostridium difficile* desde 1970, a pesar de su utilización por millones de pacientes, no se ha reportado resistencia significativa a ninguno de estos fármacos. Para el tratamiento de enfermedad grave, la vancomicina ha demostrado tener mayor eficacia comparado con el metronidazol, no obstante, para infección leve a moderada, ambos antibióticos han mostrado eficacia equivalente ⁽²⁹⁾.

Medidas preventivas contra la gastroenteritis aguda.

De acuerdo a las guías de práctica clínica recomiendan:

- El lavado de manos se asocia con una disminución del riesgo de prevención de diarrea en la población general en un 80 % de los casos.
- Estar en constante vigilancia de alimentos tales como huevos y sus derivados; de la carne de ave inadecuadamente preparada ya que son motivo de diarreas producidas por *Salmonella*.
- Hervir la leche no pasteurizada (cruda) puesto que se expone a contaminación por ciertos agentes bacterianos.

Sin embargo, respecto a la infección por *Clostridium difficile* este es un organismo se encuentra en las unidades de cuidados a la salud, identificando presencia de esporas viables frecuentemente en las manos y estetoscopios del personal de salud, así como en las camas, teléfonos, baños y muebles de cama ⁽³⁰⁾. El uso de soluciones con base de alcohol para la higiene de manos no ha demostrado ser una medida suficiente para reducir el número de esporas viables de *Clostridium difficile*, por lo que actualmente la recomendación es la técnica adecuada de lavado de manos con agua y jabón. De acuerdo a las recomendaciones de la CDC todo paciente con presencia o sospecha debería ser aislado en una habitación individual y el personal de profesionales de la salud debería utilizar guantes, cubrebocas,

además de las medidas de higiene de manos establecidas por la unidad hospitalaria; también se recomienda la desinfección exhaustiva de la habitación con cloro después del egreso del paciente ⁽³¹⁾.

3. JUSTIFICACIÓN

La gastroenteritis aguda continúa siendo un problema de salud pública, se calcula que anualmente ocurren entre 6 y 60 mil millones de casos en el mundo, 15% de las cuales son de origen bacteriano. Es una carga importante para los servicios de salud, con los costos socioeconómicos asociados estimados en €345 millones en los Países Bajos, \$ 343 millones en Australia y \$ 3.700 millones en Canadá ⁽¹⁾. En México es una de las primeras causas de consulta médica y también una de las primeras causas de muerte, afectando a personas de cualquier edad y condición social, aunque los grupos más vulnerables son los niños y los ancianos.

Es difícil diferenciar entre los agentes etiológicos virales, bacterianos y parasitarios ya que los síntomas son similares. De hecho, el 80% de todos los casos de diarrea los gérmenes no son identificados y los antibióticos que se utilizan a menudo son de forma inadecuada ⁽⁵⁾.

En nuestro país actualmente para el diagnóstico etiológico de la diarrea aguda se utilizan métodos convencionales como el coprocultivo y coproparasitoscopico, los cuales tienen como defecto ser consumidores de tiempo y no tener una sensibilidad y especificidad adecuada; además de no poder detectar virus. El perfil molecular de diarrea (PMD/seeplex) por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) detecta agentes etiológicos como el *adenovirus*, *astrovirus*, *norovirus GI*, *norovirus GII*, *rotavirus Grupo "A"*, *aeromonas spp*, *campylobacter spp*, *clostridium difficile toxina B*, *clostridium perfringens toxina*, *E. coli enterotoxigenica*, *E.coli 0157*, *E coli H7*, *Salmonella spp*, *Shigella spp*, *Vibrio spp*, *Yersinia enterocolitica* en heces fecales por lo que es importante conocer la capacidad diagnóstica de este método. Consideramos necesario identificar los patógenos más frecuentes de diarrea aguda en nuestra población de estudio por métodos más rápidos y valorar su eficacia diagnóstica con algún método convencional (coprocultivo).

4. OBJETIVO

Objetivo Primario

1.- Determinar los gérmenes más frecuentes encontrados por medio del perfil molecular de diarrea en pacientes hospitalizados por diarrea aguda en el Hospital Español de enero del 2013 a diciembre de 2016.

Objetivo secundario

1.- Evaluar la eficacia diagnostica del perfil molecular de diarrea comparado con el resultado del coprocultivo en heces fecales durante su hospitalización.

5. HIPOTESIS

Nos formulamos la siguiente pregunta.

¿El perfil molecular de diarrea tiene la capacidad de detectar el germen productor de la diarrea aguda en el paciente adulto que requirió hospitalización?

6. CRITERIOS OPERACIONALES

Edad: Tiempo transcurrido desde el nacimiento hasta la fecha de presentación del evento en el expediente clínico, expresado en años.

Sexo: Características biológicas que definen a un ser humano como hombre o mujer, expresado numéricamente, 0 correspondiendo a femenino y 1 correspondiendo a masculino.

Diagnóstico de ingreso: Se refiere al diagnóstico con el cual el paciente fue ingresado a hospitalización, este fue tomado de la hoja de ingreso correspondiente al internamiento en el cual el paciente presento el evento.

Medicación actual: Se refiere a si el paciente antes del internamiento consume algún antibiótico.

Medicación previa: Se refiere a si el paciente previo al internamiento ha consumido algún fármaco relevante para el estudio, en este caso antibióticos.

Comorbilidades: Se define como la presencia de uno o más trastornos o enfermedades, además del trastorno o de la enfermedad primaria, en todos los apartados se expresa numéricamente, 0 correspondiendo a negativo y 1 correspondiendo a positivo.

- a) Cardiovascular: Se define como la afección a dicho sistema.
- b) Neoplásica: Se define como la historia o presencia actual de una neoplasia maligna o cáncer.
- c) Endocrinológica: Afección algún órgano dependiente del sistema endócrino.

Gastroenteritis infecciosa: Se define por la existencia de los siguientes hallazgos:

1. Presencia de diarrea, definida como 3 o más evacuaciones no formadas o más de 200 ml en ≤ 24 horas consecutivas.

Estancia hospitalaria: Se define como el tiempo desde que ingresa el paciente al hospital hasta que es dado de alta o fallece.

7. VARIABLES DEL ESTUDIO

Variable	Tipo de Variable	Fuente de la información
Edad	Cuantitativa discreta	Expediente Clínico
Sexo	Dicotómica	Expediente Clínico
Diagnóstico de Ingreso	Nominal politómica	Expediente Clínico
Medicación previa	Nominal politómica	Expediente Clínico
Medicación actual	Nominal politómica	Expediente Clínico
Perfil molecular de diarrea	Nominal politómica	Expediente Clínico
Coprocultivo	Nominal politómica	Expediente Clínico
Comorbilidades	Politómica	Expediente Clínico

Antibiograma	Nominal politómica	Expediente clínico
Coproparasitoscopico	Nominal politómica	Expediente clínico
Fiebre	Dicotómica	Expediente clínico
Biometría Hemática	Nominal politómica	Expediente clínico
Química sanguínea	Nominal politómica	Expediente clínico
Electrolitos	Nominal politómica	Expediente clínico
Toxinas A-B	Dicotómica	Expediente clínico
Tratamiento empírico médico	Nominal politómica	Expediente clínico
Cambio de tratamiento	Dicotómica	Expediente clínico
Estancia hospitalaria	Nominal politómica	Expediente clínico

8. CLASIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

El estudio es, observacional, descriptivo y transversal en el cual se incluyen un grupo de pacientes con diagnóstico de Gastroenteritis aguda durante su estancia en el Hospital Español de México. El área de estudio que busca abarcar este protocolo es la investigación clínica que busca generar conocer la efectividad de pruebas diagnósticas en este tipo de patología.

9. MATERIAL Y MÉTODOS

Selección de la población:

Criterios de inclusión: Pacientes mayores de 18 años de edad que hayan sido hospitalizados por gastroenteritis aguda en el Hospital Español de México en el período comprendido entre enero 2013 a diciembre del 2016, que cuenten con diagnóstico clínico y con la prueba de PCR (perfil molecular de diarrea) con o sin tratamiento previo por su padecimiento actual.

Criterios de exclusión: Pacientes con diarrea crónica, antecedente de uso de laxantes, con síndrome de intestino irritable mixto, si tiene inmunodeficiencia o uso

de terapia inmunosupresora; portadores de insuficiencia pancreática y que no cuenten con el PMD.

Criterios de eliminación. Pacientes con datos incompletos en el expediente clínico.

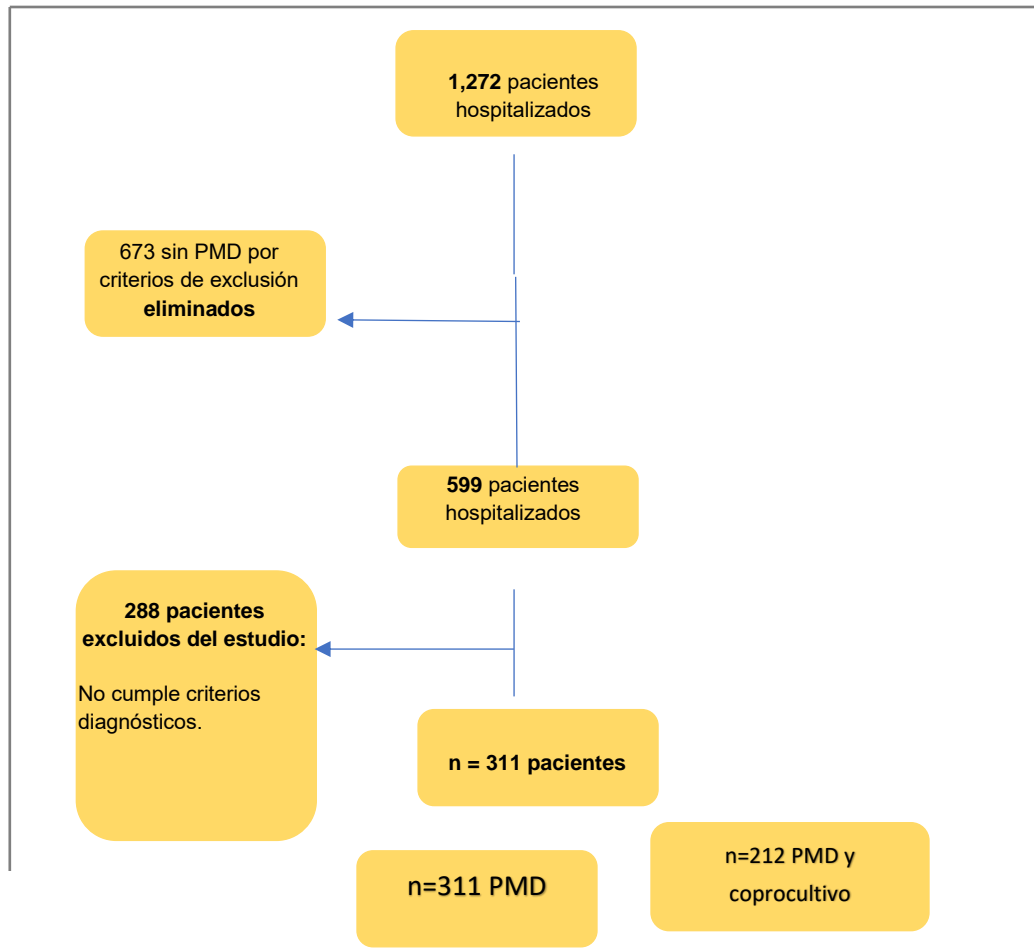


Figura 2. Criterios de eliminación y exclusión.

Tamaño de la muestra:

Por la naturaleza del estudio la muestra es de 311 pacientes.

10. DESCRIPCION DEL PROCESO

Se realizó una revisión sobre los pacientes que acuden al servicio de urgencias por diarrea aguda encontrando un total de 3155 pacientes, de los cuales se hospitalizaron 1272. De estos, se eliminaron los que no cumplieron con los criterios de inclusión durante el periodo mencionado. Finalmente se analizaron 311 pacientes con perfil molecular de diarrea (PMD) con fines descriptivos de los gérmenes detectados por este medio, utilizando el sistema Seeplex el cual detecta *adenovirus*, *astrovirus*, *norovirus GI*, *norovirus GII*, *rotavirus Grupo "A"*, *aeromonas spp*, *campylobacter spp*, *clostridium difficile toxina B*, *clostridium perfringens toxina*, *E. coli enterotoxigenica*, *E.coli 0157*, *E coli H7*, *Salmonella spp*, *Shigella spp*, *Vibrio spp*, *Yersinia enterocolitica* en heces fecales. Se realizó un segundo análisis con los pacientes con PMD que además contaban con coprocultivo para análisis de concordancia entre los dos estudios, siendo el coprocultivo el estudio "estándar de oro". Se registraron también los datos demográficos, clínicos y de laboratorio, así como el tratamiento empleado.

11. ANALISIS ESTADÍSTICO E INTERPRETACIÓN DE LOS DATOS

Se realizó análisis exploratorio para observar coherencia de la información y datos perdidos. No fue necesario imputar información dado que la base de datos estaba completa.

Se realizó análisis descriptivo de la siguiente manera: las variables cuantitativas se describieron con media \pm desviación estándar o mediana y rango intercuartílico de acuerdo a la distribución. Las variables cualitativas se describen como frecuencias absolutas y porcentajes.

Para el análisis comparativo de acuerdo al grupo de edad se usó chi cuadrada o prueba exacta de Fisher en caso de frecuencias esperadas menor a 5. Y para el análisis de concordancia se determinó el valor de Kappa de Cohen.

Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$

Se utilizó el programa Stata SE versión 14.0.

12. CONSIDERACIONES ÉTICAS

El protocolo no presenta ningún conflicto ético ya que por ser estrictamente observacional y descriptivo no se realizará ningún tipo de intervención.

13. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

La carta de consentimiento informado no aplica para el protocolo actual ya que es estrictamente observacional y descriptivo.

14. CRONOGRAMA

- Marzo-Abril 2017: Revisión del proyecto.
- Mayo 2017: Envío a los Comités. Captura de expedientes.
- Mayo-Julio 2017: Descripción y análisis de la información.
- Julio 2017: Reporte de resultados.

15. RESULTADOS.

Del 03 de enero del 2013 al 31 de diciembre del 2016 se analizaron 1272 pacientes los cuales fueron hospitalizados por Gastroenteritis aguda. 311 pacientes fueron incluidos en el estudio por cumplir los criterios de inclusión, 177 (57%) fueron mujeres. La edad promedio de los pacientes fue 50 ± 20 años. De los 311 pacientes que tenían PMD, 212 contaban además con coprocultivo. El perfil molecular de diarrea detectó en 177 pacientes (57%) el DNA de un microorganismo, en 55 pacientes (18%) el DNA de dos microorganismos, en 5 pacientes (1%) el DNA de 3 microorganismos; sin embargo, en 74 pacientes (24%) no se detectó ningún microorganismo.

Los gérmenes detectados por el perfil molecular en el grupo de las bacterias predominaron *Shigella spp.* en 71 pacientes (23%), *C. perfringens* 49 pacientes (16%), *Salmonella spp* en 38 (12%), *C. difficile* 25 (8%), *Campylobacter spp* 22 (7%), *Aeromonas spp.* 21 (7%), *E. coli* 0157 9 pacientes (3%), *E. coli enterotoxigenica* 5 (2%) y *Vibrio spp* 3 (1%) pacientes.

En el grupo de los virus predominaron *Norovirus GII* 27 (9%), *Rotavirus* 13 (4%), *Adenovirus* 10 (3%) y *Norovirus GI* 8 (3%). Ver tabla 6.

Tabla 6. Características basales de la población.

Variable	Población total (n=311)
Sexo femenino	177 (57%)
Sexo masculino	134 (43%)
Edad (años)	50 ± 20
Número de microorganismos detectados por PCR	
0	74 (24%)
1	177 (57%)
2	55 (18%)
3	5 (1%)

Resultados de PCR (microorganismo individual)	
<i>Rotavirus Grupo "A"</i>	13 (4%)
<i>Adenovirus</i>	10 (3%)
<i>E. coli O157</i>	9 (3%)
<i>Norovirus GI</i>	8 (3%)
<i>Norovirus GII</i>	27 (9%)
<i>Shigella spp</i>	71 (23%)
<i>Aeromonas spp</i>	21 (7%)
<i>E. coli enterotoxigénica</i>	5 (2%)
<i>Campylobacter spp</i>	22 (7%)
<i>Clostridium difficile</i>	25 (8%)
<i>Clostridium perfringens</i>	49 (16%)
<i>Salmonella spp</i>	38 (12%)
<i>Vibrio spp</i>	3 (1%)
Ninguno detectado	75 (24%)

De los 311 pacientes con PMD, 212 (68%) tenían registro de coprocultivo reportando biota normal en 168 pacientes (79%), *Salmonella spp* 24 (11%), *Shigella spp* 19 (8%) y *Plesiomonas* 1 (2%). De ellos se reportaron antibiograma en 45 muestras (21%), teniendo sensibilidad antimicrobiana a ciprofloxacino en 34 (11%), ampicilina/sulbactam 7 (2%), ciprofloxacino+meropenem 3 (1%) y 1 (<1%) sin reporte de sensibilidad.

Por otro lado 216 (69%) pacientes de los 311 contaban con resultado de coproparasitoscópico, de los cuales 210 (67%) fue negativo, se reportó *Blastocystis hominis* en 3 pacientes (1%), *Entamoeba coli* 1 (<1%), *Entamoeba histolytica* 2 (1%); estos resultados no se usaron para el análisis.

Además, 205 (66%) de los 311 pacientes contaban con resultados de coprológico: reportando moco en 85 (41%), sangre 62 (30%), leucocitos 60(29%) y eritrocitos en 38 (19%). Ver tabla 7.

Tabla 7.-

Con cultivo	212 (68%)
Resultados coprocultivo	
Biota normal	168 (54%)
<i>Salmonella spp</i>	24 (8%)
<i>Shigella spp</i>	19 (6%)
<i>Plesiomonas</i>	1 (<1%)
Sin cultivo	99 (32%)
Resultado coproparasitoscópico	
No tiene	95 (31%)
Negativo	210 (67%)
<i>Blastocys hominis</i>	3 (1%)
<i>Entamoeba coli</i>	1 (<1%)
<i>Entamoeba histolytica</i>	2 (1%)
Con coprológico	205 (66%)
Resultado coprológico	
Moco	85/205 (41%)
Sangre	62/205 (30%)
Leucocitos microscópicos positivos	60/205 (29%)
Eritrocitos microscópicos positivos	38/205 (19%)

Con respecto a las comorbilidades más frecuentemente identificadas en este estudio, registramos hipertensión arterial sistémica en 32 pacientes (10%) y diabetes mellitus tipo 2 en 11 pacientes (4%).

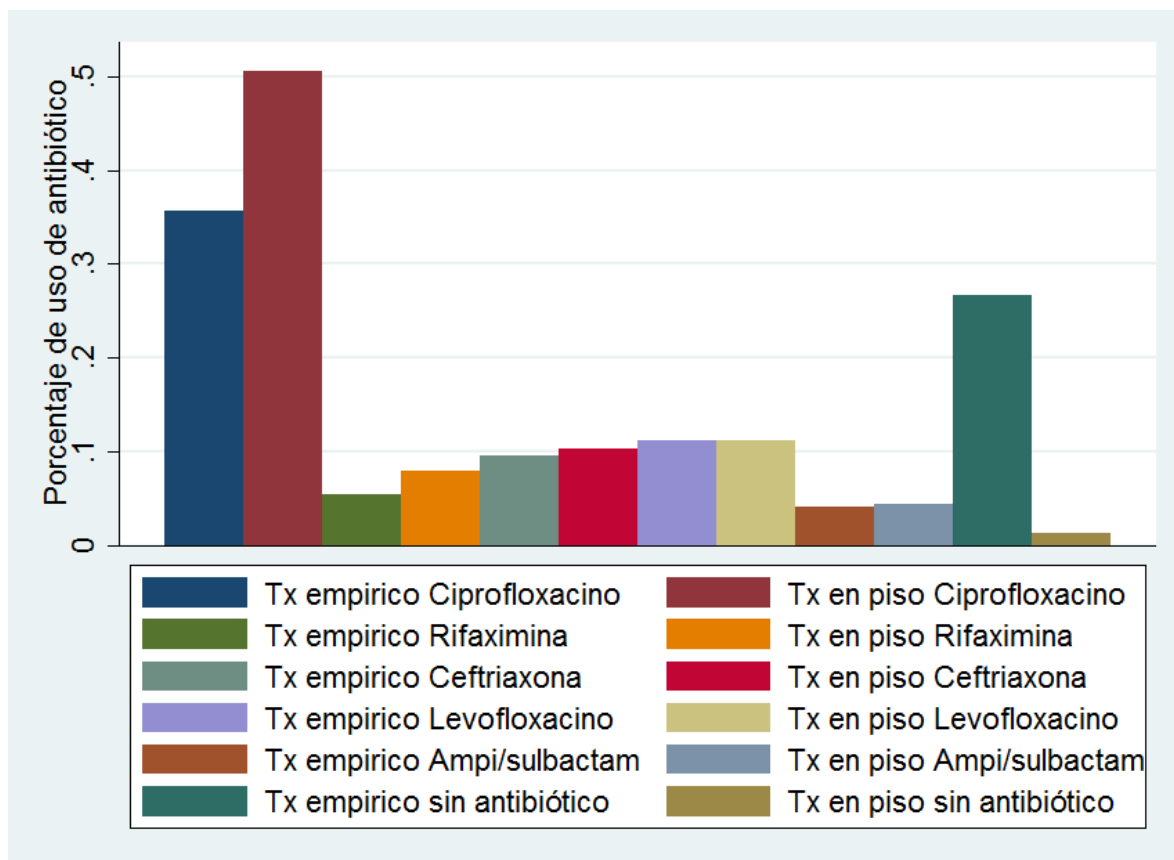
En cuanto al tiempo de duración de la diarrea en día, tuvieron una media de 2 días (1-3). El número de evacuaciones se dividieron en 3 grupos: de 1-5 evacuaciones 38 (12%) pacientes, de 6-10 evacuaciones 120 (39%) y más de 10 evacuaciones por día 153 (49%).

De los 311 pacientes incluidos en el estudio 40(13%) estaban tomando antibiótico, 24 (8%) por gastroenteritis y 16(5%) por otra enfermedad. Ciprofloxacino fue el más frecuente 13 (4%), seguido de cefalosporinas 8 (3%) otros antibióticos 20 (6%).

Presentaron fiebre 65 (21%) pacientes; leucocitosis ($>10,000$) en 137 (44%) pacientes, neutrofilia 96 (31%), bandas $>4\%$ fueron 255 (82%), linfopenia 134 (43%), BUN 16 ± 10 , creatinina 0.99 ± 0.47 , sodio 137 ± 3 , potasio 3.7 ± 0.5 , cloro 106 ± 4 .

De los pacientes hospitalizados en urgencias se inició tratamiento con mediadas de soporte 83 (27%). Después de la toma de la muestra de heces para el PMD y coprocultivo se inició antibiótico empíricamente con quinolonas en 146 (47%), cefalosporinas 30 (10%), Rifaximina 17 (5%), Ampicilina/Sulbactam 13 (4%) y otros antibióticos 22 (7%).

Figura 3. Tratamiento antibiótico utilizado de manera empírica (en urgencias) y en piso.



Posteriormente a su internamiento el 44% de los pacientes tuvieron modificación en favor a administrar un antibiótico de manera empírica de acuerdo a la evolución de su padecimiento.

Finalmente en los 212 pacientes que contaban PMD más coprocultivo, que participaron en el análisis de concordancia, el resultado de Kappa fue para *Salmonella spp* 0.720 y para *Shigella spp* 0.38, ambas con una $p < 0.001$, el resto de los gérmenes no tuvieron concordancia entre ambos estudios.

Tabla 8. Detección de patógenos por métodos convencionales (coprocultivo) y PCR en los pacientes en que se solicitaron ambos estudios.

Patógeno	Convencional positivo	%	PCR positivo	%	Número total de pacientes	Kappa (concordancia)	Valor de p de Kappa
<i>Rotavirus</i>	0	0	7	3.30	212	---	---
<i>Adenovirus</i>	0	0	6	2.83	212	---	---
<i>E. coli O157</i>	0	0	7	3.30	212	---	---
<i>Norovirus GI</i>	0	0	6	2.83	212	---	---
<i>Norovirus GII</i>	0	0	15	7.08	212	---	---
<i>Shigella spp</i>	19	8.96	58	27.36	212	0.384	<0.001
<i>Aeromonas spp</i>	0	0	14	6.60	212	---	---
<i>E. coli enterotoxigénica</i>	0	0	2	0.94	212	---	---
<i>Campylobacter spp</i>	0	0	16	7.55	212	---	---
<i>C. difficile</i>	0	0	16	7.55	212	---	---
<i>C. perfringens</i>	0	0	32	15.09	212	---	---
<i>Salmonella spp</i>	24	11.32	29	13.68	212	0.720	<0.001
<i>Vibrio spp</i>	0	0	2	0.94	212	---	---
<i>Plesiomonas</i>	1	0.47	0	0	212	---	---

En los pacientes en los que no hubo concordancia entre el PMD y el coprocultivo, los patógenos que se detectaron por PCR fueron del grupo de las bacterias *Shigella* 39 (18.40%), *C. perfringens* 32 (15%), *Campylobacter* 16 (7.55%), *C. difficile* en 16 (7.55%), *Aeromonas* 14 (6.60%), *E.coli* O157 7 (3.30%), *Salmonella* 5 (2.36%), *Vibrio spp* 2 (0.94%) y *E. coli enterotoxigenica* 2 (0.94%)

Del grupo de los virus: *Norovirus GII* 15 (7%), *Rotavirus* 7 (3.30%), *Adenovirus* 6(2.83%) y *Norovirus GI* 6(2.83%).

Tabla 9. Patógenos detectados por PCR adicionales a métodos convencionales.

Patógeno	PCR positivos adicionales	Porcentaje de pacientes en los que el PCR detectó el patógeno no aislado por métodos convencionales
<i>Rotavirus Grupo "A"</i>	7	3.30
<i>Adenovirus</i>	6	2.83
<i>E. coli</i> O157	7	3.30
<i>Norovirus GI</i>	6	2.83
<i>Norovirus GII</i>	15	7.08
<i>Shigella spp</i>	39	18.40
<i>Aeromonas spp</i>	14	6.60
<i>E. coli enterotoxigénica</i>	2	0.94
<i>Campylobacter</i>	16	7.55
<i>C. difficile</i>	16	7.55
<i>C. perfringens</i>	32	15.09
<i>Salmonella</i>	5	2.36
<i>Vibrio spp</i>	2	0.94

Se realizó una comparación de la detección del patógeno por PCR de acuerdo al rango de edad, dividiendo dos grupos uno de 16-60 años y el otro >60 años; encontrando tendencia significativa de $p= 0.009$ para *Shigella spp* en adultos jóvenes y en pacientes mayores de >60 años hubo una tendencia a *C. difficile* con $p= 0.07$.

Tabla 10. Detección de patógeno por PCR de acuerdo al rango de edad

Patógeno	Edad 16-60 años (n = 211)	Edad >60 años (n = 100)	Valor de p
<i>Rotavirus</i>	11 (5%)	2 (2%)	0.186
<i>Adenovirus</i>	6 (3%)	4 (4%)	0.589
<i>E. coli O157</i>	6 (3%)	3 (3%)	0.939
<i>Norovirus GI</i>	5 (2%)	3 (3%)	0.743
<i>Norovirus GII</i>	17 (8%)	10 (10%)	0.570
<i>Shigella spp</i>	54 (26%)	17 (17%)	0.092
<i>Aeromonas spp</i>	15 (7%)	6 (6%)	0.716
<i>E. coli enterotoxigénica</i>	3 (1%)	2 (2%)	0.705
<i>Campylobacter spp</i>	17 (8%)	5 (5%)	0.326
<i>C. difficile</i>	13 (6%)	12 (12%)	0.077
<i>C. perfringens</i>	30 (14%)	19 (19%)	0.280
<i>Salmonella spp</i>	28 (13%)	10 (10%)	0.411
<i>Vibrio spp</i>	1 (<1%)	2 (2%)	0.198

De los 212 pacientes con cultivo, fueron 45 muestras las cuales no se detectó ningún patógeno tanto por PCR como por cultivo, 123 muestras detectadas únicamente por PCR, 42 muestras fueron detectadas con ambos métodos y únicamente 2 patógenos fueron detectados por cultivo los cuales fueron *Salmonella spp* y *Plesiomonas*.

La precisión diagnóstica del PMD en comparación con el coprocultivo, para *Shigella spp* una sensibilidad del 94.7% y especificidad del 81.8% y con *Salmonella spp* sensibilidad del 83.3% y especificidad 93.7%.

Tabla 11. Precisión diagnóstica de la PCR en comparación con el estándar de oro (cultivo).

Patógeno detectado	Sensibilidad	Especificidad	Valor predictivo positivo	Valor predictivo negativo	Área bajo la curva
<i>Shigella spp</i>	94.7%	81.8%	25.4%	99.6%	0.883
<i>Salmonella spp</i>	83.3%	93.7%	52.6%	98.5%	0.885

16. DISCUSION

Para el estudio de la gastroenteritis aguda los métodos convencionales como el coprocultivo sigue siendo el estándar de oro a pesar de tener una sensibilidad relativamente baja, ser laborioso y puede retardar la identificación del germen por más de 3 días; por lo que en muchos casos es necesario el iniciar tratamiento empírico con antibióticos. Actualmente se han desarrollado dos técnicas de detección de gérmenes (virus/bacterias) por medio de la determinación de DNA por PCR con la finalidad de crear perfiles de virus y bacterias más frecuentes como agentes causales de la gastroenteritis aguda. El análisis Seeplex (determinación de DNA por PCR en tiempo no real) detecta *Adenovirus*, *Astrovirus*, *Norovirus GI*, *Norovirus GII*, *Rotavirus Grupo "A"*, *Aeromonas spp*, *Campylobacter spp*, *Clostridium difficile toxina B*, *Clostridium perfringens toxina*, *E. coli enterotoxigenica*, *E.coli 0157*, *Salmonella spp*, *Shigella spp*, *Vibrio spp*, *Yersinia enterocolitica* en heces fecales en un tiempo más corto que los métodos convencionales, lo que en teoría permitiría dirigir el tratamiento antibiótico a un germen determinado y no de manera empírica.

Este método ha proporcionado una alternativa rápida, sensible, específica y rentable a los métodos tradicionales; sin embargo, al ser un estudio de PCR en tiempo no real requiere del coprocultivo para la confirmación del diagnóstico.

La finalidad de nuestro estudio fue medir la concordancia que existía entre estas dos pruebas para corroborar si el método Seeplex realmente necesita o no el resultado del coprocultivo. Nosotros encontramos solo concordancia entre los dos estudios en *Salmonella spp* y *Shigella spp*. Las demás bacterias al no tener una concordancia con el coprocultivo requerirán otras pruebas para su diagnóstico preciso.

Por otro lado, el método Luminex determina virus, bacterias y parásitos por PCR en tiempo real y quizás este método no requiera del coprocultivo para su correlación.

Sin embargo, en nuestro hospital solo contamos con el método Seeplex por lo que no realizamos un análisis de comparación entre ambos métodos.

Una de las debilidades del método Seeplex al no detectar el DNA por PCR en tiempo real es que probablemente los gérmenes detectados, que no sean *Shigella spp* y *Salmonella spp*, podrían no ser la causa del cuadro gastrointestinal y se debería de solicitar siempre coprocultivo para la corrección del tratamiento empírico, no así, en los casos de *Shigella spp* o *Salmonella spp* que tienen una buena correlación.

Al realizar la comparación del coprocultivo considerado el estándar de oro para la detección de patógenos con el perfil molecular de diarrea se encontró para *Shigella spp* sensibilidad del 94.7% y especificidad del 81.8% así como para *Salmonella spp* de un 83.3% y 93.7% respectivamente.

17. CONCLUSIONES

El PMD es un estudio útil como primer análisis de la gastroenteritis aguda en especial cuando uno piensa en gérmenes como *Shigella spp* o *Salmonella spp* como los posibles agentes causales.

Se requieren estudios comparativos entre los dos métodos actuales (Seeplex tiempo no real y Luminex que es en tiempo real) para saber cuál de ellos es mejor.

18. REFERENCIAS

1. Hernandez c.et.al. Situación de las enfermedades gastrointestinales en México enfermedades infecciosas y microbiología, vol. 31, núm. 4, octubre-diciembre 2011 31 (4): 137-151.
2. Yuliya zboromyrskaa and jordi vilaa, Advanced pcr-based molecular diagnosis of gastrointestinal infections: challenges and opportunities. expert review of molecular diagnostics, 2016. vol. 16, no. 6, 631–64
3. Mona z zaghoul, et.al detection of *cambylobacter* spp. in stool samples by new methods in comparison to culturelife science journal 2012
4. Goldenberg et al.Integrated multiplex pcr tests for identifying gastrointestinal pathogens in people with suspected gastroenteritis (xtag gastrointestinal pathogen panel, filmarray gi panel and faecal pathogens b assay) (dg26) nice 2017.
5. Zhang et al. multiplex pcr tests for detection of pathogens associated with gastroenteritis clin lab med. 2015 june ; 35(2): 461–486.
6. Chau et al. diarrheagenic pathogens in adults attending a hospital in singapore bmc infectious diseases (2016) 16:32
7. Hernández cortez y cols. situación de las enfermedades gastrointestinales en México enfermedades infecciosas y microbiología, vol. 31, núm. 4, octubre-diciembre 2011
8. Yalda lucero a. etiología y manejo de la gastroenteritis aguda infecciosa en niños y adultos. rev. med. clin. condes - 2014; 25(3) 463-472]

9. Fukuda et.al rapid detection of norovirus from fecal specimens by real-time reverse transcription–loop-mediated isothermal amplification assay *journal of clinical microbiology*, apr. 2006, p. 1376–1381.
10. Glass et al. norovirus gastroenteritis. *n engl j med*. 2014 january 05.
11. Ottaviani et.al. nontoxigenic vibrio parahaemolyticus strains causing acute gastroenteritis *journal of clinical microbiology* 2012.
12. Lee hm, et al: clinical significance of fecal lactoferrin and multiplex pcr in acute diarrheal disease *gut and liver*, vol. 9, no. 5, september 2015
13. G.n. mcauliffe et al.systematic multiplex pcr for gastroenteric pathogens. *elsevier* abril 2013
14. Seungok lee et. al detection of 13 enteric bacteria and 5 viruses causing acute infectious diarrhea using multiplex pcr from direct stool specimens, *ann clin microbiol*. 2013 mar;16(1):33-38. korean.
15. Coupland et.al seeplex diarrhea ace detection *epidemiol. infect.* (2013), 141, 2111–2121.
16. Mengelle et al. simultaneous detection of gastrointestinal pathogens with a multiplex luminex-based molecular assay in stool samples from diarrhoeic patients. *clinical microbiology and infection* ^a2013 european society of clinical microbiology and infectious diseases.
17. Halligan et al.multiplex molecular testing for management of infectious gastroenteritis in a hospital setting: a comparative diagnostic and clinical utility study *clinical microbiology and infection*, volume 20 number 8, august 2014
18. Bennett s1, gunson rn2 the development of a multiplex real-time rt-pcr for the detection of adenovirus, astrovirus, rotavirus and sapovirus from stool samples. *j virol methods*. 2017 apr;242:30-34. doi: 10.1016/j.jviromet.2016.12.016. epub 2016 dec 28.
19. Collins da1, elliot b, riley tv. molecular methods for detecting and typing of clostridium difficile. *pathology*. 2015 apr;47(3):211-8. doi: 10.1097/
20. Laude et al. rt-pcr for the detection of gastrointestinal protozoa *clinical microbiology and infection*, volume 22 number 2, february 2016.
21. Jung-hyun byun et al. association of external quality assessment service nationwide survey of stool culture methods for the diagnosis of bacterial gastroenteritis in korea nationwide survey of stool culture methods *korean*, 2016
22. Dunbar et al. advanced laboratory diagnosis of gastroenteritis, *clin lab med* 33 (2013) 527–552
23. Longtin y Trottier et al. impact of the type of diagnostic assay on clostridium difficile infection and complication rates in a mandatory reporting program. *clin infect dis* 2013; 56: 67-73.

24. Fekety r. guidelines for the diagnosis and management of clostridium difficile-associated diarrhea and colitis. american college of gastroenterology, practice parameters committee. am j gastroenterol 1997;92:739-750.
25. Barlett jg. clinical practice. antibiotic-associated diarrhea. n engl j med 2002; 346:334-339
26. Schiller et al Chronic Diarrhea: Diagnosis and Management Clinical Gastroenterology and Hepatology Vol. 15, No. 2 February 2017.
27. Otter ja, yezli s, french gl. the role played by contaminated surfaces in the transmission of nosocomial pathogens. infect control hosp epidemiol 2011; 32: 687-99.
28. Guía de práctica clínica. prevención, diagnóstico y tratamiento de diarrea aguda en adultos en el primer nivel de atención. México: secretaría de salud, 2008.
29. Jabbar u, leischner j, kasper d, et al. effectiveness of alcohol-based hand rubs for removal of clostridium difficile spores from hands. infect control hosp epidemiol 2010; 31: 565-70.
30. Muto ca, blank mk, marsh jw, et al. control of an outbreak of infection with the hypervirulent clostridium difficile bi strain in a university hospital using a comprehensive “bundle” approach. clin infect dis 2007; 45: 1266-73.
31. Zar fa, bakkanagari sr, moorthi km, davis mb. a comparison of vancomycin and metronidazole for the treatment of clostridium difficile-associated diarrhea, stratified by disease severity. clin infect dis 2007; 45: 302-7.