



2019

**DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO
DE LAS GASTROENTERITIS
BACTERIANAS:
UNA MIRADA CRÍTICA
UTILIZANDO HERRAMIENTAS
MOLECULARES**

MAESTRIA MICROBIOLOGIA MOLECULAR

SILVANA CECCHI



MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA MOLECULAR

UNIVERSIDAD NACIONAL DE
SAN MARTÍN Y ADMINISTRACIÓN
NACIONAL DE LABORATORIOS E
INSTITUTOS DE SALUD

“DR. CARLOS G. MALBRÁN”

TESISTA: BIOQ. SILVANA CECCHI

DIRECTOR DE TESIS: Mg. LUIS PIANCIOLA

HOSPITAL ÁREA PROGRAMA GENERAL ROCA

FRANCISCO LÓPEZ LIMA

AGRADECIMIENTOS:

A mis hijos por ser el motor que impulsa mi vida, a mi familia, el pilar fundamental de lo que soy y sobre todo a mi madre, sin su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo, no hubiera podido cursar esta maestría con mis pequeños hijo

A mi director de tesis Luis Pianciola por haberme brindado su tiempo, capacidad y conocimiento científico, así como también haber tenido toda la paciencia del mundo para guiarme durante el desarrollo de esta tesis.

A Melina Mazzeo y a todo el personal del Laboratorio Central de la Subsecretaría de Salud de la Provincia de Neuquén por confiar en mí, abrirme las puertas y permitirme realizar toda la investigación práctica de mi tesis en ese prestigioso laboratorio.

Finalmente, a Sergio por acompañarme en la última etapa, por creer en mí, brindarme toda su ayuda y alentarme a retomar la escritura para concluir esta meta.

INDICE

| | |
|-------------------------|----|
| 1. Introducción | 5 |
| 2. Objetivos | 21 |
| 3. Materiales y Métodos | 22 |
| 4. Resultados | 31 |
| 5. Conclusiones | 35 |
| 6. Bibliografía | 41 |

DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO DE LAS GASTROENTERITIS BACTERIANAS: UNA MIRADA CRÍTICA UTILIZANDO HERRAMIENTAS MOLECULARES

1. INTRODUCCIÓN

Las gastroenteritis constituyen una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad fundamentalmente en los países en desarrollo, son la tercera causa de muerte por enfermedad infecciosa en el mundo. Si bien en adultos sanos puede sólo tratarse de un desequilibrio de electrolitos; en personas enfermas, niños y ancianos puede provocar una grave deshidratación. Según datos aportados por la OMS, por esta causa mueren 2.2 millones de personas en el mundo, y la mayoría son niños menores de 5 años debido a la alta susceptibilidad y mayor exposición a los agentes causales, es la segunda causa de muerte y el principal motivo de malnutrición en esta población, siendo prevenible y tratable. (OMS, 2017). (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/en/index.html>)

Las diarreas son un importante problema de salud pública, debido a que están directamente relacionadas a la infraestructura básica de higiene pública; esto es agua potable, cloacas y eliminación de residuos. Durante la última década se ha logrado un importante incremento a nivel mundial en el acceso de la población a estos servicios, sin embargo, aún persisten profundas inequidades en su distribución hacia el interior de los propios países siendo las poblaciones vulnerables las más perjudicadas. En el mundo, más de 663 millones de personas no tienen acceso a fuentes de agua segura y solo el 68% de la población tiene acceso a algún tipo de saneamiento (ONU Agua 2015). En Argentina cerca de 5,2 millones de habitantes no tiene red de agua potable y 23 millones no cuentan con desagües cloacales (Ministerio del interior 2015).

Las epidemias de diarreas son producidas generalmente por microorganismos patógenos provenientes de las heces que se encuentran contaminando el agua o los alimentos. También estos microorganismos se pueden transmitir de persona a persona por contacto directo con fómites, como consecuencia de la falta de medidas higiénicas adecuadas. En algunos casos es muy bajo el inóculo bacteriano necesario para desarrollar la infección.

En Argentina el último reporte epidemiológico anual registra aproximadamente 1 millón de casos de diarreas agudas, con tasas promedio que oscilan alrededor de 1650 casos por 100.000 habitantes. La distribución por regiones muestra los mayores valores en las provincias del sur (3500 casos/100.000 hab.) y el noroeste (3900 casos /100.000 hab.), tasas que duplican la media nacional (Boletín Integrado de vigilancia N° 431SE49, 2018).

1.1. ASPECTOS CLÍNICOS

Las principales manifestaciones clínicas de las gastroenteritis son fiebre, vómitos, dolor abdominal y diarrea. Las características de esta última constituyen las bases para la clasificación de las infecciones gastrointestinales: diarrea acuosa o secretora y diarrea invasiva o disentería (Romney et al., 2015). En la diarrea acuosa la acción patógena de los microorganismos, generalmente mediada por enterotoxinas, ataca el intestino delgado proximal, que es el responsable de la absorción fisiológica de más del 90 % de los fluidos, provocando evacuaciones intestinales frecuentes y líquidas. En cambio, en la disentería las heces no contienen mayormente líquido, pero si sangre y moco. La patogenia se centra en el intestino grueso, en donde los microorganismos producen inflamación y destrucción de la mucosa del colon por invasión directa o a través de toxinas.

1.2. AGENTES ETIOLÓGICOS

1.2.1. *Salmonella*: agente productor de zoonosis de distribución universal. El género *Salmonella* está formado por un grupo de bacterias que colonizan el intestino de numerosas especies animales y el hombre. Son bacilos Gram negativos aerobios y anaerobios facultativos, móviles (flagelos peritricos), que fermentan la glucosa, pero no la lactosa ni la sacarosa. Poseen antígeno somático O, antígeno flagelar H y *Salmonella typhi* posee además un antígeno de virulencia Vi localizado en la cápsula. Se han identificado más de 2500 serotipos de *Salmonella*. La clasificación más reciente de *Salmonella*, basada en la secuenciación de ADN considera solamente 2 especies: *S. entérica* y *S. bongori* (esta última no es patógena en el humano), subdivididas en subespecies y serovares. *Salmonella entérica* se divide en 6 subespecies: entérica (I), salamae (II) arizonae (IIIa), diarizonae (IIIb), houtenae (IV) e indica (VI) (Reeves et al., 1989). Para evitar confusiones la especie *S. entérica* serovar typhi se la sigue identificando como *S. typhi*.

Mediante el uso de reacciones antígeno-anticuerpo se determina la fórmula antigénica de una cepa y a partir de esa fórmula se la clasifica en serovares o serotipos siguiendo el esquema propuesto por Kauffman y White (Agrupa más de 2500 serovariedades) (Biblioteca virtual OPS/OMS). La nomenclatura recomendada para el género *Salmonella* consiste en escribir el nombre de especie en cursiva seguido del serotipo en redonda y con su primera inicial en mayúscula (ejemplo: *Salmonella entérica* serovar Typhimurium).

La salmonelosis es una enfermedad alimentaria, la transmisión se efectúa por consumo de alimentos contaminados de origen animal, principalmente aves, huevos, ganado vacuno o cerdos o a partir de portadores asintomáticos que manipulan y contaminan alimentos, o más raramente de persona a persona en guarderías y hospitales. Se estima que un inóculo entre 10^5 y 10^{10} bacterias es necesario para iniciar la infección ya que deben superar la acidez del estómago y competir con la flora normal del intestino. La infección se localiza en el íleon y el colon, las bacterias penetran las células epiteliales y

llegan a la lámina propia provocando inflamación. Entre el 4to y el 7mo día se pueden observar severas lesiones en la mucosa intestinal. La mayoría son infecciones autolimitadas, pero en algunos casos puede acompañarse de bacteriemia sobre todo en lactantes, ancianos e inmunodeprimidos.

El tratamiento de la diarrea depende de la gravedad del cuadro, lo más importante es mantener la adecuada hidratación del paciente ya sea por vía intravenosa en los casos graves o por vía oral con las sales de hidratación de la OMS. La terapia antibacteriana no parece aportar mejorías en los síntomas en la mayoría de los casos y puede prolongar el estado de portador. *Salmonella* puede quedar acantonada en el aparato digestivo fundamentalmente en la vesícula biliar, creando así portadores crónicos que eliminan bacterias continuamente por las heces, lo que resulta de una gran trascendencia a nivel epidemiológico. (Shu-Kee Eng et al., 2015)

El tratamiento con antibióticos está recomendado en recién nacidos, pacientes con válvulas protésicas e inmunosuprimidos, debido al riesgo de sufrir complicaciones. *Salmonella*, al igual que otras bacterias gram negativas, usa un sistema secretor especializado (denominado tipo III) para inyectar dentro de las células eucarióticas ciertas proteínas efectoras que manipulan las vías de señalización celular y promueven la virulencia en mamíferos. En los últimos años *Salmonella* ha ido incorporando mecanismos de resistencia a los antibióticos; preocupan fundamentalmente la pérdida de acción de las quinolonas por modificaciones en el sitio blanco de acción y de las cefalosporinas de tercera generación debido a la presencia de betalactamasas de espectro extendido (BLEE). El tratamiento de elección del paciente ambulatorio sigue siendo ciprofloxacina, cabe destacar que actualmente *Salmonella* posee puntos de corte específicos (CLSI) y ya no se realiza el tamizaje con ácido nalidíxico. TMS es otra opción terapéutica (Shu-Kee Eng et al., 2015).

En presencia de bacteriemia se aconseja el uso de cefalosporinas de tercera generación.

1.2.2. *Shigella*: este género está constituido por bacilos gram negativos inmóviles que no fermentan la lactosa, sí la glucosa, pero sin producción de gas y en general presentan una reducida actividad bioquímica. Son cuatro especies y cada una de ellas posee varios serotipos: *Shigella dysenteriae* (serogrupo A: 13 serotipos), *Shigella flexneri* (serogrupo B: 6 serotipos), *Shigella boydii* (serogrupo C: 18 serotipos) y *Shigella sonnei* (serogrupo D: 1 serotipo). El principal reservorio es el humano, aunque se la ha aislado en algunas especies de primates superiores (Ficha técnica N 6 Anmat).

La shigelosis está distribuida en todo el mundo y es endémica de los países de clima templado y tropical, con alta incidencia en los meses de verano. *Shigella flexneri* es la responsable de la disentería bacilar endémica en todo el mundo, *Shigella boydii* predomina en el continente indio, *Shigella dysenteriae* es la especie más virulenta debido a la producción de toxina Shiga y se la asocia con situaciones de emergencia complejas en países en desarrollo. *Shigella sonnei* es más frecuente en países industrializados (Giugno y Oderiz, 2010).

La transmisión se produce por el consumo de alimentos contaminados con heces, o a través de las manos o fómites. Son altamente transmisibles con una dosis infectiva muy baja, del orden de los 200 microorganismos. A diferencia de *Salmonella*, *Shigella* puede tolerar el pH bajo del estómago y unas pocas bacterias son capaces de colonizar el tracto digestivo.

La patogenicidad de *Shigella* está asociada con la habilidad de invadir y colonizar el epitelio intestinal, formando poros en la membrana de las células logra penetrar al citoplasma del enterocito. La toxina Shiga que produce *Shigella dysenteriae* se libera extracelularmente y produce efectos citotóxicos que inhiben la síntesis proteica e inducen la muerte celular de los enterocitos y también células del túbulo renal y células de la microcirculación del

sistema nervioso central, causando el síndrome urémico hemolítico (SUH) (Ficha técnica N6 Anmat). *Shigella* contiene un plásmido de gran tamaño que codifica la mayoría de sus determinantes de virulencia incluyendo el aparato de secreción de tipo III (T3SA), que permite la inyección de todos los efectores bacterianos dentro de la célula huésped. Es inmóvil por la falta de expresión de flagelos, a pesar de esto expresa una proteína de superficie IcsA que le permite moverse intracelularmente (Carayol y Tran Van Nhieu, 2013).

La shigelosis se caracteriza por diarrea, fiebre, náuseas, vómitos, cólicos y tenesmo. Se observa sangre y moco en la materia fecal en más del 85 % de los pacientes. Puede presentarse con casos leves que se autolimitan en 4 a 7 días, o casos muy graves con perforación intestinal, megacolon tóxico y SUH.

En el laboratorio ante la sospecha de *Shigella*, luego de la identificación bioquímica, se recomienda la identificación serológica mediante la aglutinación con antisueros específicos.

El tratamiento de la diarrea aguda por *Shigella* incluye la rehidratación del paciente y la administración de un antibiótico adecuado que acorta la enfermedad, ayuda a la rápida eliminación de *Shigella* por las heces y disminuye las complicaciones potencialmente graves. Ampicilina o TMS fueron el tratamiento de elección para shigelosis durante mucho tiempo, aunque el aumento de la resistencia en los últimos años obligó a utilizar también quinolonas y cefalosporinas de tercera generación.

1.2.3. *Campylobacter*: son bacilos gram negativos pequeños, curvos o espiralados y móviles por un flagelo polar. La mayoría son microaerofílicos y termófilos ya que desarrollan mejor a 42 °C que a 35 °C. Tienen una velocidad de desarrollo más lenta que el resto de las bacterias intestinales por lo que para su aislamiento a partir de materia fecal se utilizan medios selectivos con antibióticos que inhiban al resto de la flora. Las especies enteropatógenas de interés, en su mayoría termotolerantes, son: 1- *Campylobacter jejuni* es agente causal de diarreas siendo considerado el más

virulento por su mayor resistencia a la fagocitosis; tiene 2 subespecies: *jejuni* y *doylei*. 2- *Campylobacter coli*, también produce diarrea generalmente más benigna. 3- *Campylobacter laridis*, cuyo rol patógeno en el hombre no está bien definido y 4- *Campylobacter upsaliensis*, está bien documentado como productor de diarrea en gatos y perros, y últimamente como un importante patógeno emergente en pacientes pediátricos e inmunocomprometidos, esta especie no crece en los medios selectivos para *Campylobacter* (Romney et al., 2015- Couturier et al., 2012). Otras especies no termófilas: *fetus*, *hyointestinalis*, *concisus*, *rectus*, *sputorum*, y *showae*.

El principal patógeno en el humano es *C. jejuni* que se transmite más frecuentemente a través de los alimentos derivados de aves de corral. Un alto porcentaje de infecciones es provocado por el consumo de este tipo de carne mal cocida. La leche no pasteurizada también puede ser un vehículo de infección. Como sucede con otras infecciones la vía de transmisión fecal-oral también es una posible fuente de contagio en especial en niños sin control de esfínteres y en malas condiciones higiénico sanitarias. Si bien es una zoonosis de distribución mundial que afecta todos los grupos étnicos de ambos sexos, en los países en desarrollo parece ser más frecuente en niños de corta edad.

Se lo encuentra ampliamente distribuido en el tubo digestivo de una gran variedad de especies de aves, también colonizan vacas, cerdos y animales domésticos como perros y gatos. En América latina se aísla *Campylobacter* también del medio ambiente: aguas de río y aguas servidas. La amplia diseminación en la naturaleza constituye un importante problema de salud pública que aún no ha sido bien dimensionado por las autoridades sanitarias correspondientes (Fernández, 2011).

Campylobacter es un importante productor de diarrea, aunque los datos epidemiológicos aportados en nuestro país se encuentran claramente subestimados, debido a que el cultivo es más complejo y laborioso si se lo compara con otros agentes bacterianos. El diagnóstico de campylobacteriosis

se realiza en pocos laboratorios por lo que la prevalencia de este microorganismo como agente etiológico de diarreas se encuentra minimizada

La gastroenteritis por *Campylobacter* tiene un período de incubación de 3 a 5 días, afecta tanto al intestino delgado como al grueso, las heces son líquidas y abundantes con leucocitos y hematíes, se presenta con vómitos, deshidratación, fiebre y dolor abdominal. Puede acompañarse de dolores musculares y cefaleas (INEI, 2005). El tratamiento antimicrobiano solo se utiliza en pacientes con infecciones graves o sintomatología prolongada. *Campylobacter* ha adquirido una drástica resistencia a las fluorquinolonas en los últimos años y en la actualidad los macrólidos son los antibióticos de elección (Lucero et al., 2012).

Campylobacter juega un importante papel en el desarrollo del síndrome de Guillain-Barré, el mecanismo involucra la similitud de epitopes del lipopolisacárido O de *Campylobacter* y los gangliósidos humanos, provocando una reacción autoinmune con blanco sobre el sistema nervioso periférico (Nachamkin et al., 1998).

1.2.4. *Escherichia coli*: a pesar de ser *E. coli* un germen comensal en el tracto gastrointestinal, también puede tener la capacidad patogénica de causar una importante diarrea y enfermedades extra intestinales. Cada uno de las variantes patogénicas causa diferentes problemas sanitarios en todo el mundo. Existen 6 principales patotipos de *E. coli* diarreigénicas: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* productor de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroegregativa (EAEC o EAggEC), *E. coli* adherente difusa (DAEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) y un nuevo patotipo *E. coli* adherente invasiva (AIEC) (Matthew et al., 2013). Para clasificar las *E. coli* se utiliza el esquema de Kauffman, basada en una serotipificación del polisacárido somático O y el flagelar H. Existen 144 antígenos O y 53 H que componen los distintos serotipos.

1.2.4. a. *E. coli* enteropatógena (EPEC): a este grupo de bacterias se las conoce por el tipo de lesión que producen en el intestino delgado, *attaching and effacing* (E/A). EPEC es un organismo no invasivo y no productor de toxinas, las diarreas son endémicas en niños menores de 2 años, este cuadro clínico disminuye con la edad debido a la pérdida de receptores específicos a medida que madura la inmunidad. (Nataro et al., 1998). Los únicos portadores son los niños mayores y adultos asintomáticos. EPEC se transmite a través de alimentos contaminados.

1.2.4. b. *E. coli* productor de toxina Shiga (STEC): su definición está basada en la presencia del gen que codifica la toxina 1 y/o 2 (*stx1* o *stx2*). Las principales entidades clínicas asociadas a STEC son la colitis hemorrágica (CH) y el síndrome urémico hemolítico (SUH). *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) es un subgrupo dentro de STEC y está directamente asociado con las formas graves de infecciones por STEC. Además de producir la toxina Shiga, comparte con EPEC un *cluster* de 35 kb con genes de virulencia llamado locus LEE (*locus of enterocyte affectionment*) que codifica: el sistema de secreción tipo III, la intimina (*eae*), el receptor Tir y un grupo de proteínas secretadas (*esp*). La presencia de LEE les confiere a las cepas STEC una mayor virulencia pues los serotipos LEE positivos están más comúnmente asociados a brotes y casos de SUH que los serotipos LEE negativos. Sin embargo, la presencia de LEE no es esencial para producir patogenicidad ya que hay notificados casos de enfermedad grave en humanos de cepas LEE negativos (Rivas et al., 2006). El serogrupo de EHEC más vinculado con las patologías CH y SUH es O157:H7. Luego fueron declarados 6 grupos más de EHEC: O26, O45, O103, O111, O121, O145, nucleados como STEC no O157. Todos ellos conforman un grupo productor de enfermedades graves en humanos. (Croxen et al., 2013). El subgrupo O157:H7 no fermenta el sorbitol y esta característica es utilizada para el aislamiento en el coprocultivo en los laboratorios de mediana complejidad. En todo el mundo este serotipo es el que causa las

enfermedades más graves en humanos. La literatura describe a la Argentina como el país de mayor incidencia de SUH en el mundo en menores de 5 años (Rivero et al., 2010). Las cepas EHEC no O157 son fermentadoras de sorbitol y por este motivo no son detectadas en la rutina de los laboratorios de microbiología, representan aproximadamente el 30 % del total de EHEC (Pianciola et al., 2014) y se escapan al diagnóstico clínico de rutina. En Australia las cepas no O157 componen más de 42% de todos los aislamientos de STEC, mientras que en Alemania y Austria el 17% de los casos de SUH fueron causados por cepas O157 fermentadoras del sorbitol. (Croxen et al., 2013). La transmisión de STEC se da por vía fecal oral. La gran mayoría de las investigaciones muestran a la hamburguesa de carne como la fuente de contaminación más importante, y al ganado bovino como el principal reservorio de STEC; siendo la exposición a la materia fecal la principal vía de contaminación. Entre los alimentos que han estado involucrados con enfermedades en humanos, además de las hamburguesas, se encuentran las salchichas, los derivados de la leche y la espinaca. Estudios realizados con posterioridad a un brote de *E. coli* O157:H7 en el estado de Wisconsin (EEUU) asociado al consumo de espinaca envasada, encontraron cepas de O157:H7 y O26:H11 adheridas a las hojas del vegetal utilizando un factor de virulencia específico (Esp A) y lograron demostrar la internalización de la bacteria en el tejido de la hoja de espinaca (Saldaña et al., 2011). La toxina Shiga es el principal factor de virulencia de STEC, su mecanismo de acción está dirigido a las células renales, epitelio intestinal y células del endotelio vascular. Si bien las cepas de STEC con stx1 pueden causar SUH, la presencia de stx2 está asociada con patologías más severas (Pianciola et al., 2014). Básicamente las toxinas inhiben la síntesis proteica produciendo la muerte celular. Stx1 presenta 3 subtipos (a, c y d) mientras que Stx2, 7 subtipos (a, b, c, d, e, f y g). Una cepa puede portar la toxina 1, 2 o ambas.

Con un período de incubación de 3 días STEC produce diarrea, fiebre, dolor abdominal y vómitos. Unos días después el paciente puede sufrir una colitis

hemorrágica, la que puede resolverse o no y entre el día 5 y 13 del inicio de la diarrea puede desencadenarse el SUH que se presenta con trombocitopenia, anemia hemolítica y falla renal aguda. Luego de 20 años de estudios epidemiológicos en EEUU estiman que el 4% de los pacientes con STEC desarrollan SUH. Una placa de Mac Conkey con sorbitol permite distinguir fácilmente, luego de 24 horas de incubación, a la mayoría de las cepas *E. coli* O157:H7. Sin embargo, para confirmar STEC no O157:H7 es necesario la detección de las toxinas stx1 y stx2 ya que no son distinguibles debido a su capacidad de fermentar el sorbitol. No se dispone de ningún método fenotípico para detectar STEC no-O157:H7. Se ha discutido mucho acerca de las ventajas y desventajas del uso de antibióticos en pacientes con diarrea por STEC. Diversos estudios demuestran que aquellos pacientes con colitis hemorrágicas por STEC tratados con antibióticos tienen mayor probabilidad de evolucionar a las formas severas o SUH si se lo compara con aquellos que no reciben antibióticos. En forma experimental se ha logrado demostrar que los antibióticos no solo aumentan la inducción y expresión del fago Stx, sino que como consecuencia de la lisis bacteriana también aumentan la liberación de la toxina. Por lo tanto, actualmente existe consenso que el tratamiento antibiótico está contraindicado en casos de sospecha y confirmación de infección con STEC. Ningún tratamiento es útil para prevenir el SUH luego de una infección por STEC. Están en fase de desarrollo anticuerpos monoclonales que podrían utilizarse para reducir la citotoxicidad de Stx 1 y 2. También se encuentran en estudio vacunas que disminuyen el estado de portador en el ganado (Croxen et al., 2013).

1.2.4.c. *E. coli* enteroinvasiva (EIEC): comparte propiedades bioquímicas, genéticas y patogénicas con *Shigella*. Algunos antígenos somáticos de EIEC son idénticos o están muy relacionados con los de *Shigella*, por este motivo es muy difícil la discriminación de serotipos entre estos dos grupos de bacterias. La principal diferencia entre una *E. coli* comensal y EIEC es la adquisición de un extenso toolbox de virulencia, un plásmido de invasión

pINV y otros múltiples elementos genéticos móviles asociados a la virulencia. Lisina decarboxilasa (LDC) es un importante factor atenuante de virulencia que se encuentra ausente en EIEC y *Shigella*. El producto de degradación de la lisina, cadaverina, atenúa la acción de las enterotoxinas inhibiendo la migración de los neutrófilos a través de la barrera epitelial y bloquea el escape de los fagosomas (Croxen et al., 2013). Tanto EIEC como *Shigella* presentan diferentes estrategias para bloquear la síntesis de LDC. Ambos son patógenos altamente invasivos que utilizan el medio intracelular de las células del epitelio como nicho de replicación en el intestino delgado.

1.2.4.d. *E. coli* enterotoxigénica (ETEC): se define por su habilidad de producir 2 enterotoxinas llamadas LT (*heat labile*), ST (*heat stable*) y múltiples factores de colonización de la mucosa intestinal. Es el principal patógeno responsable de la diarrea del viajero y endémico en la mayoría de los territorios. En países desarrollados ETEC también es una importante causa de morbilidad y mortalidad en niños de 0 a 4 años. Un informe sobre diarreas en estas naciones revela un 13 % de ETEC del total de casos de diarrea en niños, sin embargo, no es una bacteria que se busque de rutina en pacientes que presentan diarrea. Los viajeros están en riesgo de adquirir ETEC en zonas subdesarrolladas como América latina, África y algunas regiones de Asia gracias a la persistencia y la habilidad de ETEC de sobrevivir hasta 3 meses en agua fresca y formar un biofilm en fuentes de agua de consumo (Croxen et al., 2013).

1.2.4.e. *E. coli* enteroagregativa (EAEC o EA_ggEC): se define por presentar un característico patrón de adherencia de tipo agregativa (AA) sobre el enterocito, generado por la autoaglutinación de bacterias entre sí. La categoría de EAEC abarca múltiples linajes patógenos a tal punto que ninguna cepa individual puede considerarse representativa. Para estudiarla adecuadamente es necesario identificar primero los genes y mecanismos de virulencia de los linajes separados. En el 2011 fueron detectadas cepas híbridas EAEC/STEC responsables de un importante brote en Alemania de

900 casos de SUH con más de 50 muertos. Las mismas fueron identificadas como O104:H4, híbridos que portan los genes de virulencia de las cepas EAEC y STEC (Frank C. et al., 2011). Las distintas cepas EAEC comparten el modelo patogénico de adherencia, producción de toxinas y desarrollo de diarrea inflamatoria. Causan diarrea del viajero por consumo de aguas contaminadas y alimentos crudos, EAEC produce diarrea persistente afectando principalmente niños y pacientes con VIH. La inflamación daña el epitelio intestinal por irritación crónica reduciendo la habilidad de absorber nutrientes a punto tal que el problema más importante de salud pública derivado de las infecciones por EAEC es la desnutrición infantil y el crecimiento con déficit intelectual en países subdesarrollados (Croxen et al; 2013).

1.2.5. *Clostridium difficile*: reconocido agente de diarrea nosocomial y colitis pseudomembranosa, es un bacilo gram positivo anaerobio estricto y esporulado. Sus esporas resisten el pH ácido del estómago y al llegar al intestino delgado, el contacto con las sales biliares promueve el proceso de germinación. Las cepas patogénicas codifican 2 factores de virulencia, las toxinas A y B. La toxina A es la responsable del daño tisular mientras que la B es conocida como una potente citotoxina. Si bien la mayoría de los aislamientos producen ambas toxinas, cada vez son más los casos reportados de enfermedad severa o brotes producidos por cepas B+/A-, en estas cepas no se expresa la toxina A.

C. difficile puede hallarse en el suelo y en el tracto gastrointestinal de animales y el hombre; el mayor porcentaje de colonización se observa en niños menores de 1 año (50%), a diferencia de los adultos en los que menos del 3% podría estar colonizado (Humphries y Linscott, 2015).

Cualquier factor relacionado con la alteración de la microbiota colónica aumenta el riesgo de colonización por *C. difficile*: la exposición a los antibióticos, la hospitalización, la ingesta de medicamentos tales como inhibidores de la bomba de protones y antagonistas de receptores de

histamina (Meyer et al 2014). También la edad avanzada (>65 años) es un factor de riesgo importante ya que presentan 10 veces más casos que el resto de la población. Mientras que casi todos los antibióticos han sido reportados asociados a la infección por *C. difficile*, los más comunes son cefalosporinas de 2da y 3ra generación, clindamicina y fluorquinolonas. La diarrea puede presentarse como moderada, hemorrágica o colitis pseudomembranosa. Puede autolimitarse o continuar con dolor abdominal y marcada leucocitosis. Las complicaciones más severas son la perforación intestinal y el megacolon toxigénico con una frecuencia de 0,1% a 3% (Humphries y Linscott, 2015).

En el año 2005 emerge una cepa hipervirulenta en Canadá, Europa y EEUU, NAP1/027/B1, se la encontró asociada con mayores tasas de morbilidad y mortalidad (Wilcox et al., 2012). Los estudios de esta cepa mostraron un aumento en la expresión de toxinas, esporulación más eficiente y resistencia a las fluorquinolonas (Warny et al., 2005; Merrigan et al., 2010).

El diagnóstico frecuentemente es clínico y el tratamiento empírico, aunque no es lo más recomendado si se cuenta con pruebas de diagnóstico. Esta sugerencia se basa en que aún en un ambiente epidémico no más del 30% de los pacientes hospitalizados que tengan diarrea asociada a antibióticos será secundaria a *C. difficile* (Meyer et al 2014). Durante mucho tiempo el análisis del efecto citopático fue considerado el standard de oro para el diagnóstico, sin embargo, está demostrado que esta prueba tiene insuficiente sensibilidad debido a la degradación de las toxinas con el tiempo (Tenover et al., 2011 - Surawicz et al., 2013). El cultivo toxigénico ha reemplazado al estudio de la toxicidad celular por una mayor sensibilidad (96-100%), se ha convertido en el método de referencia y además permite tipificar las cepas aisladas para su posterior investigación. Actualmente el método más utilizado en el diagnóstico de laboratorio es el enzimoimmunoensayo (EIA), existen kits comerciales que detectan la toxina A y la A+B. Fueron adoptados para uso de rutina y aparentaban tener una buena sensibilidad cuando se lo comparaba con el estudio de citotoxicidad. Sin embargo, estudios posteriores revelaron

que su sensibilidad no supera el 60 % y en la actualidad no se recomienda su uso como único método diagnóstico (Tenover et al., 2011- Surawicz et al., 2013). Los ensayos moleculares basados en la amplificación de ácidos nucleicos (PCR) identifican el gen *icdB* que codifica la toxina B, son altamente sensibles y específicos y se recomiendan actualmente como métodos de diagnóstico (O'Horo et al 2012). Estos ensayos no discriminan colonización de infección y detectan tanto cepas viables como no viables; para poder disminuir la identificación de pacientes colonizados, algunos laboratorios deciden procesar únicamente muestras diarreicas y rechazar heces formadas, con la excepción de muestras provenientes de pacientes con íleon o megacolon tóxico (Miller et al, 2018)

Las imágenes utilizadas para diagnóstico generalmente muestran resultados inespecíficos como edema y/o eritema, pero si se observan placas de la mucosa amarillentas y sobreelevadas, es patognomónico de colitis pseudomembranosa.

La implementación de políticas de uso adecuado de antibióticos, sobre todo en adultos mayores, y el lavado de manos ha demostrado que pueden disminuir los brotes por *C. difficile* (Aslam y Musher, 2006).

1.3. DIAGNÓSTICO CLÍNICO – MICROBIOLÓGICO

Ante la sospecha de gastroenteritis el profesional médico debe elaborar una detallada historia clínica con antecedentes epidemiológicos (edad, lugar de residencia, viajes recientes, alimento sospechoso, paciente internado o ambulatorio, etc.) y factores predisponentes (ej. inmunodepresión). El tratamiento de rehidratación en la diarrea grave se debe instaurar rápidamente y en ciertas ocasiones se debe además agregar antibioticoterapia por la gravedad de la enfermedad y el riesgo de complicaciones. Para esto se necesita conocer el agente causal y la sensibilidad a los antibióticos. La presencia de signos y síntomas puede

orientar acerca del microorganismo implicado, no obstante, el diagnóstico definitivo solo puede obtenerse mediante pruebas de laboratorio. En cuanto al tipo de microorganismo, se observan grandes diferencias de un área geográfica a otra y en las diferentes estaciones del año. En otoño-invierno predominan los agentes virales mientras que en primavera-verano se imponen las bacterias.

El diagnóstico microbiológico se realiza a través del coprocultivo o cultivo de materia fecal en donde se pretende aislar el agente etiológico responsable de la diarrea. Se utilizan con este fin varios medios de cultivo en su mayoría selectivos y/o diferenciales para el desarrollo de *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter* spp., *Yersinia* spp., *Aeromonas* spp., *E. coli* diarreigénicas, *Vibrio* spp., *Clostridium* spp., etc. (Álvarez et al., 2008). Dependiendo de la localización geográfica y de la epidemiología de cada región en particular, se protocoliza el coprocultivo orientándolo a la pesquisa de los microorganismos de interés. En la provincia de Río Negro se orienta la búsqueda básicamente a *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli* O157 y *Campylobacter*.

En un estudio retrospectivo realizado en la ciudad de La Plata, se analizaron 7050 coprocultivos de niños ambulatorios. Se calculó el número de cultivos positivos del total de muestras procesadas (porcentaje de positividad), que fue del 17.3% (Giugno y Oderiz, 2010). En la ciudad de Medellín, Colombia, un estudio similar sobre 905 coprocultivos provenientes de pacientes con enfermedad diarreica aguda informó una positividad de 18.3 % (Cuartas Trujillo et al., 2007). A pesar del elevado costo que representa el coprocultivo aún sigue siendo un estudio bacteriológico de muy baja sensibilidad.

1.4. DIAGNÓSTICO MOLECULAR

La búsqueda de secuencias de ADN específicas de los microorganismos responsables de las gastroenteritis podría sumar mayor sensibilidad al cultivo tradicional y disminuir el subdiagnóstico, eso mejoraría el manejo

clínico del paciente además de aportar más datos epidemiológicos al estudio de las diarreas. Se realiza la búsqueda del ADN bacteriano específico de cada uno de los agentes etiológicos haciendo una PCR (*Polimerase Chain Reaction*) convencional o en plataforma real time, ésta a su vez puede hacerse utilizando sondas o colorantes inespecíficos tipo Sybr Green o Eva Green.

1.4.1. REAL TIME PCR CON SYBR GREEN:

Es una PCR en tiempo real en la que se utiliza el colorante Sybr Green para revelar la reacción. Primero se amplifica el fragmento de ADN de interés con un set de cebadores apropiados y luego se realiza una curva de *melting* para darle especificidad a la reacción anterior. El colorante Sybr Green se intercala en la doble cadena de ADN y emite fluorescencia a medida que la amplificación transcurre. Se conoce como CT (del inglés *cycle threshold*) al ciclo de PCR en donde la fluorescencia aumenta significativamente con respecto a la fluorescencia basal, similar a un punto de corte. El software del equipo permite determinar el valor de CT con un análisis matemático de la curva de crecimiento. (Figura 1). El CT es inversamente proporcional a la cantidad de ADN inicial que hay en la muestra.

Para determinar la especificidad de los fragmentos amplificados se realiza la curva de *melting* en cada PCR. Esta curva mide la disminución de la fluorescencia conforme la temperatura va aumentando, el ADN bicatenario se va desnaturalizando y se libera el colorante intercalado (Sybr Green) por tanto, disminuye la lectura de la fluorescencia (Figura 3A). Se define temperatura de *melting* (T_m) como la temperatura a la que se separan el 50% de las hebras de ADN y se utiliza la función logarítmica para mejorar la visualización (Figura 2 y 3B).

Figura 1: Representación del CT (cycle threshold) PCR Real Time

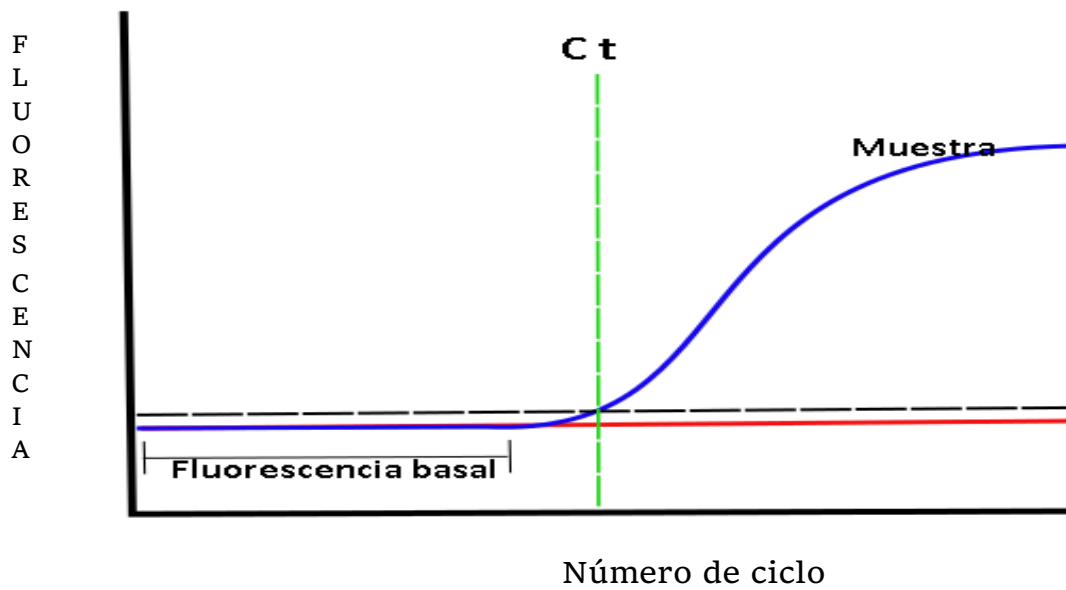
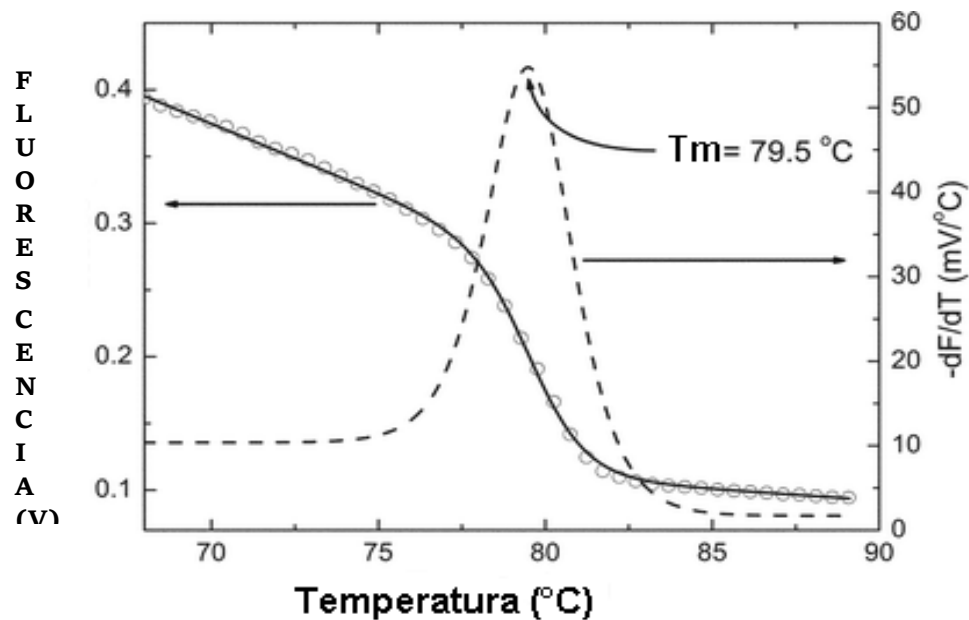


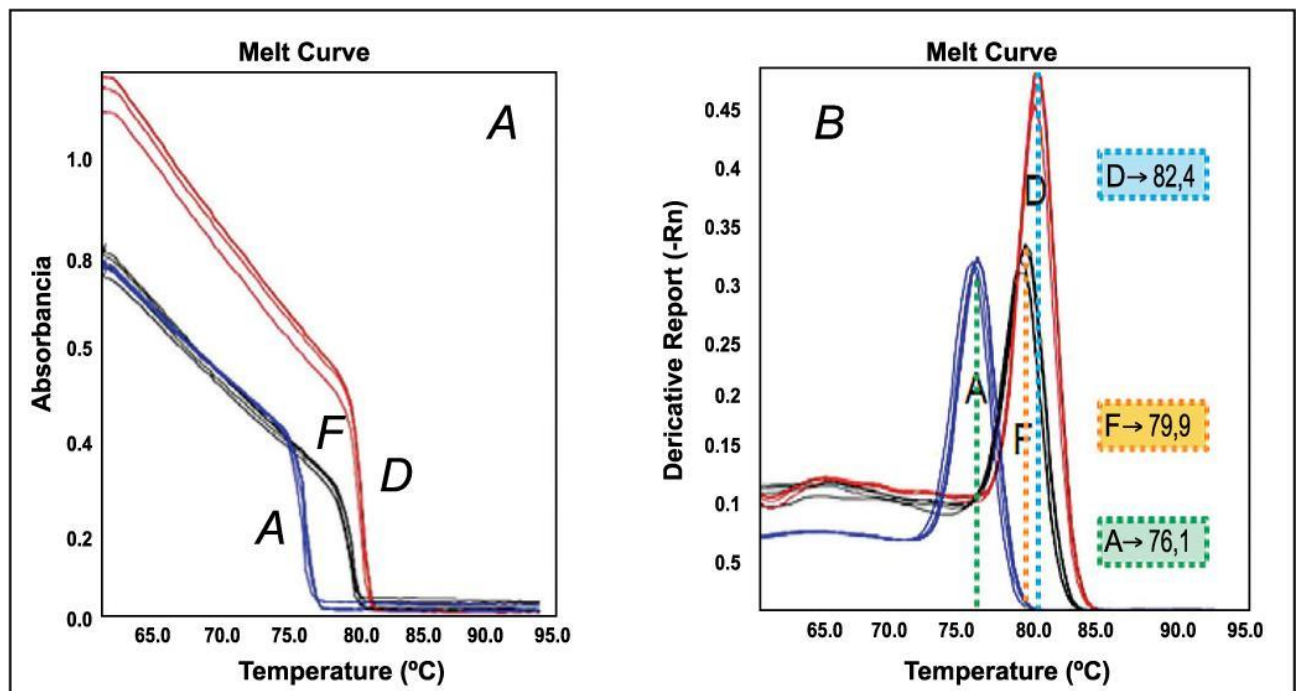
Figura 2: Curva de *melting* - Temperatura de *melting* (T_m)



En la Figura 3 A pueden observarse diferentes curvas, el T_m depende directamente del tamaño de la cadena de ADN y del contenido de uniones guanina y citosina (G-C) del fragmento amplificado. Pequeñas diferencias

genómicas presentan variaciones en las curvas y en el Tm. La curva se realiza de 60°C a 90°C con lecturas de fluorescencia cada 0,5°C para calcular la temperatura de *melting* de cada amplicón, y de esta manera es posible confirmar la especificidad de los fragmentos amplificados.

Figura 3: Curva de *melting* - Tm para diferentes fragmentos amplificados



2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GENERALES

Evaluar el desempeño de los métodos microbiológicos de cultivo que se utilizan habitualmente en el diagnóstico de infecciones gastrointestinales en los laboratorios de bacteriología de la provincia de Río Negro, utilizando herramientas moleculares de alta sensibilidad y especificidad.

2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar la sensibilidad del cultivo de materia fecal para el aislamiento de *Salmonella* spp.
- Determinar la sensibilidad del cultivo de materia fecal para el aislamiento de *Shigella* spp.
- Determinar la sensibilidad del cultivo de materia fecal para el aislamiento de *Campylobacter* spp.
- Determinar la sensibilidad del cultivo de materia fecal para el aislamiento de *E. coli* O157:H7
- Evaluar el desempeño de una técnica de extracción de DNA de materia fecal, de bajo costo y accesible para su utilización de rutina en laboratorios de diagnóstico molecular y que evite el uso de métodos comerciales.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MUESTRAS

Se utilizaron muestras de materia fecal (MF) provenientes de pacientes con diarrea que ingresaron para coprocultivo al Laboratorio de Microbiología del Hospital Francisco López Lima de la ciudad de General Roca en la provincia de Río Negro, en el período comprendido entre noviembre de 2014 y marzo 2015. Se realizó la toma de muestra a todos los pacientes ambulatorios de cualquier edad con diarrea aguda que consultaron en la guardia del hospital. Se solicitó una única muestra de materia fecal por evacuación espontánea que fue remitida al laboratorio en frasco limpio de boca ancha. Todas las muestras fueron conservadas en heladera a 2-8°C hasta un máximo de 24 h antes de ser procesadas. Por normas internas del laboratorio se sembraron únicamente las muestras de materia fecal con consistencia diarreica y que contenían más de 5 leucocitos por campo de 40 X. Fueron excluidas las heces formadas y/o con menos de 5 leucocitos.

3.2. POBLACIÓN ESTUDIADA.

En total se ingresaron al estudio 145 muestras de materia fecal, 69 fueron de pacientes mayores de 15 años, 52 pertenecían a pacientes pediátricos de 2 a 14 años y 24 muestras correspondían a niños lactantes menores de 2 años.

GOLD STANDARD.

Se utilizó como técnica de referencia, la PCR o amplificación de ácidos nucleicos por ser el método más sensible. Las técnicas de PCR utilizadas fueron todas publicadas y validadas en el lugar de origen. Los parámetros de validación fueron verificados en el Laboratorio Central del ministerio de Salud de la Provincia de Neuquén.

3.3. COPROCULTIVO

Las muestras fueron procesadas de la siguiente manera:

- Se registraron los datos de edad, sexo, diagnóstico y otros con interés epidemiológico
- Se realizó el examen en fresco para el recuento de leucocitos y hematíes
- Se cultivaron únicamente las muestras de materia fecal que cumplían con la definición de diarrea (cuya consistencia era lo suficientemente blanda como para tomar la forma del recipiente que la contiene) y que tenían un número mayor a 5 leucocitos en el examen en fresco. Se realizó el cultivo para el aislamiento de *Salmonella* spp, *Shigella* spp., *Campylobacter* spp. y STEC de acuerdo al manual de normas y procedimientos del laboratorio.

Se utilizaron los siguientes medios de cultivo:

- *Agar Salmonella-Shigella* (SS): medio selectivo y diferencial para el aislamiento de estos dos microorganismos que permite detectar fácilmente

colonias productoras de sulfhídrico de color negro, sospechosas de *Salmonella* spp. y colonias transparentes sospechosas de *Shigella* spp. En ambos casos es necesario realizar pruebas bioquímicas complementarias para continuar con la identificación de ambas especies.

- Agar Mac Conkey-Sorbitol: para el aislamiento específico de *E. coli* O157, en donde se aprovecha la incapacidad que tiene este grupo de bacterias para fermentar el sorbitol.
- C.L.D.E: (Cistina-lactosa deficiente en electrolitos) es un medio no inhibitorio donde crecen la mayoría de los enteropatógenos, útil para visualizar todo el contenido bacteriano aerobio de la muestra.
- Skirrow modificado: Skirrow es un medio selectivo para *Campylobacter* que inhibe la flora acompañante utilizando una mezcla de antibióticos (cefalotina, vancomicina y polimixina B), debe incubarse en la atmósfera microaerofílica adecuada para el desarrollo de estos microorganismos. Con el objetivo de bajar los costos que se generan para lograr dicha atmósfera (ej.: sobres generadores y jarra de anaerobiosis), utilizamos una modificación del medio original que agrega el suplemento F.B.P., una mezcla de sales (sulfato ferroso, metabisulfito de sodio y piruvato de sodio) que mejora la aerotolerancia de esta bacteria hasta en un 10%. Se incuba a 42°C aprovechando la capacidad de las cepas de interés clínico de crecer eficientemente a esta temperatura.
- Caldo selenito: es el medio líquido que se utiliza para enriquecer en *Salmonella* spp., es fundamental cuando se trata de estudiar los casos de portadores asintomáticos por la baja concentración de *Salmonella* en heces. Se resiembró en agar SS luego de 18 h de incubación.

3.4. MÉTODOS PARA EXTRAER Y PURIFICAR ADN

La extracción de ADN fue realizada por dos métodos en forma simultánea:

- Kit comercial para la extracción y purificación de ADN de muestras de materia fecal: Qiamp DNA Stool Minikit (50), marca Qiagen®.
- Método “casero” de extracción y purificación de ADN de materia fecal desarrollado y adaptado por el Laboratorio Central de la Subsecretaría de Salud de la Provincia de Neuquén (LABCEN5). Básicamente consiste en dos etapas: en la primera se realizan sucesivos lavados con soluciones alcalinas y en la segunda se extrae y purifica el ADN utilizando proteinasa K, un agente mucolítico y una resina.

3.4.1. EXTRACCIÓN CON SOLUCIÓN ALCALINA DE LAVADO (Cherie et al., 2001)

En un tubo *ependorf* se colocó 0,1 ml de materia fecal y 1,2 ml de solución alcalina de lavado (0,5 M de NaOH y 0,05 M de citrato de sodio en proporciones iguales). Se agitó en vórtex 30 s luego se puso a rotar a 60 rpm a temperatura ambiente durante 10 min. Se centrifugó a 13000 g durante 5 min, luego de descartar el sobrenadante y resuspender el *pellet* con 0,5 ml de Tris HCl 0,5 M pH: 8; se agitó en vortex por 15 s, posteriormente se centrifugó a 13000 g durante 5 min y se descartó el sobrenadante. Se repitió este lavado dos veces más y se resuspendió el último *pellet* en 0,1 ml de Tris EDTA (TE) agitando en vórtex otros 15 s. La solución así obtenida se utilizó en la segunda etapa de extracción.

3.4.2. MÉTODO LABCEN5 (Pianciola et al., 2010)

Se preparó en un tubo *ependorf* una solución que contiene:

1: 5 µl de Ditiotreitól (DTT) (15 mg de DTT en 25 µl de PBS fraccionar y guardar -20° C). La solución de trabajo se preparó con 5 µl de la solución anterior más 45 µl de PBS, por ser muy inestable se debe utilizar en el día).

2: 3 µl de proteinasa K (PK): 0,2mg /ml

3: 100 µl de Chelex: 50 mg/ml

Se agregaron 50 µl de la muestra (procesada previamente con extracción alcalina en el paso anterior), se agitó en vortex 15 s y se centrifugó 30 s a 16000 g. Luego de incubar 1 hora a 65 °C se agitó 15 s en vortex.

Se inactivó la PK incubando 15 min en baño maría, y centrifugando 15 min a 16000g. El ADN así obtenido se conservó a 4 °C para ser utilizado como templado en la reacción de PCR. Puede conservarse por más tiempo a -20 °C.

3.5. REAL TIME PCR CON SYBR GREEN

PCR en plataforma Real Time con Sybr Green para la detección de *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter* spp., *Clostridium* spp., y STEC. Se realizaron las determinaciones a los extractos obtenidos por los dos métodos de extracción antes mencionados en forma simultánea. En total a cada muestra se le realizó la cantidad de 10 PCR (2 métodos de extracción por 5 microorganismos cada una). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un equipo marca BioRad CFX 96 Touch Real Time PCR Detection System. Se utilizó Kapa SYBR Fast qPCR kit Master Mix (2X) Universal (KAPA®, Biosystems), mezcla que contiene DNA polimerasa AmpliTaq^R con mecanismo *hot start*, dNTPs, colorante Sybr green, *buffers* que optimizan la reacción, de manera que solo se agrega a la reacción cebadores, agua y templado. En todos los casos se realizó la curva de *melting* de 60°C a 90°C con lecturas de fluorescencia cada 0,5 °C para conocer la temperatura de *melting* (T_m) de cada amplicón, con el objetivo de confirmar la especificidad de los fragmentos amplificados.

3.5.1. REAL TIME PCR PARA LA DETECCIÓN DE *Salmonella* spp.

Se amplificó un fragmento de 284 pb del gen *InvA* utilizando el set de cebadores más selectivos según Malorny. invA 139 5' GTGAAATTATCGCCACGTTTCGGGCAA 3' y 141 5' TCATCGCACCGTCAAAGGAACC 3' (Malorny et al., 2003) (Tabla 11). El límite de detección de esta PCR fue de 10^4 UFC/gr de materia fecal y 10^3 con una sensibilidad del 93 %.

La mezcla de reactivos para realizar la PCR se muestra en la tabla 1 y el programa de ciclado utilizado en la tabla 2.

Tabla 1: *Salmonella* spp. Reactivos empleados en la PCR

| Reactivo | Concentración del reactivo | Concentración en la muestra | Volumen/muestra (µl) |
|---------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------|
| Master Mix | 2X | 1X | 10 |
| Primer (invA) F y R | 10 µM | 0.25 µM | 0.5 |
| Agua | - | - | 5.5 |
| Templado | - | - | 4 |
| Volumen final | - | - | 20 |

Tabla 2: *Salmonella* spp. Condiciones de ciclado de la PCR

| | | |
|--------------------|---------------|-----------|
| Activación inicial | 5 min a 94 °C | 35 ciclos |
| Desnaturalización | 30 s a 95 °C | |
| Annealing | 30 s a 64 °C | |
| Elongación | 30 s a 72 °C | |

3.5.2. REAL TIME PCR PARA LA DETECCIÓN DE *Shigella* spp.

Se eligió para amplificar el gen *ipaH* que se encuentra en todas las especies de *Shigella* spp. así como también en *E. coli* entero-invasiva (EIEC). Utilizando como cebador *forward* ipaH-U1 5' CCTTTTCCGCGTTCCTTGA3' y *reverse* ipaH-L1 5' CGGAATCCGGAGGTATTGC3' (Mokhtari et al., 2013). Los

parámetros de validación mostraron un nivel mínimo de detección de $1,5 \times 10^1$ UFC /ml lo que equivale a $1,5 \times 10^3$ UFC/ g heces.

La PCR realizada se detalla en la tabla 3 y el programa del termociclador utilizado se describe en la tabla 4.

Tabla 3: *Shigella* spp. Reactivos empleados en la PCR

| Reactivo | Concentración del reactivo | Concentración en la muestra | Volumen/muestra (μ l) |
|-----------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| Master mix | 2 X | 1 X | 10 |
| Primer ipa H-U1 | 10 μ M | 0.25 μ M | 0.5 |
| Primer ipa H-L1 | 10 μ M | 0.25 μ M | 0.5 |
| Agua | - | - | 5.0 |
| Templado | - | - | 4 |
| Volumen final | | | 20 |

Tabla 4: *Shigella* spp. Condiciones de ciclado de la PCR

| | | |
|------------------------|----------------|-----------|
| Activación inicial | 10 min a 95 °C | 40 ciclos |
| Desnaturalización | 30 s a 95 °C | |
| Annealing y elongación | 60 s a 60 °C | |

3.5.3. REAL TIME PCR PARA LA DETECCIÓN DE *Campylobacter* spp.

Se usaron cebadores que amplifican un fragmento del gen 16 S del rRNA de 5 especies patógenas de *Campylobacter*: *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, *C. hyointestinalis* designados como C16S Lund forward

5' CGTGCTACAATGGCATATACAATGA 3' y reverse 5' CGATTCCGGCTTCATGCTC3' (Boer et al., 2012). Los resultados de validación de esta PCR arrojaron un mínimo límite de detección de 10^3 UFC /g materia fecal. En la tabla 5 se detallan los reactivos de la PCR y en la tabla 6 el programa de ciclado.

Tabla 5: *Campylobacter* spp. Reactivos empleados en la PCR

| Reactivo | Concentración del reactivo | Concentración en la muestra | Volumen/muestra (μl) |
|---------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------|
| Mix mix | 2 X | 1 X | 10 |
| Primer Lund F | 10 μM | 0.4 μM | 0.8 |
| Primer Lund R | 10 μM | 0.4 μM | 0.8 |
| Agua | - | - | 4.4 |
| Templado | - | - | 4 |
| Volumen final | - | - | 20 |

Tabla 6: *Campylobacter* spp. Condiciones de ciclado de la PCR

| | | |
|------------------------|----------------|-----------|
| Activación inicial | 10 min a 95 °C | 45 ciclos |
| Desnaturalización | 15 s a 95 °C | |
| Annealing y elongación | 60 s a 60 °C | |

3.5.4. REAL TIME PCR PARA LA DETECCIÓN DE STEC

Se adaptó una PCR multiplex convencional (Leotta et al., 2005) para ser utilizada con Sybr Green. Los resultados de validación de autor fueron de 10^4 UFC/50 μl con un 100 % de inclusividad y exclusividad, precisión analítica y valor predictivo positivo y negativo; sin interferencias al realizar cambios en diferentes variables. Usaron dos pares de oligonucleótidos cebadores para amplificar un fragmento del gen correspondiente a la subunidad B de stx1 a: 5' GAAGAGTCCGTGGGATTACG3', b: 5'AGCGATGCAGCTATTAATAA3' y un fragmento del gen correspondiente a la subunidad A de stx2 a: 5'TTAACCACACCCCACCGGGCAGT3' y b: 5'GCTCTGGATGCATCTCTGGT3'. En la tabla 7 figuran las concentraciones utilizadas para la PCR, en la tabla 8 el programa de amplificación usado.

Tabla 7: STEC. Reactivos empleados en la PCR

| Reactivo | Concentración del reactivo | Concentración en la muestra | Volumen/muestra (μl) |
|------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------|
| Master Mix | 2X | 1X | 10 |

| | | | |
|--------------------|------------|--------|-----|
| Primer stx1(F y R) | 10 μ M | M | 2 |
| Primer stx2 (FyR) | 10 μ M | 0.2 mM | 0.4 |
| Agua | - | - | 6.8 |
| Templado | - | - | 3 |
| Volumen final | - | - | 20 |

Tabla 8: STEC Condiciones de ciclado de la PCR

| | | |
|--------------------|-------------|-----------|
| Activación inicial | 5 min 94° | 30 ciclos |
| Desnaturalización | 30 s a 94° | |
| Annealing | 30 s a 58° | |
| Elongación | 30 s a 72° | |
| Elongación final | 2 min a 72° | |

3.5.5. REAL TIME PCR PARA LA DETECCIÓN DE TOXINA B DE *Clostridium difficile*.

Se amplificó un segmento del gen de la toxina B, con los siguientes cebadores: *foward* NK 104: 5'GTGTAGCAATGAAAGTCCAAGTTTACGC3' y *reverse* NK 105: 5'CACTTAGCTCTTTGATTGCTGCACCT3' (Kato et al., 1998).

La mezcla de reacción fue preparada como se detalla en la tabla 9, el programa de ciclado utilizado se muestra en la tabla 10.

Tabla 9: Toxina B de *Clostridium difficile*. Reactivos empleados en la PCR

| Reactivo | Concentración del reactivo | Concentración en la muestra | Volumen/muestra (μ l) [□] |
|---------------|----------------------------|-----------------------------|---|
| Master Mix | 2X | 1X | 10 |
| Primer NK 104 | 10 μ M | 0.25 μ M | 0.5 |
| Primer NK 105 | 10 μ M | 0.25 μ M | 0.5 |
| Agua | - | - | 5.0 |
| Templado | - | - | 4.0 |
| Volumen final | - | - | 20 |

Tabla 10: Toxina B de *Clostridium difficile*. Condiciones de ciclado de la PCR

| | | |
|--------------------|------------|-----------|
| Activación inicial | 5 min 94° | 35 ciclos |
| Desnaturalización | 20 s a 94° | |
| Annealing | 20 s a 55° | |
| Elongación | 20 s a 72° | |

Tabla 11: Secuencia de cebadores

| BACTERIA | SECUENCIA | NOMBRE CEBADORES | GEN | TAMAÑO |
|---------------------------|-----------------------------------|------------------|----------------|--------|
| <i>Salmonella</i> spp. | 5' GTGAAATTATCGCCACGTTTCGGGCAA 3' | 139 | InvA | 284 pb |
| | 5' TCATCGCACCGTCAAAGGAACC 3' | 141 | | |
| <i>Shigella</i> spp | 5' CCTTTTCCGCGTTCCTTGA 3' | U1 | ipaH | 112 pb |
| | 5' CGGAATCCGGAGGTATTGC 3' | L1 | | |
| <i>Campylobacter</i> spp. | 5' CGTGCTACAATGGCATATACAATGA 3' | Lund16 S-F | 16S rRNA | 113 pb |
| | 5' CGATTCCGGCTTCATGCTC 3' | Lund 16 S-R | | |
| <i>Clostridium</i> spp. | 5' TGTAGCAATGAAAGTCCAAGTTTACGC 3' | NK 104 | tox B | 203 pb |
| | 5' CACTTAGCTCTTTGATTGCTGCACCT 3' | NK 105 | | |
| STEC | 5' GAAGAGTCCGTGGGATTACG 3' | Stx 1 a | SubB | 130 pb |
| | 5' AGCGATGCAGCTATTAATAA 3' | Stx 1 b | Stx 1 | |
| | 5' TTAACCACACCCACCGGGCAGT 3' | Stx 2 a | Sub A Stx 2 | 346 pb |
| | 5' GCTCTGGATGCATCTCTGGT 3' | Stx 2 | | |

3.6. METODOS ESTADISTICOS UTILIZADOS PARA LA COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN: Análisis de concordancia para variables numéricas.

El objetivo fue comparar el desempeño de dos métodos de extracción de ADN y determinar si el método casero podría sustituir al comercial.

Con el fin de comparar variables continuas con observadores diferentes (distintos métodos de extracción), se probaron dos métodos estadístico matemáticos que se ajustaban al tipo de estudio de comparaciones metodológicas; el coeficiente de correlación intraclase (CCI) y el coeficiente de correlación de concordancia de Lin (CCC). Estos estudios estadísticos evalúan la consistencia entre dos métodos y analizan cuan acordes están entre si las observaciones de un mismo fenómeno. Se define la concordancia como el grado en que dos o más observadores, métodos, técnicas u observaciones están de acuerdo sobre el mismo fenómeno observado. En ambos casos se consideró un error estadístico α del 5%.

3.6.1 Coeficiente de correlación intraclase (CCI). El software utilizado fue IBM SPSS Statistics versión 23. Se utilizó el modelo: " *dos factores, efectos mixtos* " y el acuerdo: " *absoluto* " ya que lo fundamental era que los valores fueran similares. (Menendez, 2015 – Camacho, 2008)

3.6.2 Coeficiente de correlación de concordancia de Lin (CCC). El software en este caso fue NCSS 2019 Statistical versión 19.03 (Menendez, 2015-Cortez Reyes, 2010- ©NCSS LLC, 2019)

Valores convencionales de interpretación de concordancia (Menendez, 2015):

- < 0,40: Pobre
- 0,40 -0,59: Suficiente
- 0,60 – 0,74: Bueno
- 0,75 – 1: Excelente

4. RESULTADOS

4.1. DISTRIBUCIÓN DE MUESTRAS POSITIVAS SEGÚN GRUPO ETARIO

De las 145 muestras de materia fecal procesadas, 84 dieron positivas por alguno de los métodos utilizados, de las cuales 35 fueron de pacientes mayores de 15 años, 29 pediátricos (2 a 14 años) y 20 muestras positivas pertenecían al grupo de menores de 2 años.

Tabla 12: Distribución de muestras procesadas según edad

| Grupo etario | < 2 años | 2 a 14 años | > 15 años y adultos | Total |
|---------------------|------------|-------------|---------------------|-------|
| Muestras procesadas | 24 (16,6%) | 52 (35,9%) | 69 (47,6%) | 145 |

Tabla 13: Distribución de muestras positivas según edad

| Grupo etario | < 2 años | 2 a 14 años | > 15 años y adultos | Total |
|--------------------|------------|-------------|---------------------|-------|
| Muestras positivas | 20 (23,8%) | 29 (34,5%) | 35 (41,7%) | 84 |

4.2. DISTRIBUCIÓN DE MUESTRAS POSITIVAS SEGÚN MÉTODO DIAGNÓSTICO Y AGENTE ETIOLÓGICO

De las 84 muestras positivas por PCR, en 39 se detectó genoma de *Campylobacter spp.*, en 32 de *Shigella spp.*, en 6 de *Salmonella spp.* y en 7 de toxina B de *Clostridium difficile*; mientras que los coprocultivos positivos fueron 4, 15 y 3 respectivamente. No se realizó cultivo anaerobio de *Clostridium difficile*. Tampoco se obtuvieron muestras positivas para STEC. (Tabla 14)

Tabla 14: Distribución de muestras positivas según agente bacteriano

| Bacteria | Coprocultivo Positivo | Coprocultivo Negativo | PCR Positiva |
|---------------------------|-----------------------|-----------------------|--------------|
| <i>Shigella spp.</i> | 15 | 17 | 32 |
| <i>Salmonella spp.</i> | 3 | 3 | 6 |
| <i>Campylobacter spp.</i> | 4 | 35 | 39 |
| STEC | 0 | 0 | 0 |
| <i>Clostridium spp.</i> | 0* | 7 | 7 |
| TOTAL | 22 | 62 | 84 |

*No se realizó cultivo para *Clostridium difficile*

4.3. DISTRIBUCIÓN DE MUESTRAS POSITIVAS SEGÚN AGENTE ETIOLÓGICO Y GRUPO ETARIO

Del total de muestras positivas 35 pertenecen al grupo de pacientes mayores de 15 años, 29 a niños de 2 a 10 años y 20 muestras positivas corresponden a niños menores de 2 años.

De las 6 muestras de materia fecal con *Salmonella spp.* 4 se encontraron entre los mayores de 15 años, se obtuvo 1 *Salmonella* en un menor de 2 años y 2 en el grupo de 2 a 14 años.

Tabla 15: Distribución de muestras positivas según edad y agente etiológico

| Grupo etario/ Grupo bacteriano | < 2 años | 2 a 14 años | > 15 años | Total |
|-----------------------------------|----------|-------------|-----------|-------|
| Muestras procesadas | 24 | 52 | 69 | 145 |
| <i>Shigella spp.</i> | 6 | 15 | 11 | 32 |
| <i>Salmonella spp.</i> | 1 | 2 | 3 | 6 |
| <i>Campylobacter spp.</i> | 9 | 12 | 18 | 39 |
| STEC | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Clostridium spp.</i> | 4 | 0 | 3 | 7 |
| Muestras positivas TOTAL | 20 | 29 | 35 | 84 |

4.4. SENSIBILIDAD DEL COPROCULTIVO

De las 145 muestras ingresadas al protocolo, 84 (57,9%) dieron positivas por PCR, 22 (15,2%) fueron positivas por cultivo y 62 muestras resultaron negativas.

Tomando la PCR como *Gold Standard* se calculó la sensibilidad del cultivo de materia fecal global 26,2 % y en particular para el aislamiento de *Salmonella*

spp., *Shigella* spp. y *Campylobacter* spp. Los resultados fueron 50,0 %, 46,9 % y 10,3 % respectivamente.

Tabla 16: Sensibilidad del coprocultivo

| Agente etiológico | Sensibilidad Coprocultivo (%) |
|---------------------------|-------------------------------|
| <i>Shigella</i> spp. | 46,9 |
| <i>Salmonella</i> spp. | 50,0 |
| <i>Campylobacter</i> spp. | 10,3 |

4.5. COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN EN MATERIA FECAL

Tabla 17: CT Real time PCR versus método de extracción

| CT PCR <i>Salmonella</i> spp | | CT PCR <i>Shigella</i> spp | | CT PCR <i>Clostridium</i> spp | | CT PCR <i>Campylobacter</i> spp | |
|------------------------------|----------|----------------------------|----------|-------------------------------|----------|---------------------------------|----------|
| Método 1 | Método 2 | Método 1 | Método 2 | Método 1 | Método 2 | Método 1 | Método 2 |
| 24,80 | 26,55 | 18,50 | 16,28 | - | 37,82 | 23,57 | - |
| 27,76 | 28,72 | 19,40 | 17,60 | 31,76 | 37,47 | 35,65 | 28,86 |
| 27,29 | 30,73 | 20,60 | 19,29 | 31,16 | 40,00 | 35,69 | 28,98 |
| 33,21 | 30,98 | 23,22 | 21,79 | 31,56 | 39,29 | 25,78 | 34,04 |
| 30,20 | 31,50 | 21,50 | 23,30 | 28,28 | 38,53 | 15,78 | 14,48 |
| 32,10 | 28,70 | 31,51 | 31,38 | 33,5 | - | 22,93 | 19,62 |
| | | 20,87 | 18,85 | 26,36 | 30,54 | - | 35,66 |
| | | 20,66 | 20,87 | | | 27,91 | 23,84 |
| | | - | 38,95 | | | 35,22 | 37,04 |
| | | 21,40 | 18,84 | | | 15,25 | 19,875 |
| | | - | 37,75 | | | 17,37 | 23,08 |
| | | 33,06 | 28,27 | | | 33,93 | 34,43 |
| | | - | 39,11 | | | 20,42 | 22,03 |
| | | 30,39 | 34,97 | | | 24,50 | 26,76 |
| | | 22,36 | 22,37 | | | 21,17 | 26,76 |
| | | 24,28 | 25,64 | | | 26,65 | 29,41 |
| | | 29,02 | 29,22 | | | 20,26 | 27,52 |
| | | 30,74 | 28,96 | | | 20,14 | 29,56 |
| | | 19,25 | 17,02 | | | 22,06 | 26,17 |
| | | 20,08 | 19,33 | | | 21,35 | 23,45 |
| | | 17,07 | 19,48 | | | 20,56 | 19,97 |
| | | 31,86 | 30,50 | | | 25,33 | 32,64 |

| | | | | | |
|--|-------|-------|--|-------|-------|
| | 32,15 | 30,50 | | 37,41 | 34,06 |
| | 28,60 | 27,50 | | 22,99 | 22,60 |
| | 32,15 | 31,50 | | 23,60 | 28,77 |
| | 30,75 | 31,82 | | - | 38,01 |
| | 24,54 | 25,33 | | 23,66 | 25,10 |
| | 29,21 | 29,50 | | 27,77 | 29,57 |
| | 32,36 | 30,54 | | 26,08 | 29,59 |
| | 34,11 | 32,15 | | 36,44 | - |
| | | | | 19,17 | 19,82 |
| | | | | 17,15 | 18,05 |
| | | | | 16,28 | 25,73 |
| | | | | 18,68 | 20,51 |
| | | | | 24,02 | 25,26 |
| | | | | 29,65 | 31,25 |

⁽¹⁾ Kit comercial Qiamp DNA Stool Minikit (50), marca Qiagen®

⁽²⁾ Método LABCEN5, desarrollado y adaptado por el Laboratorio Central de la Subsecretaría de Salud de la Provincia de Neuquén.

En la tabla 17 se muestran los resultados comparativos entre el CT de las muestras positivas con ambos métodos de extracción de ADN (1: Kit comercial, 2: Labcen 5).

La tabla 18 muestra el coeficiente de correlación intraclase (CCI) y la Tabla 19 el Coeficiente de Correlación de Concordancia de Lin (CCC) para cada grupo bacteriano.

Tabla 18: Coeficiente de Correlación Intraclase (CCI)

Paquete estadístico utilizado: CCI: ABM SPSS

| Grupo bacteriano | CCI | Intervalos de confianza (95%) |
|----------------------|-------|-------------------------------|
| <i>Salmonella</i> | 0,550 | -0,494 0,925 |
| <i>Shigella</i> | 0,939 | 0,870 0,972 |
| <i>Clostridium</i> | 0,198 | -0,048 0,763 |
| <i>Campylobacter</i> | 0,706 | 0,440 0,851 |

Tabla 19: Coeficiente de Correlación y Concordancia (CCC)

| Grupo bacteriano | CCC | Intervalo de confianza (95%) |
|-------------------------|------------|-------------------------------------|
| <i>Salmonella</i> | 0,505 | -0,121 0,877 |
| Shigella | 0,939 | 0,886 0,971 |
| <i>Clostridium</i> | 0,165 | -0,059 0,410 |
| Campylobacter | 0,699 | 0,527 0,833 |

5. DISCUSION DE RESULTADOS

Las diarreas bacterianas son la segunda causa de mortalidad infantil en el mundo. En América Latina, 5,1% de las muertes en menores de 5 años son debidas a diarrea y deshidratación. La proporción de niños que mueren por diarrea en los países de América Latina y el Caribe sigue siendo cerca de 50 veces mayor que en América del Norte.

Solo requieren tratamiento antimicrobiano determinados patógenos o situaciones especiales, por eso es importante el diagnóstico etiológico y el conocimiento de la epidemiología local. Si bien están disponibles múltiples test diagnósticos para identificar a los patógenos entéricos, el cultivo de materia fecal es el método más utilizado en nuestro país por una cuestión de costos. Nuestro objetivo fue realizar una mirada crítica a esta herramienta diagnóstica comparándola con un método molecular más sensible y definir, si correspondiera, la necesidad de realizar mejoras al cultivo tradicional.

5.1. MUESTRAS POSITIVAS DE ACUERDO A LA EDAD DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA

Al analizar la edad de la población estudiada encontramos que el 47,6 % de las muestras procesadas corresponden a adultos, el 36.0 % a niños de 2 a 14

años y sólo el 16,5 % de las muestras de materia fecal que ingresaron al servicio de microbiología del Hospital son del grupo de lactantes. Sin embargo, de este último surge el mayor porcentaje de resultados positivos 83,3 %, es decir 20 de las 24 muestras fueron positivas. Esto concuerda con otras publicaciones donde informan que en la población pediátrica una sola muestra de materia fecal puede detectar hasta el 98 % de las bacterias entéricas, mientras que en la población adulta son necesarias más de una muestra para diagnosticar el agente etiológico. (Miller et al.,2018)

5.2. AGENTES ETIOLÓGICOS DE DIARREAS BACTERIANAS

Cuando se analizan las muestras positivas utilizando el coprocultivo como único método diagnóstico puede inferirse que el principal agente etiológico de diarreas bacterianas en la ciudad de General Roca es *Shigella* (68,1%) seguido de *Campylobacter* (18,2%) y *Salmonella* (13,6%) en tercer lugar, esto concuerda con los datos epidemiológicos que registra regularmente la provincia de Río Negro (79% *Shigella* spp., 25% *Campylobacter* spp. y 11% *Salmonella* spp.) (Sivila, Notificación agrupada 2016-2018). Datos similares registra la epidemiología nacional (57% *Shigella* spp., 15 % *Salmonella* spp. y 14% *Campylobacter* spp.) (Sivila Notificación Agrupada, todas las Provincias 2015-2018). Pero nuestros resultados demuestran que, si se utilizan herramientas moleculares como la PCR para analizar las mismas muestras en la ciudad de General Roca, se obtienen resultados muy diferentes y *Campylobacter* (46,4%) pasa a ser el principal agente etiológico seguido de *Shigella* (38,1%), *Clostridium difficile* (8,3%) y *Salmonella* (7,1%).

Estos datos son relevantes desde el punto de vista epidemiológico y sanitario para la salud pública local, ya que son bacterias que presentan diferencias en los mecanismos de transmisión. La incidencia de campilobacteriosis humana está aumentando en todo el mundo, siguen existiendo importantes lagunas en el conocimiento de la epidemiología de *Campylobacter* spp. en los países en

desarrollo (Coker et al., 2002), se necesita una conciencia de salud pública sobre el problema y para esto es fundamental el fortalecimiento del diagnóstico de la campilobacteriosis. Si bien la vía fecal oral es una posible fuente de contagio para *Campylobacter* spp. como sucede con *Shigella* spp., la campilobacteriosis es considerada una zoonosis y las aves de corral parecen ser el principal reservorio de esta bacteria. Los animales muertos o las carnes quedan contaminados por las heces durante el sacrificio del animal. En este sentido la salud pública podría apuntar a la prevención del consumo de carne de aves mal cocidas para evitar este tipo de gastroenteritis.

5.3. SENSIBILIDAD DEL COPROCULTIVO

El rendimiento del coprocultivo en nuestro trabajo arrojó resultados preocupantes, un 15 % de las muestras sembradas para diagnóstico de diarreas bacteriana dieron positivas, datos similares se observan en el resto del país: 14% de positividad (Sivila Notificación Agrupada, todas las Provincias 2015-2018)

Si bien el coprocultivo es el método más utilizado por los laboratorios de microbiología para el diagnóstico de bacterias patógenas en materia fecal, resulta ser poco eficiente si se analizan los valores de sensibilidad comparándolo con los métodos moleculares. Estos resultados concuerdan con otros publicados (Giugno y Oderiz, 2010; Cuartas Trujillo et al., 2007).

Para *Salmonella* y *Shigella* sólo la mitad de las muestras positivas son detectadas por cultivo (S: 50,0% y S: 46,9% respectivamente). Mientras que para *Campylobacter* la sensibilidad del coprocultivo en nuestro laboratorio resulta ser inaceptablemente baja (10,3%). Otros hospitales de mayor complejidad en Argentina muestran mejor rendimiento del cultivo de *Campylobacter* y aun así sigue siendo segundo agente etiológico muy por debajo de *Shigella* (Lucero et al., 2012). Quizá las modificaciones utilizadas en el medio de Skirrow para bajar los costos que genera el desarrollo de la

atmósfera microaerofílica, no son realmente tan efectivas y se pierde sensibilidad en el cultivo. La baja sensibilidad de cultivo para el aislamiento de *Campylobacter* concuerda con los hallazgos recientemente publicados por Buss en donde el cultivo de materia fecal falló en detectar el 30 % de las infecciones por *Campylobacter*. spp. (Buss et al., 2019). Otros estudios encuentran sensibilidades entre 60 y 76 % (Bessède et al, 2011; Floch et al, 2011). Existen otras causas que podrían explicar la baja sensibilidad del cultivo para este patógeno, además de la atmósfera de incubación ya mencionada. Una de ellas es la errática pérdida de viabilidad durante la manipulación de las muestras y las dificultades para detectar las colonias de *Campylobacter* entre las colonias de la flora acompañante. Finalmente, debe considerarse que la mayoría de los métodos de cultivo para *Campylobacter* spp están optimizados para el cultivo de *C. jejuni* y *C. coli* y no contemplan las condiciones de cultivo de otras especies patógenas como *C. lari* y *C. upsaliensis*. Ésta última especie puede constituir hasta el 10% de los especímenes clínicos (Buss et al., 2019).

En el presente trabajo las pruebas de PCR se realizaron en forma directa sobre la materia fecal sin realizar el pasaje por caldo de enriquecimiento. Algunos autores muestran tener buenos resultados de sensibilidad en los métodos moleculares con las muestras procesadas en forma directa (Grys et al., 2009). Otros sin embargo consideran que esto podría ser más adecuado en una geografía donde la prevalencia local de la infección sea alta (Brienne et al., 2018). A pesar de esto, nuestros resultados muestran una sensibilidad superior cuando se compara con el cultivo convencional y, si bien el pre enriquecimiento en caldo podría mejorar la sensibilidad de la PCR esto no invalida nuestros resultados. Es probable que, de haber usado enriquecimiento en caldo antes de PCR, la sensibilidad de ésta hubiera sido mayor, agrandando aún más la diferencia con el cultivo.

Quizá sea conveniente evaluar en futuras investigaciones la incorporación de algún otro medio de cultivo o de enriquecimiento que contribuya a mejorar la sensibilidad del coprocultivo.

5.4. EVALUACIÓN DEL MÉTODO "LABCEN5" PARA EXTRACCIÓN DE ADN DE MATERIA FECAL

Se evaluó un método casero de bajo costo para extraer ADN de materia fecal desarrollado en el Laboratorio Central de la Subsecretaría de Salud de la provincia de Neuquén. En general la comparación con el método comercial de Qiagen obtuvo resultados de CT similares y en algunos casos inferiores para el método casero. Si analizamos los resultados generales del total de muestras positivas por PCR (84), 78 fueron positivas por el método comercial y 81 positivos se obtuvieron con la extracción de ADN con el método casero. Hubo 6 muestras (3 *Shigella* spp., 1 *Clostridium difficile* y 2 *Campylobacter* spp.) que dieron positivas por el método casero y negativas por el método comercial y 3 muestras (1 *Clostridium* y 2 *Campylobacter*) que dieron a la inversa, positivos por el método comercial y negativas por el casero.

Si analizamos cada grupo bacteriano los dos análisis estadísticos mostraron resultados similares, una "excelente" y "buena" correlación entre ambos métodos para *Shigella* spp. (CCI: 0,939) y *Campylobacter* spp. (CCI: 0,706) respectivamente; "suficiente" para *Salmonella* spp (CCI: 0,550); mientras que para *C. difficile* la correlación resultó ser "pobre" (CCI: 0,198) El análisis estadístico para este grupo bacteriano mostró una diferencia significativa en ambos métodos, probablemente se deba a que el número de muestras analizadas es bajo. Sería importante completar el análisis con más cantidad de muestras positivas para

C. difficile ya que el método casero resultó tener buenos resultados para el resto de las bacterias analizadas, fundamentalmente las que presentan mayor cantidad de datos para comparar y analizar. Esto podría ser un aporte muy

importante, ya que, si bien es un método más laborioso que el comercial, el costo es mucho menor y podría ser utilizado de rutina por los laboratorios de microbiología molecular.

5.5. UTILIZACIÓN DE TEST DIAGNÓSTICOS INDEPENDIENTES DE CULTIVO (TDIC)

Históricamente la vigilancia epidemiológica de bacterias entéricas estuvo basada en la identificación precisa y en la recuperación de los agentes causales mediante coprocultivo. Sin embargo, en los últimos años se han comenzado a utilizar varios test diagnósticos independientes de cultivo (TDIC) como inmunocromatografía, ELISA y métodos moleculares. Los TDIC resultan atractivos para los laboratorios de microbiología debido a su sensibilidad (entre 80 y 100%), su especificidad (88 a 99%), posibilidad de detectar varios patógenos en un solo ensayo, rapidez en el diagnóstico, costos en disminución, etc. Sin embargo, el incremento en el uso de estas metodologías puede debilitar la vigilancia epidemiológica ya que va a disminuir el número de cepas de enteropatógenos disponibles para estudios avanzados, indispensables para la identificación de *clusters*, brotes, epidemias e identificación de patógenos emergentes. El objetivo del uso en el presente trabajo de un TDIC como son las técnicas moleculares, de ninguna manera se relaciona con la promoción de su uso en nuestro medio. Al contrario, sólo se aplicó como una herramienta para evaluar el desempeño del coprocultivo y poder establecer así algunas bases para mejorarlo. Antes de estimular la aplicación de TDIC al diagnóstico y la vigilancia epidemiológica de patógenos entéricos es imprescindible evaluar el costo beneficio de hacerlo y su impacto en el cuidado de la salud de los pacientes y en la salud pública en general (Imdad et al, 2017). En base a los datos del presente trabajo, debería evaluarse la posibilidad de incorporar TDIC para el caso de *Campylobacter* spp, ya que las herramientas diagnósticas con las que contamos en la actualidad muestran una sensibilidad inaceptable.

5.6 CONCLUSIONES

El presente trabajo muestra una baja sensibilidad del coprocultivo para todos los patógenos estudiados. En general del cultivo de materia fecal tuvo una sensibilidad del 26,2 %. Mientras que el porcentaje de positividad fue de 15 y 58 para el cultivo y la PCR respectivamente.

Se confirma que debe mejorarse el cultivo de *Salmonella* spp y *Shigella* spp.

La sensibilidad del cultivo para *Campylobacter* spp. resultó ser muy baja y no debería usarse en esas condiciones para diagnóstico clínico. Probablemente este mal desempeño esté relacionado a la atmósfera de incubación.

El método casero de extracción de DNA demostró tener un rendimiento aceptable, si bien es necesario probarlo con más número de muestras positivas de *Clostridium* spp., Podría ser utilizado en el laboratorio clínico para diagnóstico microbiológico.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Alvarez Martinez M., Buesa Gómez J., Castillo García J., Vila Estape J. 2008. Diagnóstico Microbiológico de las infecciones gastrointestinales. Procedimientos en Microbiología Clínica. 30.
2. ANMAT. Enfermedades transmitidas por alimentos, Shigellosis. Ficha técnica N 6. www.anmat.gov.ar/webanmat/Publicaciones/Shigelosis.pdf
3. Aslam S., Musher D. M. 2006. An update on diagnosis, treatment and prevention of *Clostridium difficile* associated disease. Gastroenterology Clinics of North America. 35: 315-335

4. Bessède E, Delcamp A, Sifre E, Buissonniere A, Mégraud F. 2011. New methods for detection of campylobacters in stool samples in comparison to culture. *J Clin Microbiol* 49(3):941-944.
5. Biblioteca virtual: <http://www.bvsops.org.uy/pdf/campylobacter.pdf>
6. Biblioteca virtual OPS/OMS: <http://www.bvsops.org.uy/pdf/salmonella.pdf>
7. Boer R. F., Alewijn Ott, Güren P. Van Zanten E., Van Belkum A., Kooistra-Smid A. M. D. 2012. Detection of *Campylobacter* and *Arcobacter butzleri* in Stool Samples by Use of Real-Time multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 01716-12
8. Boerlin P., Mc Ewen S. A., Boerlin Petzolf F., Wilson J. B., Johnson R. P., C. Gyles C. L. 1999. Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 497-503.
9. Buss J. E., Cresse M., Doyle S., Buchan B. W., Craft D. W., Young S. *Campylobacter* culture fails to correctly detect *Campylobacter* in 30% of positive patient stool specimens compared to non-cultural methods. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2019 <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03499-x>
10. Camacho Sandoval J. ISSN 0001-6002/2008/50/4/211-212 *Acta Médica Costarricense*, ©2008 Colegio de Médicos y Cirujanos
11. Carayol N., Tran Van Nhieu G. Tips and tricks about *Shigella* invasion of epithelial cells. *Current Opinion in Microbiology* 2013 V16, Issue1 32-37.
12. Cherie Millar, John Moore, Colm Lowery, Kieran McCorry, James Dooley. 2011. Successful PCR amplification of genomic DNA from *Cryptosporidium parvum* oocysts extracted from a human faecal sample: a rapid and simple method suited for outbreak analysis. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 204, 191±194 (2001)

13. Coker A. O., Isokpehi R. D., Amisu K. O. Y., Obi C. L. Human Campylobacteriosis in Developing Countries. 2002. *Emerging Infection Diseases*. 8(3): 237-243.
14. Colina J., Giordano O., Mitchell A. 2009. La Mortalidad infantil es muy alta en Argentina y puede ser reducida con mejor uso de los recursos. *Informes de la Economía Real. Empleo y Desarrollo Social*. UCA. 23.
15. Cortez Reyes E. 2010. Métodos estadísticos de evaluación de la concordancia y la reproducibilidad de pruebas diagnósticas. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología* Vol. 61 No. 3 • 2010 • (247-255)
16. Couturier B. A., Hale D., Couturier M. R. 2012. Association of *Campylobacter upsaliensis* with Persistent Bloody Diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology*. 50 (11): 3792-3794
17. Couturier B. A., Riley T., Gowans J. and Roger M. Couturier. Direct-from-stool testing for shiga-toxins by an immunochromatographic assay is insensitive for detection of shigatoxigenic *E. coli*. CM Accepted Manuscript Posted Online 3 October 2018, *Journal of Clinical Microbiology*
18. Croxen M. A., Law R. J. Scholz R., K. M. Keeney, M. Wlodarska, B. B. Filay. 2013. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. 26 (4): 822-880
19. Cuartas Trujillo M. C., Upegui O. L., Restrepo Ceballos A. C., Maya Carmona C. Y., Jaramillo Velazquez S., Donado Gómez J. H., Zuleta Tobón J. J., López Vargas J. A. 2007. Sensibilidad y especificidad del recuento de leucocitos en materias fecales para predecir la presencia de *Salmonella* o *Shigella* en pacientes con enfermedad diarreica aguda. *IATREIA Revista Médica Universidad de Antioquia*. 21: 5-12

20. Darwin K. H., Miller V. L. 1999. Molecular Basis of Interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. *Clinical Microbiology Reviews*. 12(3) 406-428
21. Floch P, Goret J, Bessède E, Lehours P, Mégraud F. 2012. Evaluation of the positive predictive value of a rapid Immunochromatographic test to detect *Campylobacter* in stools. *Gut Pathogens* 4(1):17.
22. Frank C, Werber D, Cramer JP, Askar M, Faber M, an der Heiden M, Bernard H, Fruth A, Prager R, Spode A, Wadl M, Zoufaly A, Jordan S, Kemper MJ, Follin P, Müller L, King LA, Rosner B, Buchholz U, Stark K, Krause G. 2011. Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. *New England Journal of Medicine* 365:1771-1780
23. Giugno S., Oderiz S. 2010. Etiología Bacteriana de la diarrea aguda en pacientes pediátricos. *Acta Bioquímica Latinoamericana*. 44: 63-69
24. Grimont P. D. A., Weill F. X. 2007 Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. 9th edition: 1-166
25. Grys T. E., Sloan L. M., Rosemlatt J. E. and Patel R. Rapid and sensitive Detection of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* from Nonenriched Stool Specimens by Real-Time PCR in Comparison to Enzyme Immunoassay and Culture. 2009, *Clinical Microbiology*. 47(7)
26. Gupta S. K., Keck J., Ram P. K., Crump J. A., Miller M. A., Mintz E. D. 2008. Analysis of data gaps pertaining to enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in low and medium human development index countries, 1984-2005. *Epidemiology Infection*. 136:721-738
27. Haldun Akoglu 2018. User's guide to correlation coefficients. *Turkish Journal of Emergency Medicine* 18 (2018) 91-93.

28. Humphries R. M., Linscott A. J. 2015. Laboratory Diagnosis of Bacterial Gastroenteritis. *Clinical Microbiology Reviews* 28: 3-31.
29. Ikeda K., Ida O., Kimoto K., Takatorige T., Nakanishi N., Tatara K. 1999. Effect of early fosfomicin treatment on prevention of hemolytic uremic syndrome accompanying *Escherichia coli* O157ÑH7 infection. *Clinical Nephrology*. 52: 357-62
30. Imdad A., Retzer F., Thomas L. S., McMillian M., Garman K., Rebeiro P. F., Deppen S. A., Dunn J. R., Woron A. M. Impact of Culture-Independent Diagnostic Testing on Recovery of Enteric Bacterial Infections. 2017 Published by Oxford University Press for the Infectious Diseases
31. INEI. Ministerio de Salud, 2005. Manual de procedimientos para el diagnóstico de *Campylobacter* spp. en muestras clínicas y de alimentos. Servicio de bacteriología Sanitaria.
32. Kato K., Kato N., Watanabe K., Iwai N., Nakamura H., Yamamoto T., Suzuki K., Kim S. M., Chong Y., y Bagus Wasito E. 1998. Identification of Toxin A-Negative, Toxin B-Positive *Clostridium difficile* by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* p1278-1282
33. Leotta G. A., Chinen I., Epszeyn S., Miliwebsky E., Melamed I. C., Motter M., Ferrer M., Marey E., Rivas M. 2005. Validación de una técnica de PCR múltiple para la detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. *Revista Argentina de Microbiología* 37: 1-10.
34. Lucero C., Hoffer A., Veliz O., Albornoz E., Guerriero L., Galas M., Farace M., Corso A. 2012 Perfil de sensibilidad a los antimicrobianos en aislamientos de origen humano de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* en Argentina: Vigilancia Nacional 2007-2010. (Poster) VII Congreso SADEBAC, 27-29 junio, 2012, CABA, Argentina

35. Malorny B., Hoorfar J., Bunge C., and Helmuth R. 2003 Multicenter Validation of Analytical Accuracy of *Salmonella* PCR: towards an International Standard. *Applied and Environmental Microbiology* 290-296
36. Miller J. M., Binnicker M. J., Campbell S., Carroll K. C., Chapin K. C., Gilligan P. H., Gonzalez M. D, Jerris R. C., Kehl S. C., Bobbi R. P., Pritt S., Richter S.S., Robinson-Dunn, J. D. Schwartzman, J. W. Snyder, S. Telford III, E. S. Theel, R. B. Thomson B. Jr, Weinstein M. P., and Yao J. D. A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clinical Infectious Diseases* 2018:67
37. Ministerio del Interior Obras Públicas y Vivienda 2015, Plan Nacional de Agua Potable. Minieriodelinterior.gov.ar
38. Menendez J. 2015. Curso de SPSS, ICC, archivo de blog
39. Meyer L.S., Espinza R. A., Quera R. P. 2014 Infección por *Clostridium difficile*: epidemiología, diagnóstico y estrategias terapéuticas. *Revista Médica Clínica Las Condes* V 25 Issue 3. 473-484
40. Mokhtari W., Nsaibia S., Gharbi A., Aouni M. 2013. Real time PCR using SYBR Green for the detection of *Shigella* spp. in food and stool samples. *Molecular Cellular Probes* 27: 53-59
41. Nachamkin I., Mishu Allos B., T. Ho. 1998. *Campylobacter* Species and Gillan- Barré Syndrome. *Clinical Microbiology Reviews*. 11(3): 3555-567
42. Nataro J. P., Kaper J. B. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. 11:142-201
43. Neil M- A., Opal S. M., Heelan J. 1991. Failure of ciprofloxacin to eradicate convalescent fecal excretion after acute salmonellosis: experience during and outbreak in health care workers- *Annals of Internal Medicine* 114: 195-199

44. O'Horo J. C., Jones A., Sternke M., Harper C., Safdar N. Molecular Techniques for Diagnosis of *Clostridium difficile* Infection: Systematic Review and Meta-analysis. 2012. Mayo Clinic Proceedings. 87(7): 643-651
45. ONU, Asamblea General de la ONU, El Agua Fuente de Vida 2015
46. Pianciola Luis, Chinen Isabel, Mazzeo Melina, Miliwebsky Elizabeth, González Gladys, Müller Constanza, Carbonari Carolina, Navello Mariano, Zitta Eugenia, Rivas Marta. Genotypic characterization of *Escherichia coli* O157:H7 strains that cause diarrhea and hemolytic uremic syndrome in Neuquén, Argentina. 2014 International Journal of Medical Microbiology. 304, 499-504
47. Pianciola L., Mazzeo M., Flores D., Hozbor D. Optimización del procesamiento y la conservación de muestras clínicas destinadas al diagnóstico molecular de coqueluche. Revista Argentina de Microbiología (2010) 42: 108-113
48. Rivas M., Miliwebsky E., Chinen I., Deza N., Leotta G. A. Epidemiología del Síndrome Urémico Hemolítico en Argentina. Diagnóstico del Agente Etiológico, Reservorios y Vías de Transmisión. 2006. Medicina (Buenos Aires), 66 (Supl.III): 27-32
49. Rivero M. A., Passucci J. A., Rodríguez E. M., Parma E. A. 2010. Role and clinical course of verotoxigenic *Escherichia coli* infections in childhood acute diarrhea in Argentina. Journal of Medicine Microbiology. 59: 345-352.
50. Romney M. Humphries, Andrea J. Linscott., 2015. Laboratory Diagnosis of Bacterial Gastroenteritis. Practical guidance for clinical microbiology (Formerly *Cumitechs*). Clinical Microbiology Reviews 28:3-31.
51. Saldaña Z., E. Sanchez E., Xicohtencath Cortez J., Puente J. L., Girón J. A. 2011. Surface structures involved in plant stomata leaf colonization by Shiga Toxigenic *E. coli* O157:H7. Front Microbiology. 2: 119.
52. Shu-Kee Eng, Priyia Pusparaja, Nurul-Syakima Ab Mutalib, Hooi-Leng Ser,

Kok-Gan Chan and Learn-Han Lee., 2015. Salmonella: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Frontiers in Life Science*, 2015 Vol. 8, No. 3, 284-293

53. Surawicz C. M., Brandt L.I., Binion D. G. et al. Guidelines for Diagnosis, Treatment and Prevention of *Clostridium difficile* Infection. 2013. *The American Journal of Gastroenterology* 108: 478-498.

54. Tarr P. I., Gordon C. A., Chandler W. L. 2005. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet* 365: 1076-1086.

55. Tenover F. C., Baron E. J., Peterson L. R., Persing D. H. Laboratory Diagnosis of *Clostridium difficile*. ¿Can Molecular Amplification Methods Move Us Out of Uncertainty? 2011. *Journal of Molecular Diagnostic* 13: 573-582.

56. Warny M., Pepin J., Fang A., Killgore G., Thompson A., Brazier J., Frost E., Mc Donald L. C. 2005. Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. *Lancet* 366:1079-1084.

57. who.int/mediacentre/factsheets/fs178/es/

58. who.int/mediacentre/news/releases/2009/childhood_deaths_diarrhoea_20091014/es/

59. Wilcox M. H., Fawley W. N., Settle C. D., Davison A. 1998. Recurrence of symptoms in *Clostridium difficile* infection- relapse or reinfection? *Journal of Hospital Infection* 38:93-9100.

60. Wilcox M. H., Shetty N., Fawley W. N., Shemko M., Coen P., Birtles A., Cairns M., Curran M. D., Dogson K. J., Green S. M., K. J. Hardy K., Hawkey P. M., Magee J. G., Sails A.D., Wren M. W. 2012. Changing epidemiology of *Clostridium difficile* infection following the introduction of a national

ribotyping- based surveillance scheme in England. *Clinical Infection Disease* 55:1063-1056.