



“Utilidad de la PCR múltiple en el diagnóstico microbiológico de la diarrea aguda grave.”

**Máster en Enfermedades Infecciosas y Salud Internacional
Curso 2017-2018**

Trabajo Fin de Máster

Nombre del alumno/a: Elisabet Delgado Sánchez

Nombre del tutor: Francisco Jover Díaz

– **Abstract:**

Gastrointestinal pathology is globally one of the major causes of morbidity and mortality, and its etiological diagnosis is a challenge due to the low profitability of conventional microbiological diagnostic methods. In 2014, the FDA approved a multiple detection panel for enteric pathogens (FilmArray® Gastrointestinal) that allows the detection of 22 different pathogens in 1 hour.

Objective: The goal of this study is to compare the results of the stool culture and the FilmArray® GI with the clinic in patients with severe acute diarrhea.

Method: an observational, cross-sectional and retrospective study was carried out, including 83 patients who had undergone these techniques.

Results: the stool culture was positive only in 8.4% (7 cases). The most isolated microorganism was *Campylobacter jejuni*. Regarding the FilmArray® GI, 24 (28.90%) were positive. In 22.9% (19) only one microorganism was detected, in 4.8% (4) 2 microorganisms were detected simultaneously and in 1 case 3 microorganisms. Both tests were only concordant with each other on 7 occasions, which is 8.4%.

Conclusions: studies with a larger sample are needed to try to show the clinical relevance of the findings of the FilmArray® GI panel and especially when coinfections appear.

– **Resumen:**

Introducción: La patología gastrointestinal supone a nivel mundial una de las mayores causas de morbimortalidad. Su diagnóstico etiológico constituye un reto debido a la escasa rentabilidad de los métodos de diagnóstico microbiológico convencionales. En 2014 la FDA aprobó un panel de detección múltiple para patógenos entéricos (FilmArray® Gastrointestinal) que permite detectar de forma rápida 22 patógenos diferentes.

Objetivo: comparar la rentabilidad diagnóstica de los resultados del coprocultivo y FilmArray® GI en pacientes con diarrea aguda grave.

Método: se realizó un estudio observacional, transversal y retrospectivo, incluyendo 83 pacientes a los que se les había realizado ambas técnicas.

Resultados: Se obtuvo un resultado positivo de coprocultivo el 8.4% (7 casos). El germen más aislado fue *Campylobacter jejuni*. En cuanto a los resultados de FilmArray® GI, resultó positivo en 24 casos (28.9 %). En el 22.9% (n=19) se detectó únicamente un microorganismo, en el 4.8% (n=4) se detectaron 2 microorganismos simultáneamente y en 1 caso 3 microorganismos. Ambas pruebas fueron concordantes entre sí en los 7 casos en los cuales el coprocultivo fue positivo, lo que supone un 8.4%.

Conclusiones: Aunque se necesitan más estudios con una muestra más amplia para tratar de evidenciar qué relevancia clínica tienen los hallazgos del panel FilmArray® GI y

especialmente cuando aparecen coinfecciones, su utilidad clínica puede ser de relevante en caso de diarrea aguda grave.

– **Palabras clave/Keywords**

diarrhea, stool culture, PCR, FilmArray® Gastrointestinal, gastroenteritis, acute gastroenteritis, gastrointestinal illness

– **Índice.**

– Introducción -----	Pág 3
– Objetivos e hipótesis -----	Pág 4
– Revisión bibliográfica -----	Pág 4
– Metodología y análisis -----	Pág 10
– Resultados del trabajo fin de máster -----	Pág 14
– Análisis de los resultados -----	Pág 19
– Discusión -----	Pág 22
– Conclusiones-----	Pág 25
– Bibliografía -----	Pág 26

– **Introducción. Justificación del interés científico del tema elegido objeto del trabajo. Identificación del problema o de las hipótesis de partida.**

El motivo de nuestro estudio es comparar los resultados que ofrecen coprocultivo y FilmArray® Gastrointestinal (FilmArray® GI) en pacientes con diarrea aguda grave. Además, tratar de establecer qué pacientes con diarrea son más susceptibles de tener un resultado positivo en las pruebas microbiológicas y por lo tanto más adecuados para su realización, debido al elevado coste de estas nuevas técnicas.

Por otro lado se pretende observar qué efecto sobre la terapéutica antimicrobiana tienen los resultados microbiológicos, ya que el FilmArray® GI permite detectar en 1 hora, 22 microorganismos, en comparación con las 96 horas que precisa un coprocultivo. Estas características hacen que sea una prueba especialmente útil en pacientes graves, donde un tratamiento empírico adecuado es una de las claves de la evolución favorable y en el estudio de brotes de toxoinfecciones alimentarias, por su rapidez y posibilidad de disminuir la amplitud del mismo.

– **Objetivos**

– **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar los resultados obtenidos con la realización del panel FilmArray® Gastrointestinal en pacientes con diarrea frente al coprocultivo, valorando variables clínicas, analíticas y las características epidemiológicas de la población estudiada.

– **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Describir la población de estudio, sus características epidemiológicas, clínicas y analíticas.
- Determinar el número de FilmArray® Gastrointestinal positivos y coprocultivos positivos.
- Comparar los resultados del FilmArray® Gastrointestinal con los resultados de los coprocultivos y la clínica.

– **Hipótesis**

Comparar los resultados del FilmArray® Gastrointestinal y el coprocultivo en pacientes que presentan diarrea aguda grave.

– **Estado de la cuestión. Revisión bibliográfica de los trabajos más relevantes sobre el tema.**

La patología gastrointestinal supone a nivel mundial una de las mayores causas de morbimortalidad, especialmente en población infantil y en pacientes inmunocomprometidos. Es además un problema de salud pública. La OMS estima que cada año existen 1,7 billones de casos de diarrea, que ocasionan más 750.000 muertes entre niños menores de 5 años (¹). La detección rápida de los patógenos intestinales es relevante debido a que influye en la administración de un tratamiento correcto. La rapidez en el diagnóstico favorece el mejor control de la infección con la adopción de medidas epidemiológicas y preventivas que pretendan evitar o controlar la diseminación de la enfermedad o del brote.

Dentro del contexto clínico de las diarreas, éstas pueden ser producidas por gran variedad de patógenos (bacterias, virus, parásitos). Sin embargo, en la práctica clínica su diagnóstico microbiológico convencional tiene un bajo rendimiento (3 a 5% en coprocultivo) siendo además muy laborioso y con un coste elevado (²). En 2014 la FDA autorizó el panel de PCR rápida múltiple FilmArray® GI (BioFire Diagnostics, LLC). Permite detectar en heces hasta 22 microorganismos: 11 bacterias, 2 toxinas bacterianas, 5 virus y 4 parásitos, de forma rápida (aproximadamente 1 hora) y con un coste de 180 euros por prueba aproximadamente.

En un estudio con 174 muestras procesadas con FilmArray® 111 fueron positivas (63%), 60 negativas y 3 inhibidas. Sin embargo en el análisis con coprocultivo de esas 174 muestras, sólo 9 (6,3%) fueron positivas ⁽³⁾.

Dentro de los métodos diagnósticos habituales en la detección de bacterias se utilizan: Hektoen, McConkey Sorbitol, TCBS, cultivo de *Campylobacter*, CNI *Yersinia*, AS *Plesiomonas shigelloides*, PCR específica para *Salmonella* o *Yersinia*. En la detección convencional de virus gastrointestinales se emplea la detección de antígenos virales y la PCR. Y para el diagnóstico convencional de parásitos gastrointestinales utilizamos observación mediante microscopía, inmunoensayos y PCR.

Es con frecuencia necesaria la realización de varias de estas pruebas para llegar al diagnóstico etiológico de la diarrea, necesitando por ello mayor tiempo y empleo de recursos tanto humanos con materiales. Además exige que los microbiólogos deban de seleccionar de forma adecuada las pruebas apropiadas para llegar al diagnóstico etiológico de una enfermedad con una clínica que impide distinguir entre los numerosos agentes etiológicos. ⁽⁴⁾.

DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA FILM ARRAY

En 2014 la FDA autorizó el panel FilmArray® GI (BioFire Diagnostics, LLC), el cual permite detectar en heces, 22 microorganismos: 11 bacterias, 2 toxinas bacterianas, 5 virus y 4 parásitos. Este panel es una prueba diagnóstica cualitativa multiplexada que permite detectar e identificar simultáneamente ácidos nucleicos procedentes de múltiples bacterias, virus y parásitos directamente en muestras de heces contenidas en medios de transporte Cary Blair. En la Tabla 1 se comparan las tres plataformas de detección múltiple de patógenos gastrointestinales.

		FilmArray® GI (Biofire)	xTAG® GPP (Luminex)	Verigene® EP (Nanosphere)
Nº de patógenos detectados	Bacterias	13	8	7
	Virus	5	3	2
	Parásitos	4	3	-
Total		22	14	9
Tiempo de procesamiento		1 muestra en 80 min	24 muestras en 5 horas	1 muestra en 2 horas
Equipo	Tecnología	PCR anidado + curva de melting	PCR + detección por hibridación perlas	PCR + hibridación nanopartículas
	Sistema	Cerrado / automatizado	Abierto / semiautomatizado	Cerrado / automatizado

Tabla 1. Comparación de los tres paneles de detección múltiple para patógenos entéricos aprobados por la FDA.

La prueba y el análisis se realizan con el analizador BioFire. Se añaden 200 µl de muestra clínica y solución de hidratación a la bolsa FilmArray, y el sistema realiza la extracción de ácidos nucleicos, la PCR múltiple anidada y, finalmente, el análisis de la curva de fusión. La prueba y la interpretación de resultados se completan en aproximadamente 60 min, pero cada instrumento FilmArray procesa una única muestra a la vez.

El panel FilmArray® GI (BioFire Diagnostics, LLC), identifica los microorganismos recogidos en la Tabla 2.

Bacterias	Virus
<i>Campylobacter (C. jejuni / C. coli / C. upsaliensis)</i> <i>Clostridium difficile (toxina A/B)</i> <i>Plesiomonas shigelloides</i> <i>Salmonella</i> <i>Vibrio (V. parahaemolyticus / V. vulnificus / V. cholerae)</i> <i>Yersinia enterocolitica</i>	Adenovirus F 40/41 Astrovirus Norovirus GI / GII Rotavirus A Sapovirus (Genogrupos I, II, IV y V)
E. coli / Shigella diarrogénica	Parásitos
<i>E. coli enteroagregativa (EAEC)</i> <i>E. coli enteropatogénica (EPEC)</i> <i>E. coli enterotoxigénica (ETEC) It/st</i> <i>E. coli productora de toxina tipo Shiga (STEC) stx1/stx2, E. coli O157</i> <i>Shigella / E. coli enteroinvasiva (EIEC)</i>	<i>Cryptosporidium</i> <i>Cyclospora cayetanensis</i> <i>Entamoeba histolytica</i> <i>Giardia lamblia</i>

Tabla 2. Microorganismos detectados por la técnica FilmArray® Gastrointestinal (Biofire).

En particular, el sistema FilmArray® 2.0, permite conectar hasta 8 instrumentos a una sola computadora e interactuar con el sistema de información del laboratorio. Este sistema recibió la aprobación de la FDA en 2015. BioFire recomienda repetir el panel FilmArray® GI si se detecta en una muestra cuatro o más microorganismos diferentes.

Un resultado negativo de FilmArray® GI Panel no excluye la posibilidad de infección gastrointestinal. Se pueden producir resultados negativos de la prueba debidos a variantes de secuencia en la región génica a la que se dirige el ensayo, a la presencia de inhibidores, a errores técnicos, a errores en la mezcla de la muestra o a una infección causada por un organismo no detectado por el panel. Los resultados de la prueba también pueden verse afectados debido a tratamiento con antibióticos concurrentes, o bien, a que los niveles de microorganismos de la muestra que se encuentran por debajo del límite de detección de la prueba.

El rendimiento de FilmArray® GI Panel no se ha determinado en individuos que hayan recibido la vacuna del rotavirus A. La administración oral reciente de esta vacuna, puede

ocasionar resultados positivos para rotavirus A si el virus ha pasado a las heces.

Experiencias previas en el uso del panel FilmArray® GI (BioFire Diagnostics, LLC), para el diagnóstico etiológico de la diarrea aguda.

El rendimiento clínico del FilmArray® GI Panel, se determinó mediante un estudio multicéntrico realizado en cuatro centros de estudio analítico de los Estados Unidos (regiones de Pacífico, Norte Central, Grandes Lagos y Noreste), de mayo a septiembre de 2013, y se incluyeron 1556 muestras de heces contenidas en medio Cary Blair. La población del estudio estaba compuesta en un 54% de mujeres y 46% hombres. La mayoría de los pacientes procedían del medio extrahospitalario (87%), un 3% de urgencias y el 11% eran pacientes hospitalizados. El rango de edad más frecuente fue el de 1-5 años (27% de los pacientes) y de 22-64 años con 26% de los pacientes (⁵).

En su conjunto el panel detectó al menos un microorganismo en un 53.5% de las muestras (832/1556). En un 31.5% de estos resultados positivos (262/832), se produjo detección múltiple de organismos (infecciones mixtas), lo que supone un 16.8% del total de muestras.

En la determinación de STEC stx1 / stx 2, ETEC, EPEC, EIEC /*Shigella*, EAEC, Adenovirus F40/41, Astrovirus, Norovirus GI/GII, Rotavirus A, Sapovirus, *Clostridium difficile* toxina A/B, *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia*, *Cyclospora cayetanesis* y *Entamoeba histolytica*, el método comparativo fue la PCR con confirmación de secuencia bidireccional.

Se evaluaron un total de 1556 especímenes en este estudio. La sensibilidad clínica se calculó como $100\% \times (VP / [VP + FN])$. Siendo Verdadero Positivo (VP) que tanto el FilmArray® GI Panel como el método de referencia/comparativo tuvieron un resultado positivo para un analito específico, y el Falso Negativo (FN) el resultado del FilmArray® GI Panel negativo mientras que el resultado del método comparativo fue positivo.

La especificidad se calculó como el $100\% \times (VN / [VN + FP])$. El verdadero negativo (VN) indica que tanto el FilmArray® GI Panel como el método de referencia/comparativo tuvieron un resultado negativo, y un Falso Positivo (FP) indica que el resultado del FilmArray® GI Panel fue positivo mientras que el resultado del método comparativo fue negativo. Se calculó en intervalo de confianza exacto binomial bilateral del 95%.

BACTERIA	Sensibilidad			Especificidad		
	VP (VP + FN)	%	IC 95%	VN (VN + FP)	%	IC 95%
<i>Campylobacter</i> (<i>C. jejuni</i> / <i>C. coli</i> / <i>C. upsaliensis</i>)	34/35 (b)	97.1	85.1-99.9	1497/1521 (b)	98.4	97.7-99.0
<i>Clostridium difficile</i> toxina A/B (a)	163/165 (c)	98.8	95.7-99.9	1350/1391 (c)	97.1	96.0-97.9
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	3/3	100	29.2-100	1538/1553 (d)	99.0	98.4-99.5
<i>Salmonella</i>	31/31	100	88.8-100	1519/1525 (e)	99.6	99.1-99.9
<i>Vibrio</i> (<i>V. parahaemolyticus</i> / <i>V. vulnificus</i> / <i>V. cholerae</i>)	0/0	-	-	1554/1556 (f)	99.9	99.5-100
<i>Vibrio cholerae</i>	0/0	-	-	1555/1556 (g)	99.9	99.6-100
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1/1	100	N/A	1555/1555	100	99.8-100
<i>E. coli</i> enteroagregativa (EAEC)	82/83	98.8	93.5-100	1446/1473 (h)	98.2	97.3-98.8
<i>E. coli</i> enteropatogénica (EPEC)	314/317	99.1	97.3-99.8	1167/1201 (i)	97.2	96.1-98.0
<i>E. coli</i> enterotoxigénica (ETEC) <i>lt/st</i>	22/22	100	84.6-100	1525/1534 (j)	99.4	98.9-99.7
<i>E. coli</i> productora de toxina tipo Shiga (STEC) <i>stx1/stx2</i>	33/33	100	89.4-100	1518/1523 (k)	99.7	99.2-99.9
<i>E. coli</i> O157 (a)	3/3	100	29.2-100	34/35 (l)	97.1	85.1-99.9
<i>Shigella/E. coli</i> enteroinvasiva (EIEC)	47/49	95.9	86.0-99.5	1505/1507	99.9	99.5-100
PARÁSITOS						
<i>Cryptosporidium</i>	18/18	100	81.5-100	1532/1538 (m)	99.6	99.2-99.9
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	19/19	100	82.4-100	1537/1537	100	99.8-100
<i>Entamoeba histolytica</i>	0/0	-	-	1556/1556	100	99.8-100
<i>Giardia lamblia</i>	20/20	100	83.2-100	1529/1536 (n)	99.5	99.1-99.8
VIRUS						
Adenovirus F 40/41	42/44 (o)	95.5	84.5-99.4	1499/1512 (o)	99.1	98.5-99.5
Astrovirus	7/7	100	59.0-100	1548/1549 (p)	99.9	99.6-100
Norovirus GI/GII	52/55 (q)	94.5	84.9-98.9	1483/1501 (q)	98.8	98.1-99.3
Rotavirus A	6/6	100	54.1-100	1538/1550 (r)	99.2	98.7-99.6
Sapovirus (genogrupos I, II, IV, V)	46/46	100	92.3-100	1497/1510 (s)	99.1	98.5-99.5

Tabla 3. Sensibilidad y especificidad del FilmArray® Gastrointestinal para los diferentes microorganismos detectados.

a- El comportamiento de *C. difficile* se notifica como coincidencia de porcentaje positivo/coincidencia de porcentaje negativo, y el comportamiento de *E. coli* O157 se notifica como sensibilidad/especificidad, a diferencia de los encabezados de sus secciones respectivas. Las medidas de comportamiento de sensibilidad y especificidad solo se refieren a aquellos analitos para los que se utilizó el cultivo bacteriano patrón oro como método de referencia; *Campylobacter*, *E. coli* O157, *Plesiomonas shigelloides*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Vibrio*

cholerae, y *Yersinia enterocolitica*. Las medidas de comportamiento de coincidencia de porcentaje positivo (PPA) y coincidencia de porcentaje negativo (NPA) se refieren a otros analitos, para los que se utilizaron ensayos mediante PCR/secuenciación como métodos de comparación.

b- *Campylobacter jejuni* subsp. *doylei* se identificó en el único espécimen negativo falso usando análisis de secuencia bidireccional. Se detectó *Campylobacter* en 19/24 especímenes positivos falsos usando análisis de secuencia bidireccional.

c- Se detectó *C. difficile* en 1/2 especímenes negativos falsos y en 41/41 especímenes positivos falsos usando análisis de secuencia bidireccional.

d- Se detectó *P. shigelloides* en 15/15 especímenes positivos falsos usando análisis de secuencia bidireccional.

e- Se detectó *Salmonella* en 6/6 especímenes positivos falsos usando análisis de secuencia bidireccional.

f- Se detectó *Vibrio* en 2/2 especímenes positivos falsos usando análisis de secuencia bidireccional.

g- Se detectó *V. cholerae* en el único espécimen positivo falso usando análisis de secuencia bidireccional.

h- Se detectó EAEC en 27/27 especímenes positivos falsos usando análisis de secuencia bidireccional.

i- Se detectó EPEC en 23/34 especímenes positivos falsos usando análisis de secuencia bidireccional.

j- Se detectó ETEC en 6/9 especímenes positivos falsos usando análisis de secuencia bidireccional. Se determinó que los tres resultados positivos falsos restantes habían sido causados por reactividad cruzada con *Citrobacter koseri* (2 instancias), y *Hafnia alveiv* (1 instancia). Estas bacterias contienen una variante del gen *fliP* con similitud de secuencia a los cebadores del ensayo.

k- Se detectó STEC en 5/5 especímenes positivos falsos usando análisis de secuencia bidireccional.

l- Se detectó *E. coli* O157 en el único espécimen positivo falso usando análisis de secuencia bidireccional.

m- Se detectó *Cryptosporidium* en 6/6 especímenes positivos falsos usando análisis de secuencia bidireccional.

n- Se detectó *G. lamblia* en 4/7 especímenes positivos falsos usando análisis de secuencia bidireccional. Dos resultados positivos falsos parece que fueron causados por reactividad cruzada con *Bifidobacterium longum* y *Ruminococcus callidus*.

o- Se detectó adenovirus en 1/2 especímenes negativos falsos y en 11/13 especímenes positivos falsos usando análisis de secuencia bidireccional.

p- Se detectó astrovirus en el único espécimen positivo falso usando análisis de secuencia bidireccional.

q- El sistema FilmArray® GI detectó norovirus en 1/3 especímenes negativos falsos al volver a realizar la prueba. Se detectó norovirus en 1/2 especímenes negativos falsos restantes y en 8/18 especímenes positivos falsos usando análisis de secuencia bidireccional.

r- Se detectó rotavirus A en 11/12 especímenes positivos falsos usando análisis de secuencia bidireccional.

s- Se detectó sapovirus en 12/13 especímenes positivos falsos usando análisis de secuencia bidireccional.

El FilmArray® GI tuvo una sensibilidad del 100% para 12 patógenos: *Plesiomonas shigelloides*, *Salmonella*, *Yersinia enterocolitica*, *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* productora de toxina tipo Shiga (STEC) *stx1/stx2*, *E. coli* O157a, *Cryptosporidium*, *Cyclospora cayetanensis*, *Giardia lamblia*, Astrovirus, Rotavirus A, Sapovirus. Para el resto de patógenos la sensibilidad fue mayor o igual a 94,5%. La especificidad fue del 98,4%. En el caso de la detección de *Campylobacter*, *E. coli* O157, *Plesiomonas shigelloides*,

Salmonella, *Vibrio* y *V. cholerae*, y *Yersinia enterocolitica* el método de referencia para comparar fue el Cultivo de heces : Agar sangre, agar sangre con ampicilina, agar de MacConkey, agar de sorbitol-MacConkey, caldo GN + agar entérico de Hektoen, agar de Campylobacter, agar de Cefsulodin-Irgasan™-Novobiocin y agar de sales biliares con trisulfato citrato) con métodos de identificación microbiológica/bioquímica normalizados manuales y automatizados.

Los resultados se resumen en la Tabla 3.

– **Metodología para el alcance de los objetivos definidos:**

- **Diseño (tipo de estudio).** Evaluación de prueba diagnóstica; observacional, transversal, retrospectivo.
- **Población diana:** población con síntomas de diarrea.
- **Población accesible:** todos los pacientes con diarrea aguda grave, ileítis, diarrea del viajero o diarrea en inmunodeprimidos a los que se realiza FilmArray® Gastrointestinal y coprocultivo en el Hospital Clínico Universitario de San Juan de Alicante, tanto ingresados como pacientes ambulatorios, desde el 1 de septiembre de 2016 al 17 de mayo de 2018.
- **Sujetos (criterios de inclusión, exclusión, número y muestreo).**

Criterios de inclusión

Pacientes con diarrea aguda grave, diarrea en inmunodeprimidos, ileítis o diarrea del viajero en el Hospital Clínico Universitario de San Juan de Alicante hospitalizados y de consultas externas que tuvieran realizado coprocultivo y FilmArray® Gastrointestinal entre el 1 de septiembre de 2016 al 17 de mayo de 2018.

Inicialmente debido al coste de adquisición directo de la técnica en nuestro hospital, se estableció un protocolo de uso con las indicaciones de dicha prueba, que incluían: diarrea grave, diarrea en el inmunodeprimido, diarrea del viajero, e ileítis.

Se definió como diarrea aguda a la presencia de 3 ó más deposiciones líquidas (Bristol tipo 7) \geq 24 horas hasta 14 días, que puede ir acompañada o no por otras manifestaciones como dolor cólico, náuseas, vómitos, fiebre, tenesmo, urgencia, o presencia de sangre/moco/pus en heces.

Para diarrea grave la definición fue diarrea que cursa con postración, fiebre ($T^a > 38^{\circ}\text{C}$), síntomas o signos de deshidratación (ortostatismo, oliguria, hipotensión, taquicardia, hemoconcentración, insuficiencia renal), presencia de sangre, moco o pus en heces.

La diarrea del viajero se suele presentar en personas que viajan a países no desarrollados o en vías de desarrollo. En cuanto a la diarrea en inmunodeprimido se incluyen pacientes oncológicos en tratamiento con quimioterapia o inmunoterapia, infección VIH, corticoides, tratamientos inmunosupresores o biológicos. Para diarrea grave la definición fue diarrea que cursa con postración, fiebre ($T^a > 38^{\circ}\text{C}$), síntomas o signos de deshidratación (ortostatismo, oliguria, hipotensión, taquicardia, hemoconcentración, insuficiencia renal), presencia de sangre, moco o pus en heces. Y en cuanto a la ileítis aguda consiste en un cuadro clínico sugestivo con al menos una prueba de imagen donde se describa la alteración del íleon (engrosamiento de la pared del íleon, rarefacción del mesenterio, líquido libre intraabdominal o colecciones).

Cálculo del tamaño muestral

Con una población adscrita al Departamento de Salud 17 de 216.610 habitantes en 2016, siendo la prevalencia nacional de diarrea aguda infecciosa en 2016 de 0,048% , se calcula la población accesible, que es de 10397 habitantes. Se calcula el tamaño muestral con un IC del 95% y un margen de error del 5%, la N debería ser 371; dado que no tenemos ese tamaño muestral, se puede considerar este estudio como un estudio piloto.

Muestreo no probabilístico, consecutivo.

Se incluyeron todos los pacientes que cumplieran los criterios de inclusión definidos, sin muestreo, debido a la muestra pequeña de la que se dispone.

Variables a estudio

Se recogen siguiendo el cuestionario que se encuentra en el anexo. Características epidemiológicas, clínicas, analíticas de la población

VARIABLES INDEPENDIENTES:

Epidemiológicas:

- edad, sexo, nacionalidad

- infección comunitaria o nosocomial
- procedente de ingreso o de consultas externas
- contacto con persona con diarrea, consumo de crudos
- **Clínicas:**
 - comorbilidades
 - presencia o no de inmunosupresión
 - consumo previo de antibiótico
 - consumo previo de inhibidores de la bomba de protones
 - cirugía abdominal previa
 - duración de los síntomas
 - dolor abdominal
 - astenia
 - fiebre
 - distermia
 - cefalea
 - náuseas
 - vómitos
 - diarrea con más de 6 deposiciones al día
 - diarrea con sangre
 - frecuencia cardíaca mayor de 100 lpm
 - hipotensión arterial definida como TAS < 90 mmHg
 - tratamiento médico
 - tratamiento antibióticos
 - tratamiento quirúrgico
 - cambio en el tratamiento tras resultados microbiológicos
 - resolución, recaída o complicación
- **Analíticas:**
 - leucocitosis, trombopenia, anemia, alteración de la coagulación
 - PCR elevada, procalcitonina elevada
- **Pruebas complementarias:**
 - realización de colonoscopia
 - realización de ecografía abdominal o TAC abdominal
 - realización de antígenos de rotavirus y adenovirus y resultados, realización

de GDH y toxina de *C. difficile* y resultados

- parásitos en heces
- hemocultivos
- serología de Anisakis

VARIABLE DEPENDIENTE:

Resultados del coprocultivo y del FilmArray® GI.

Recogida de variables.

Se realiza mediante la búsqueda en el programa IGestLab de las palabras “FilmArray® Gastrointestinal”. Se obtienen todos los pacientes con FilmArray® Gastrointestinal y coprocultivo realizado entre 1 de septiembre de 2016 al 17 de mayo de 2018, y se anonimizan los datos en una base de datos creada en SPSS, asignando a cada paciente codificado con número de historia clínica un número para su registro.

Para la recogida de las características clínicas, epidemiológicas, analíticas, y resultados de pruebas complementarias, se realiza una búsqueda del paciente en el programa OrionClinic.

-Análisis de datos.

Mediante SPSS, creando una base de datos, con recogida de variables y utilizando el test de Chi-cuadrado en variables categóricas.

-Plan de Trabajo con cronograma según Tabla 4.

	Oct 2017	Nov 2017	Dic 2017	Ene 2018	Feb 2018	Mar 2018	Abr 2018	May 2018	Jun 2018	Jul 2018	Ago 2018	Sep 2018
Tarea realizada	Inicio del máster	Búsqueda de bibliografía sobre el tema			Asignación de tutor y título del TFM	Elaboración de la hoja de recogida de datos. Recogida de datos y creación de la base de datos en SPSS.			Análisis de los datos, discusión con la bibliografía publicada hasta el momento. Finalización del TFM.		Envío del TFM.	Presentación del TFM.

Tabla 4. Cronograma del plan de trabajo.

-Dificultades y Limitaciones.

El estudio se ha realizado con pacientes únicamente enfermos; no se incluyen

pacientes sanos debido a que la técnica de PCR es costosa y debe realizarse en heces líquidas.

El estudio sólo puede valorar el resultado de coprocultivo y FilmArray®

Gastrointestinal con la clínica debido a que el gold standard es el coprocultivo a pesar de su bajo rendimiento.

No se recogen datos en sanos, por lo tanto sólo se puede valorar la concordancia entre ambas pruebas.

-Aspectos Éticos a tener en cuenta

Nuestro estudio sigue los principios de la Declaración de Helsinki y de buenas prácticas clínicas. Se han anonimizado los datos mediante la creación de una base de datos en la que se registran los pacientes con un número asignado a su número de historia clínica. El estudio está pendiente de pasar el Comité de Ética Hospitalario.

-Aplicabilidad y utilidad práctica de los resultados obtenidos o previsibles

El FilmArray® GI es una técnica con una alta rentabilidad en la detección de patógenos entéricos comparada con los métodos tradicionales ^(6,7). Es además una técnica rápida, ofreciendo resultados en 1 hora, y permitiendo una modificación precoz del tratamiento antibiótico. Sin embargo el todavía relativo alto coste de adquisición hace que se restrinja su utilización. En nuestro hospital, se elaboró un protocolo conjunto entre la Unidad de Enfermedades Infecciosas, Microbiología, y Medicina Digestiva, estableciendo los grupos de pacientes candidatos a esta prueba, y se incluyeron los pacientes con diarrea grave, diarrea del viajero, diarrea en pacientes inmunodeprimidos y las ileítis terminales evidenciadas en pruebas de imagen.

Con este estudio piloto pretendemos poner de manifiesto los resultados obtenidos del FilmArray® GI comparados con el coprocultivo y técnicas convencionales, además de ver si existen características clínicas o analíticas que indiquen qué pacientes tienen más posibilidades de obtener un resultado positivo en dichas pruebas.

Debido a que las técnicas convencionales son muy laboriosas, precisan de hasta 4 días en el caso del coprocultivo para obtener resultados y ofrecen escasos resultados (sensibilidad del 6-8% en el caso del coprocultivo), tratamos de evidenciar si el FilmArray® GI es rentable en estos pacientes más graves.

A pesar de que los estudios muestran una mayor rentabilidad clínica del FilmArray® GI, debido a la escasa sensibilidad del gold standard (coprocultivo) que es la técnica de referencia, se presentan dudas acerca de la relevancia clínica de los resultados y especialmente de las coinfecciones ^(8,9).

En conjunto esta técnica ofrece un gran avance en la rapidez para el diagnóstico etiológico de las infecciones gastrointestinales, con beneficio clínico (tratamiento antibiótico adecuado precoz, aislamiento de pacientes infecto-contagiosos) y una probable reducción del coste total mediante la reducción en la hospitalización, y la disminución del consumo de antibióticos, de pruebas complementarias (radiodiagnóstico, endoscopias...) y ahorro en QALYs. Además esta técnica ha sido evaluada favorablemente por el instituto NICE (National Institute for Health and Care Experience) ⁽¹⁰⁾.

-Presupuesto

Revisión de artículos en Pubmed mediante el acceso prestado a través de la hemeroteca de la Universidad Miguel Hernández y la hemeroteca del Hospital de San Juan de Alicante.

Material fungible para impresión de bibliografía, como folios DIN A4 y tóner negro para impresora.

RESULTADOS DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER

Utilidad de la PCR múltiple en el diagnóstico microbiológico de la diarrea aguda grave.

DATOS OBTENIDOS MEDIANTE LA APLICACIÓN DEL PROTOCOLO

Se incluyen en nuestro estudio todos los pacientes a los que se le realizó coprocultivo y FilmArray® GI entre el 5 de septiembre de 2016, fecha en la que dispusimos de la prueba en nuestro hospital, y el 17 de mayo de 2018. Se recogieron 83 pacientes.

En cuanto a las características de la población, la edad siguió una distribución normal (Z de Kolmogorov-Smirnov de 0.562); la media de edad fue 47,67 años y la mediana de edad fue de 46 años con una desviación típica de 22,65. De los 83 pacientes, 30 fueron mujeres (36,10%) y 53 hombres (63,90%). 75 pacientes tenían nacionalidad española (90,36%), y 8 eran extranjeros, siendo la nacionalidad más frecuente la británica (3 pacientes).

Un 54.20% de los pacientes tomaban tratamiento inmunosupresor. De ellos, 9 (10.90%) estaban en tratamiento con quimioterapia, 18 pacientes estaban en tratamiento con corticoides (21.70%), 15 tratamiento con azatioprina (18.10%), 20 pacientes estaban en tratamiento con fármacos biológicos (24.10%), 3 pacientes con metotrexate (3.60 %), y 1 paciente era VIH positivo (1,20%). 17 pacientes (20,48%) llevaban dos fármacos inmunosupresores, siendo la combinación más frecuente la de corticoides con fármacos biológicos. Tres pacientes estaban en tratamiento con tres fármacos inmunosupresores (3,60%).

De los 83 pacientes, sólo en 1 la diarrea fue de origen nosocomial (1.20%). Un 79,5% de los pacientes procedían de la hospitalización y un 20,5% de las consultas externas.

El 80,7% (n=67) de los pacientes presentaban comorbilidades, siendo la enfermedad más frecuente la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) presente en 39 pacientes (47%). 11 pacientes tenían cáncer (13.30%), 3 psoriasis (3.60%), 2 artritis reumatoide (2.40%).

Un 18.10% de los pacientes había consumido antibióticos antes del comienzo del cuadro de diarrea y 30.10% tomaba inhibidores de la bomba de protones. A un 31,3% se les había realizado cirugía abdominal en algún momento de su vida.

En cuanto al motivo de petición, en 45 casos se solicitó la prueba por clínica de diarrea en inmunodeprimido (54.2%), 26 casos por diarrea grave (31.3%), 9 casos de ileítis (10.8%), y 3 de diarrea del viajero (3.6%). Sólo 3 (3.6%) de los pacientes habían tenido contacto con personas con gastroenteritis aguda.

En la duración de los síntomas la media de días fue de 20.19 días, y la mediana de 6 días. (Siguió una distribución normal, con Z de Kolmogorov-Smirnov de 3.25).

Respecto a la clínica el 84.3% de los pacientes presentaban dolor abdominal, un 25.3% astenia, un 34.9% fiebre, el 50.6% náuseas, el 43.4% vómitos, y un 31.3% diarrea con sangre.

Un 24.1% de los pacientes tenía taquicardia en la exploración física, y un 9.6% hipotensión arterial.

En los hallazgos analíticos, un 28.90% presentaban leucocitosis, 7.20% trombopenia, anemia en el 44.6%, alteraciones de la coagulación en el 47%. Un 73.5% presentaban elevación de la PCR. En un 36.10% de los casos (30) se realizó dentro del estudio colonoscopia, con hallazgos en 17 casos compatibles con enfermedad inflamatoria intestinal. En 51 pacientes (61.44%) fue preciso realizar una técnica de imagen radiológica, a 41 se les realizó un TAC y a 10 una ecografía (49,4% y 12% respectivamente).

Con respecto a las pruebas microbiológicas el coprocultivo sólo fue positivo en el 8.4% (7 casos) ^(2,6). El germen más aislado fue *Campylobacter jejuni* en 3 ocasiones y además se aisló *Aeromonas spp* en 1 ocasión, *Yersinia enterocolitica* en 1 caso, *Escherichia coli* en 1 caso y *Candida* y

Staphylococcus aureus meticilin sensible en 1 caso respectivamente . Los resultados quedan recogidos en la Tabla 5.

Resultados coprocultivo	Frecuencia	Porcentaje
Negativos	76	91,60%
<i>Aeromonas</i>	1	1,20%
<i>Campylobacter jejuni</i>	3	3,60%
<i>E. coli</i>	1	1,20%
SAMS y <i>Candida spp.</i>	1	1,20%
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1	1,20%
Total	83	100,00%

Tabla 5. Resultados del coprocultivo.

	Frecuencia	Porcentaje %
Negativo	59	71,1
Adenovirus	1	1,2
<i>C. difficile</i>	3	3,6
<i>Campylobacter jejuni</i>	3	3,6
<i>Campylobacter jejuni</i> Sapovirus	1	1,2
<i>C. difficile</i> , <i>Y. enterocolitica</i> , EPEC (<i>E. coli</i> enteropatógeno)	1	1,2
EAEC (<i>E. coli</i> enteroagregativo) y ETEC (<i>E.</i> <i>coli</i> enterotoxigénico)	1	1,2
EAEC y EPEC	1	1,2
EIEC (<i>E. coli</i> enteroinvasivo)	1	1,2
EPEC	2	2,4
<i>Giardia lamblia</i>	1	1,2
Norovirus	3	3,6
Rotavirus	2	2,4
<i>Salmonella</i> y EAEC	1	1,2
Sapovirus	1	1,2
<i>Shigella</i> o EIEC	1	1,2
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1	1,2
Total	83	100,0

Tabla 6. Resultados del FilmArray® GI.

El antígeno de rotavirus y adenovirus se realizó en el 45.8% de las ocasiones, siendo positivo solamente en 1 caso. La determinación de la toxina y GDH de *Clostridium difficile* se efectuó en el 77.1% de los casos , siendo positiva únicamente en 2 casos. El estudio de parásitos se realizó en el 20.5% de las ocasiones, resultando todos los estudios negativos.

De los 83 paneles FilmArray® Gastrointestinal resultaron positivos 24 (28.90%). Los resultados quedan reflejados en la siguiente Tabla 6.

En el 22.9% (19) se detectó únicamente un microorganismo. En el 4.8% (4) se detectaron 2 microorganismos simultáneamente y en 1 caso 3 microorganismos. Las pruebas microbiológicas (resultado de coprocultivo y FilmArray® GI) sólo fueron concordantes entre sí en 7 ocasiones, lo que supone un 8.4% de las ocasiones. La Tabla 7, refleja los resultados de ambas técnicas.

Paciente número	coprocultivo	Ag de adenovirus y rotavirus	GDH y toxina <i>C. difficile</i>	FilmArray GI	Concordancia
1	<i>Aeromonas spp</i>	-	.	<i>Salmonella</i> y <i>EAEC</i>	no
3	-	-	-	Sapovirus	no
4	-	-	-	<i>C. difficile</i> , <i>Y. enterocolitica</i> , <i>EPEC</i>	no
5	<i>C. jejuni</i>	-	-	<i>C. jejuni</i> , Sapovirus	sí
8	.	.	.	Adenovirus	no
11	-	-	-	<i>Giardia lamblia</i>	no
17	<i>C. jejuni</i>	-	-	<i>C. jejuni</i>	si
19	-	-	-	EPEC	no
24	-	-	-	Norovirus	no
27	-	Positivo	-	Rotavirus	sí
28	-	-	-	Rotavirus	no
32	-	-	-	EPEC	no
34	<i>C. jejuni</i>	-	-	<i>C. jejuni</i>	sí
42	-	-	-	<i>C. difficile</i>	no
44	-	-	-	EAEC y ETEC	no
48	SAMS y <i>Candida spp</i>	-	-	<i>C. jejuni</i>	no
49	-	-	positivo	<i>C. difficile</i>	sí
56	-	-	-	EAEC y EPEC	no
69	<i>E. coli</i>	.	.	EIEC	sí
72	<i>Y. enterocolitica</i>	-	-	<i>Y. enterocolitica</i>	sí
75	-	-	-	Norovirus	no
76	-	-	-	<i>C. difficile</i>	no
77	-	-	-	<i>Shigella</i> o EIEC	no
78	-	-	positivo	-	no
83	-	-	-	Norovirus	no

Tabla 7. Resultados positivos del coprocultivo y FilmArray® GI y concordancia.

En el 28.9% de los casos al paciente se le realizaron hemocultivos que resultaron positivos en el 6% de los casos. A 2 pacientes se les realizó serología de *Anisakis* resultando positiva en ambos.

Respecto al tratamiento, el 98.8% recibió tratamiento médico para el cuadro de diarrea. En un 72.3% se aplicó tratamiento antibiótico. Sólo 1 paciente (1.2%) precisó de tratamiento quirúrgico,

por el hallazgo concomitante de una neoplasia de colon estenosante.

En cuanto al cambio o ajuste del tratamiento antibiótico tras los resultados microbiológicos, sólo un 57.80% se adaptó a los resultados obtenidos de todas las técnicas en conjunto. En un 42,20% de los casos no se modificó el tratamiento a pesar de los resultados de la microbiología; de esos 35 casos, en 3 no se añadió tratamiento pese a resultado positivo microbiológico y en 32 no retiró el antibiótico a pesar de resultados negativos en las pruebas microbiológicas.

Finalmente la evolución fue hacia la resolución en el 94% de los casos. 6 casos recayeron (7.2%) y 5 casos resultaron éxitos (6.0%).

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Para analizar la posible relación entre la inmunosupresión y un resultado positivo en el FilmArray® GI, se realizó el test de Chi-cuadrado. En los pacientes inmunodeprimidos, resultaron positivas 10 pruebas FilmArray GI® y 35 negativos. En los pacientes no inmunodeprimidos hubo 14 resultados positivos y 24 negativos. La Chi cuadrado fue de 2,142, por lo tanto no se puede considerar que el estado inmune influya en la positividad de la prueba.

Existen también publicaciones que ponen de manifiesto que es menos probable obtener un resultado positivo del FilmArray® GI si el paciente tiene celiacía o enfermedad inflamatoria intestinal. En nuestro estudio no se puede demostrar dicha relación. De 39 pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal 13 pruebas resultaron positivas, con un valor de Chi-cuadrado de 0,699 (¹¹) si bien esto podría deberse a que el tamaño muestral de nuestro estudio era pequeño (n=83).

Desglosado por el tipo de inmunosupresión todos los resultados fueron no significativos.

En cuanto a la quimioterapia de 9 pacientes con quimioterapia sólo fue positivo 1 FilmArray® GI, de 74 pacientes sin quimioterapia resultan positivas 23 pruebas siendo el valor de Chi-cuadrado 1,557.

Con respecto a los corticoides de 18 pacientes en tratamiento con ellos, 3 FilmArray® GI resultaron positivos, mientras que de 65 sin corticoides 21 fueron positivos, siendo el valor de Chi-cuadrado 1,678. De 15 pacientes en tratamiento con azatioprina 3 tuvieron un resultado positivo en el FilmArray® GI mientras que de los 68 sin azatioprina resultaron 21 positivos. El valor de Chi-cuadrado fue de 0,708.

En el grupo de tratamiento con biológicos, de 20 pacientes resultaron positivos 5 FilmArray® GI y de los 63 sin biológicos, 19 positivos, siendo Chi-cuadrado 0,197.

Tampoco se puede demostrar que exista mayor posibilidad de un resultado positivo en el coprocultivo si el paciente estaba inmunosuprimido, de 45 pacientes inmunosuprimidos, sólo se obtuvieron 2 resultados positivos, siendo el resultado de Chi-cuadrado 2,026.

Analizando el motivo de petición del FilmArray® GI y la probabilidad de un resultado positivo en coprocultivo y FilmArray® GI:

- en las ileítis, de 9 pacientes con ileítis, sólo 2 coprocultivos resultaron positivos (Chi-cuadrado 2,485). En los FilmArray® GI de 9 pacientes, 4 test fueron positivos (Chi-cuadrado 1,184).
- en las diarreas graves, de 26 pacientes, 3 tuvieron un resultado positivo en el coprocultivo, (Chi-cuadrado 0.473). Para el FilmArray® GI de 26 pacientes 7 resultaron positivos, con Chi-cuadrado de 0,073.
- En diarrea del viajero, de 3 pacientes sólo resultó positivo 1 coprocultivo (Chi-cuadrado 2,499) y 2 FilmArray® GI fueron positivos (Chi-cuadrado 2,158).
- y en la diarrea en inmunodeprimidos, de 45 pacientes, sólo hubo 1 coprocultivo positivo (Chi-cuadrado 4,911), y 11 FilmArray® GI fueron positivos (Chi-cuadrado 0,956).

Respecto a la clínica, y la posibilidad de influir en la positividad de los resultados microbiológicos, los datos se reflejan en la Tabla 8.

		coprocultivo		Chi-cuadrado	FilmArray GI		Chi-cuadrado
		negativo	positivo	Chi-cuadrado	negativo	positivo	Chi-cuadrado
Dolor abdominal	no	12	1	0,011	9	4	0,026
	sí	64	6		50	20	
astenia	no	56	6	0,491	44	18	0,002
	sí	20	1		15	6	
fiebre	no	52	2	4,478	40	14	0,672
	sí	24	5		19	10	
distermia	no	51	2	4,124	40	13	1,373
	sí	25	5		19	11	
Artralgias mialgias	no	70	7	0,596	55	22	0,061
	sí	6	0		4	2	
cefalea	no	72	7	0,387	56	23	0,031
	sí	4	0		3	1	
náuseas	No	38	3	0,131	30	11	0,172
	sí	38	4		29	13	
vómitos	no	44	3	0,590	34	13	0,083
	sí	32	4		25	11	
Diarrea >6 deposiciones	no	34	3	0,009	28	9	0,685
	sí	42	4		31	15	
Diarrea con sangre	no	53	4	0,473	43	14	1,678
	sí	23	3		16	10	

Tabla 8. Características clínicas de nuestra población.

En cuanto al dolor abdominal, parecía influir en la posibilidad de obtener un resultado positivo tanto en el coprocultivo como en el FilmArray® GI (Chi-cuadrado < 0.05). La OR fue de 1,125 para el coprocultivo con IC 95% (0,124 – 10,204) pero sin embargo en el FilmArray® GI la OR fue 0,900 con IC 95% 0,249 – 3,259).

La astenia y la cefalea se muestran como factor de riesgo para tener un resultado positivo en el FilmArray® GI (Chi-cuadrado < 0,05). Para la astenia la OR fue de 0,978 con IC 95% (0,327 – 2,920). La cefalea tuvo una OR de 0,812 y un IC 95% (0,080 – 8,214).

Y por último la diarrea con más de 6 deposiciones al día, aparece como factor de riesgo para un resultado positivo del coprocultivo con Chi-cuadrado de 0,009, y OR 1,079 e IC 95% (0,226 – 5,156).

		Coprocultivo		Chi-cuadrado	FilmArray GI		Chi-cuadrado
		negativo	positivo		negativo	positivo	
leucocitosis	no	55	4	0,723	42	17	0,001
	sí	21	3		17	7	
trombopenia	no	71	6	0,568	54	23	0,472
	sí	5	1		5	1	
anemia	no	41	5	0,793	31	15	0,685
	sí	35	2		28	9	
Alteración coagulación	no	41	3	0,316	28	16	2,527
	sí	35	4		31	8	
Pcr elevada	no	22	0	2,757	15	7	0,123
	sí	54	7		44	17	
procalcitonina	no	5	0	0,988	5	0	2,185
	sí	5	1		4	2	

Tabla 9. Análisis de los resultados de la analítica de sangre en nuestros pacientes.

En cuanto a la duración de la clínica, hay estudios que muestran la mayor probabilidad de obtener un resultado positivo en el FilmArray® GI si la duración de la clínica es inferior a 72 horas ⁽⁶⁾. En nuestro estudio, de 25 pacientes con síntomas de duración inferior a 72 horas obtuvimos 3 coprocultivos positivos (Chi-cuadrado 0,589), y 10 FilmArray® GI positivos (Chi-cuadrado 2,138). En cuanto a los signos clínicos, de los 20 pacientes que presentaban taquicardia (definida como frecuencia cardíaca mayor de 100 lpm), 2 coprocultivos fueron positivos (Chi-cuadrado 0,084) y 4 FilmArray® GI positivos (Chi-cuadrado 1,019). De los 80 pacientes que presentaban hipotensión durante el diagnóstico, resultó 1 coprocultivo positivo (Chi-cuadrado 0,190) y 3 FilmArray® GI positivos (Chi-cuadrado 0,317).

Los resultados respecto a los hallazgos analíticos se muestran en la Tabla 9.

Sólo la leucocitosis aparece como factor de riesgo de obtener un resultado positivo en el FilmArray® GI con Chi-cuadrado de 0,001 y OR 1,017.

DISCUSIÓN

El objetivo de nuestro estudio es comparar los resultados del FilmArray® Gastrointestinal y coprocultivo en pacientes con la clínica en pacientes que presentan diarrea, para poder establecer qué pacientes son más adecuados para la realización de un panel múltiple PCR gastrointestinal. Los métodos convencionales de detección etiológica de patógenos gastrointestinales ofrecen una baja sensibilidad, la necesidad de técnicas laboriosas y personal de laboratorio, resultando costoso el diagnóstico.

Los paneles PCR múltiple tienen un coste por prueba más elevado (180 euros aproximadamente); sin embargo ofrecen resultados sobre 23 patógenos en 1 hora, lo que los hace especialmente útiles en pacientes graves, inmunodeprimidos o en el estudio de brotes de toxoinfección alimentaria, para tratar de erradicar lo más pronto posible el brote y/o evitar su progresión.

Debido a lo costoso de la técnica en nuestro hospital, se estableció un protocolo con las indicaciones de dicha prueba, que incluían: diarrea grave, diarrea en el inmunodeprimido, diarrea del viajero, e ileítis.

En el estudio se incluyen todos los pacientes a los que se les realizó coprocultivo y FilmArray® GI entre el 1 de septiembre de 2016 al 17 de mayo de 2018.

Se han publicado estudios que muestran la mayor probabilidad de obtener un resultado positivo en el FilmArray® GI si la duración de la clínica es inferior a 72 horas ⁽⁶⁾. En nuestro estudio, de 25 pacientes con síntomas de duración inferior a 72 horas obtuvimos 3 coprocultivos positivos (Chi-cuadrado 0,589), y 10 FilmArray GI positivos (Chi-cuadrado 2,138).

Valorando el coprocultivo sólo fue positivo en el 8.4% (7 casos), concordante con lo publicado hasta el momento. El germen más aislado fue *Campylobacter jejuni* en 3 ocasiones y además se aisló *Aeromonas spp* en 1 ocasión, *Yersinia enterocolitica* en 1 caso, *Escherichia coli* en 1 caso y *Candida* y *Staphylococcus aureus* meticilin sensible en 1 caso, respectivamente.

Un 54.20% de los pacientes tomaban tratamiento inmunosupresor. De ellos 9 (10.90%) estaban en tratamiento con quimioterapia, 18 pacientes estaban en tratamiento con corticoides (21.70%), 15 tratamiento con azatioprina (18.10%), 20 tratamiento con biológicos (24.10%), 3 pacientes metotrexate (3.60 %), y 1 paciente era VIH positivo (1,20%). 17 pacientes (20,48%) llevaban dos fármacos inmunosupresores, siendo la combinación más frecuente la de corticoides con biológicos. Y 3 pacientes estaban en tratamiento con tres fármacos inmunosupresores (3,60%). El 80,7% (67)

de los pacientes presentaban comorbilidades, siendo la enfermedad más frecuente la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) presente en 39 pacientes (47%).

En el estudio de Nobel ⁽¹⁾ se muestra que en los pacientes con celiaquía o enfermedad inflamatoria intestinal es más probable que el FilmArray® GI resulte negativo, al igual que en nuestro estudio.

Respecto a la clínica el 84.3% de los pacientes presentaban dolor abdominal, un 25.3% astenia, un 34.9% fiebre, el 50.6% náuseas, el 43.4% vómitos, y un 31.3% diarrea con sangre.

De los 83 paneles FilmArray® Gastrointestinal resultaron positivos 24 (28.90%). La rentabilidad del FilmArray® GI en nuestro estudio fue inferior a la de otras series donde llega a alcanzar el 65% ⁽¹³⁾ 63,4% ⁽⁹⁾ o 54,8% ⁽¹²⁾ 44,2% ⁽³⁾.

Los gérmenes más frecuentemente aislados fueron: *C. jejuni*, *C. difficile*, y Norovirus. En otros estudios los microorganismos más frecuentes fueron: EPEC, rotavirus y norovirus ⁽⁷⁾; rotavirus 13.9% (22/168), *Campylobacter* 10.7% (18/168), *Clostridium difficile* 9.5% (16/168) y norovirus 8.9% ⁽¹²⁾; *Escherichia coli* enteropatógena, *Campylobacter*, *Clostridium difficile* toxigénico, *E. coli* enteroagregativa, norovirus y *E. coli* enterotoxigénica ⁽³⁾.

Nuestro estudio incluyó 83 pacientes, sin embargo el tamaño muestral adecuado calculado para el estudio tenía una N de 371 pacientes. Esto ha podido influir en la incapacidad para determinar asociaciones estadísticas, y es una limitación del estudio.

Únicamente tuvieron significación estadística el dolor abdominal y la presencia de diarrea con más de 6 deposiciones al día, que evidenciaron ser factor de riesgo para tener un resultado positivo en el coprocultivo, y la leucocitosis como factor de riesgo para obtener un resultado positivo en el FilmArray® GI. No obstante todos los resultados de nuestro estudio se ven limitados por la N inferior a la del cálculo de la muestra.

Sería necesario repetir o ampliar el estudio alcanzando la N obtenida en el cálculo de la muestra para poder establecer asociaciones estadísticas.

Las pruebas microbiológicas (resultado de coprocultivo y FilmArray® GI) sólo fueron concordantes entre sí en 7 ocasiones, lo que supone un 8.4% de las ocasiones.

El problema que se plantea ante un resultado positivo del FilmArray® GI y un resultado negativo del coprocultivo, es que éste último es el estándar de oro, pero presenta una baja sensibilidad.

La bibliografía publicada hasta el momento trata de mostrar la utilidad del FilmArray® GI frente a

las técnicas convencionales (coprocultivo, antígenos, GDH y toxina de *C.difficile*). A pesar de obtener siempre una mayor rentabilidad del FilmArray® GI frente a los métodos convencionales en los estudios realizados hasta ahora (en nuestro estudio fue de 28,90% para el FilmArray® GI y de 8,4% para el coprocultivo) existen dudas sobre la relevancia clínica de resultados positivos de la técnica con resultado negativo del coprocultivo. Además también se cuestiona la veracidad o repercusión clínica de los resultados múltiples del FilmArray® GI.

Por otra parte en nuestro estudio se refleja que en un 42,20% de las ocasiones (35 pacientes), el prescriptor no modificó el tratamiento antibiótico del paciente tras obtener los resultados microbiológicos. De esos 35 casos, en 3 no se añadió el antibiótico indicado para el resultado microbiológico obtenido y en 32 ocasiones no se suspendió el tratamiento antibiótico tras los resultados microbiológicos obtenidos. Consideramos importante este dato, ya que un potencial beneficio de las pruebas de detección rápida, como el panel FilmArray® GI, es la de obtener resultados en 1 hora, disminuyendo el uso de antibióticos, reduciendo la presión antibiótica hospitalaria y rebajando los días de estancia hospitalaria (^{14, 15,16}).

Creemos que esto puede deberse al desconocimiento de la técnica por parte de los facultativos que solicitaron la prueba o los facultativos prescriptores. Dichos datos podían mejorarse mediante la divulgación científica de la técnica y un asesoramiento por parte de la Unidad de Enfermedades Infecciosas junto al Servicio de Microbiología.

Un estudio muestra que la presencia de lactoferrina fecal se asocia a una mayor probabilidad de obtener un resultado positivo para la detección de patógenos bacterianos por PCR múltiple (¹⁷). Otro estudio transversal con 9403 pacientes puso de manifiesto que los patógenos gastrointestinales parecen mostrar patrones estacionales, siendo más frecuente la etiología bacteriana en verano y la vírica en invierno. (¹⁸). Este tipo de paneles múltiples resulta especialmente útil en pacientes graves, donde un tratamiento empírico adecuado tiene una mayor importancia. En un estudio observacional prospectivo desde marzo de 2015 a enero de 2016 con pacientes hematológicos (¹⁹), se trató de comparar los métodos de diagnóstico de rutina versus la utilización de una FilmArray GI Panel (BioFire-bioMérieux, Francia) para el diagnóstico de diarrea infecciosa. En los casos con resultados discordantes, se realizó una segunda PCR múltiple (Allplex, Seegene, Corea). La concordancia entre los métodos de PCR múltiple fue buena ($k = 0,79$). El panel GI FilmArray mostró una sensibilidad del 95%, y una especificidad del 100%.

Estas PCR múltiples también resultan especialmente útiles en el diagnóstico etiológico de la diarrea del viajero y en concreto en niños. Un estudio prospectivo realizado en niños con diarrea aguda que acuden al hospital en París y Bondy (²⁰) evidencia una alta prevalencia de diversos patógenos entéricos y coinfecciones en niños con diarrea del viajero. La PCR múltiple podría optimizar el

número de pacientes correctamente tratados en un 27% en comparación con los cultivos de heces, ya que muestra una alta prevalencia de patógenos entéricos y coinfecciones en niños.

CONCLUSIONES

Las técnicas microbiológicas de biología molecular como los paneles de detección múltiple, constituyen una herramienta rápida y sensible en el diagnóstico microbiológico de la patología gastrointestinal, comparada con las técnicas convencionales que resultan laboriosas y precisan de varios días para ofrecer resultados.

A pesar de su coste, pueden aportar reducción en el uso de antibióticos, disminución por tanto de la presión antimicrobiana, y un recorte en días de estancia en hospitalizados.

No obstante debido a que el coprocultivo que constituye el estándar de oro, tiene una sensibilidad reducida, son necesarios más estudios para evidencia la relevancia clínica de los resultados positivos de la PCR frente a negativos del coprocultivo y de las coinfecciones.



BIBLIOGRAFÍA

1. Who.int: World Health Organization [Internet]. United States of America: Who; 2 de mayo de 2017 [citado 16 jul 2018]. Diarrhoeal Disease. Disponible en: <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>.
2. Síndrome diarreico agudo: Recomendaciones para el diagnóstico microbiológico. Rev. chil. infectol. [Internet]. 2002 [citado 2018 Ago 30] ; 19(2): 101-113. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182002000200006&lng=es.
3. Spina A, Kerr KG, Cormican M, Barbut F, Eigenter A, Zerva L et al. Spectrum of enteropathogens detected by the FilmArray GI Panel in a multicentre study of community-acquired gastroenteritis. Clin Microbiol Infect. 2015 Aug;21(8):719-28.
4. Hennessy TW, Marcus R, Deneen V, Reddy S, Vugia D, Townes J, et al. 2004. Survey of physician diagnostic practices for patients with acute diarrhea: clinical and public health implications. Clin Infect Dis. 2004; Apr 15;38 Suppl 3:S203-11.
5. Buss SN, Leber A, Chapin K, Fey PD, Bankowski MJ, Jones MK, et al. Multicenter evaluation of the BioFire FilmArray gastrointestinal panel for etiologic diagnosis of infectious gastroenteritis. J Clin Microbiol. 2015 Mar;53(3):915-25.
6. Hitchcock MM, Gomez CA, Banae N. Low Yield of FilmArray Panel in Hospitalized Patients with Diarrhea: an Opportunity for Diagnostic Stewardship Intervention. J Clin Microbiol. 2018 Feb 22;56(3).
7. Beal SG, Tremblay EE, Toffel S, Velez L, Rand KH. A Gastrointestinal PCR Panel Improves Clinical Management and Lowers Health Care Costs. J Clin Microbiol. 2017 Dec 26;56(1).
8. Freeman K, Mistry H, Tsertsvadze A, Royle P, McCarthy N, Taylor-Phillips S et al. Multiplex tests to identify gastrointestinal bacteria, viruses and parasites in people with suspected infectious gastroenteritis: a systematic review and economic analysis. Health Technol Asses. 2017 Apr;21(23):1-188.
9. Connor BA, Rogova M, Whyte O. Use of a multiplex DNA extraction PCR in the identification of pathogens in travelers diarrhea. J Travel Med. 2018 Jan 1;25(1).
10. 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). NICE Diagnostics guidance [DG26] Published date: January 2017. Disponible en: <https://www.nice.org.uk/guidance/dg26/>

11. Nobel YR, Axelrad J, Lewis SK, Whittier S, Lawlor G, Lichtiger S et al. Stool PCR Gastrointestinal Pathogens in Patients With and Without Immune-Mediated Intestinal Diseases. *Dig Dis Sci.* 2018 Apr;63(4):996-1002.
12. Piralla A, Lunghi G, Ardissino G, Girello A, Premoli M, Bava E et al. FilmArray™ GI panel performance for the diagnosis of acute gastroenteritis or hemorrhagic diarrhea. *BMC Microbiol.* 2017 May 12;17(1):111.
13. Stockmann C, Rogatcheva M, Harrel B, Vaughn M, Crisp R, Poritz M, et al. How well does physician selection of microbiologic tests identify *Clostridium difficile* and other pathogens in pediatric diarrhea? Insights using multiplex PCR-based detection. *J Clin Microbiol Infect.* 2015 Feb;21(2):179.e9-15.
14. Rand KH, Tremblay EE, Hoidal M, Fisher LB, Grau KR, Karst SM. Multiplex gastrointestinal pathogen panels: implications for infection control. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2015 Jun;82(2):154-7.
15. Chhabra P, Gregoricus N, Weinberg GA, Halasa N, Chappell J, Hassan F et al. Comparison of three multiplex gastrointestinal platforms for the detection of gastroenteritis viruses. *J Clin Virol.* 2017 Oct;95:66-71.
16. Khare R, Espy MJ, Cebelinski E, Boxrud D, Sloan LM, Cunningham SA, et al. Comparative evaluation of two commercial multiplex panels for detection of gastrointestinal pathogens by use of clinical stool specimens. *J Clin Microbiol.* 2014 Oct;52(10):3667-73.
17. Hae ML, Seungok L, Bo-In L, Dong WJ, Joo-Yong S, Hye-Yung C et al. Clinical Significance of Fecal Lactoferrin and Multiplex Polymerase Chain Reaction in Patients with Acute Diarrhea. *Gut Liver.* 2015 Sep; 9(5): 636–640.
18. Axelrad JE, Joelson A, Nobel Y, Whittier S, Lawlor G, Riddle MS et al. The Distribution of Enteric Infections Utilizing Stool Microbial Polymerase Chain Reaction Testing in Clinical Practice. *Dig Dis Sci.* 2018 Jul;63(7):1900-1909.
19. Alejo-Cancho I, Fernández Avilés F, Capón A, Rodríguez C, Barrachina J, Salvador P et al. Evaluation of a multiplex panel for the diagnosis of acute infectious diarrhea in immunocompromised hematologic patients. *PLoS One.* 2017 Nov 3;12(11):e0187458.
20. Pouletty M, De Pontual L, Lopez M, Morin L, Poilane I, Pham LL et al. Multiplex PCR reveals a high prevalence of multiple pathogens in traveller's diarrhoea in children. *Arch Dis Child.* 2018 Jul 7. pii: archdischild-2017-314327.
21. Huang SH, Lin YF, Tsai MH, Yang S, Liao ML, Chao SW et al. Detection of common diarrhea-causing pathogens in Northern Taiwan by multiplex polymerase chain reaction. *Medicine (Baltimore).* 2018 Jun;97(23):e11006..

