



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL.

## ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

---

---

**Departamento de Microbiología  
Laboratorio de Bacteriología Médica**

**Estandarización de una PCR múltiple para la detección de  
*Yersinia enterocolitica* y *Aeromonas* spp., en muestras  
diarreicas.**

**Proyecto de investigación**

Que como uno de los requisitos para obtener el título de:

**Químico Bacteriólogo Parasitólogo**

Presenta:

Claudia Mendoza Montes

Directoras de Tesis:

Dra. en C. Cecilia Hernández Cortez

Dra. en C. Graciela Castro Escarpulli



Ciudad de México

2016

---

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Bioquímica Microbiana y en el Laboratorio de Bacteriología Médica del Departamento de Microbiología en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, bajo la Dirección de la Dra. en C. Cecilia Hernández Cortez y la Dra. en C. Graciela Castro Escarpulli.

Este trabajo formó parte de los proyectos de investigación:

- “Detección molecular y convencional de *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas* spp., y otros microorganismos de importancia médica y económica” con clave SIP 20161129, de la Dra. en C. Cecilia Hernández Cortez.
  - “Identificación de microorganismos causantes de enfermedades infecciosas” clave SIP 20160609, e “Identificación convencional o molecular de microorganismos causantes de enfermedades infecciosas” con clave SIP 20150750, de la Dra. en C. Graciela Castro Escarpulli.
-

---

## Agradecimientos

Llego el momento en el que decidí cambiar el nada por el todo el cual años atrás ya estaba en proceso de cambio pero por fin después de un largo camino se ha podido concretar este cambio, en este recorrido me he encontrado con muchísimas personas las cuales han depositado su granito de arena para hacer que este trayecto este lleno de experiencias que siempre agradeceré, quisiera dar las gracias a cada uno, pero creo que no me alcanzaría el papel, sin embargo de forma particular quiero agradecer:

A mis asesoras la Dra. Cecy y la Dra. Chela, por todo el apoyo, confianza, consejos, conocimientos y por facilitarme los medios necesarios para llevar a cabo este proyecto.

A mis primos Itzel, Israel y Jocelyn por aportar más que su granito de arena y apoyarme a continuar esta idea ya que sin su ayuda esto no se hubiera escrito.

A mis padres Gerardo, Socorro, mis hermanas Karen, Karina y mi Abue Lolita por toda su confianza y su apoyo incondicional que siempre me han brindado, por fin lo hemos logrado.

Al grupo de trabajo del laboratorio de bacteriología Alejandra, Maximiliano, Adrián, Brenda, Leonardo, Ingrid, Andrea, Selene por ser excelentes compañeros y amigos.

Al mejor de los amigos y muégano Uriel gracias por todo tu apoyo en todo este camino por brindarme tu amistad, tu confianza y por las miles de peleas pero sobre todo por las millones de risas que siempre nos han caracterizado.

Gracias

---

---

## Contenido

I.	Lista de abreviaturas	IV
II.	Índice de cuadros	V
III.	Índice de figuras	VI
IV.	Resumen	VII
V.	Abstract	VIII
1.	Introducción	1
1.1.	Enfermedades diarreicas	3
1.1.1	Diarrea aguda	3
1.1.2.	Diarrea crónica	6
1.1.2.1.	Clasificación y enfoque diagnóstico del paciente con diarrea crónica	6
1.1.3.	Diarrea en el anciano	11
1.1.4.	Diarrea en el paciente inmunocomprometido	11
1.1.4.1.	Diarrea asociada a pacientes oncológicos	12
1.1.4.2.	Diarrea asociada a los tratamientos oncológicos	13
1.2.	Agentes etiológicos	13
1.2.1.	<i>Yersinia enterocolitica</i>	15
1.2.1.1.	Mecanismo de patogenicidad y factores de virulencia	16
1.2.2.	<i>Aeromonas</i> spp.	19
1.2.2.1.	Mecanismo de patogenicidad y factores putativos de virulencia	21
1.3.	Identificación de los agentes etiológicos causantes de enfermedades gastrointestinales	22
1.3.1.	Coprocultivo	23
1.3.1.1.	Identificación del género <i>Yersinia</i> por el método convencional	25
1.3.1.2.	Identificación del género <i>Aeromonas</i> por el método convencional	26
1.3.2.	Métodos comerciales	27
1.3.2.1.	Sistemas comerciales manuales o galerías multipuebas	27
1.3.3.	Técnicas inmunológicas	28

---

---

1.3.4. Técnicas de biología molecular	29
1.3.4.1. Extracción de DNA	29
1.3.4.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	29
1.3.4.2.1. PCR múltiple	30
1.3.4.2.2. FilmArray	31
1.3.4.2.2.1. FilmArray Gastrointestinal (GI) Panel	31
1.3.4.3. Validación de técnicas moleculares	32
1.3.4.3.1. Sensibilidad	33
1.3.4.3.2. Especificidad	33
2. Antecedentes	34
3. Justificación	36
4. Hipótesis	37
5. Objetivos	38
5.1. Objetivo general	38
5.2. Objetivos particulares	38
6. Esquema general de trabajo	39
7. Materiales y Métodos	40
7.1. Muestras biológicas	40
7.1.1. Criterios de inclusión	40
7.1.2. Criterios de exclusión	40
7.2. Cepas tipo	40
7.3. Estandarización de la PCRm con cepas tipo	41
7.3.1. Recuperación de las cepas	41
7.3.2. Extracción de DNA de cepas tipo	41
7.3.3. Condiciones de reacción para la PCRm con cepas tipo	41
7.3.4. Demostración de los amplicones	42
7.3.5. PCRm en gradiente de temperatura	43
7.4. Estandarización de la PCRm con muestra de heces	43
7.4.1. Preparación e inoculación de las muestras	43
7.4.2. Extracción de DNA metagenómico	44
7.4.2.1. Fenol – Cloroformo	44

---

---

7.4.3. Cuantificación del DNA	45
7.4.4. Estandarización de la PCRm	45
7.4.5. Evaluación de la sensibilidad de la PCRm	46
7.5. PCRm aplicada a las muestras diarreicas	46
7.5.1. Recolección y manejo de las muestras	46
7.5.2. PCRm con DNA metagenómico de las muestras diarreicas	47
8. Resultados	48
8.1. PCRm con cepas tipo	48
8.1.1. PCRm de cepas tipo en gradiente de temperatura	48
8.2. Estandarización de la PCRm con muestras de heces inoculadas intencionalmente	49
8.3. Sensibilidad de la PCRm	50
8.4. PCRm aplicada a muestras diarreicas	51
8.4.1. PCRm con muestras diarreicas provenientes del InDRE	51
8.4.2. Aplicación de la PCRm con muestras diarreicas provenientes del Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional la Raza	52
8.5. Identificación con el sistema FilmArray	54
9. Discusión	55
10. Conclusiones	69
11. Prospectivas	70
12. Referencias	71
13. Anexo	83
13.1. Consentimiento informado	83

---

## Lista de abreviaturas

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
PCRm	Reacción en Cadena de la Polimerasa múltiple (multiplex Polymerase Chain Reaction)
InDRE	Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
SSA	Secretaria de Salud
EII	Enfermedad Infecciosa Intestinales
CONAPO	Consejo Nacional de Población
SINAVE	Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiologica
EDA	Enfermedad Diarrea Aguda
CIN	Agar Cefsulodina Irgasan Novobiocina
NuTraVE	Nucleo Trazador de Vigilancia Epidemiológica
ATCC	American Type Culture Collection
SDS	Dodecil sulfato sódico
5_FU	5 - Fluorouracilo
ETEC	<i>E. coli</i> enteroxigénica (Enterotoxigenic <i>E. coli</i> )
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatogénica (Enteropathogenic <i>E. coli</i> )
EAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa (Enteroggregative <i>E.coli</i> )
EHEC	<i>E. coli</i> enterohemorrágica (Enterohemorrhagic <i>E.coli</i> )
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasiva (Enteroinvasive <i>E.coli</i> )
MLN	Ganglios linfáticos mesentéricos (Mesenteric lymph nodes)
BSA	Albúmina serica bovina (Bovine serum albumin)
GI	Gastrointestinal
HECMNR	Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional la Raza

---

## Índice de cuadros

Cuadro		Página
1	Causas de diarrea crónica agrupadas con base en su mecanismo fisiopatológico	7
2	Causas de diarrea crónica en los adultos	9
3	Fármacos que potencialmente pueden causar diarrea crónica	10
4	Agentes infecciosos de diarrea aguda en el paciente oncológico	12
5	Agentes etiológicos de diversos síndromes diarreicos	14
6	Principales factores de patogenicidad de <i>Y. enterocolitica</i> , y su dependencia de la temperatura	18
7	Genes de virulencia de <i>Y. enterocolitica</i>	19
8	Principales factores putativos de virulencia del género <i>Aeromonas</i>	22
9	Características diferenciales del género <i>Aeromonas</i> y otros géneros relacionados	27
10	Bacterias, virus y parásitos detectados por el FilmArray GI Panel	32
11	Artículos publicados de PCR simple y PCRm para la detección de <i>Y. enterocolitica</i> y <i>Aeromonas</i> spp., en varios países	34
12	Artículos publicados utilizando una PCRm en México	35
13	Cepas tipo y/o de referencia	40
14	Genes seleccionados y secuencia de los iniciadores	41
15	Mezclas de reacción para la PCRm	42
16	Condiciones de reacción para las PCRm	42
17	Cantidad de bacterias excretadas por gramo de heces en un proceso diarreico	44



---

## Índice de figuras

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Modelo de la patogénesis de <i>Yersinia enterocolitica</i>	17
2	Método convencional: coprocultivo	24
3	Algoritmo en la identificación de <i>Yersinia enterocolitica</i>	26
4	Diagrama de flujo	30
5	Representación gráfica de la distribución de la PCRm	43
6	Electroferograma de la amplificación de los genes <i>ail</i> , <i>gcat</i> y <i>yst</i> por PCRm de <i>Yersinia enterocolitica</i> ATCC 23715 <sup>T</sup> y <i>Aeromonas</i> spp., ATCC 7966 <sup>T</sup>	48
7	Electroferograma de los amplicones <i>ail</i> , <i>gcat</i> y <i>yst</i> por PCRm en gradiente de temperatura a partir de cepas tipo	49
8	Electroferograma de la PCRm con DNA obtenido por el método fenol – clororformo, en muestra inoculada con cepas tipo	50
9	Electroferograma de la PCRm con el DNA obtenido por el método fenol – clororformo, en muestra inoculada con cepas tipo y sangre	50
10	Electroferograma de la sensibilidad analítica de la PCRm estandarizada	51
11	Diagnóstico hematológico y / o trasplante de los 31 pacientes del HECMNR	52
12	Casos de diarrea con base en el grupo de edad de las 31 muestras de pacientes del area de hematología y trasplantes del HECMNR	53
13	Electroferograma de la PCRm con DNA metagenómico de muestras clinicas	53
14	Microorganismos detectados por el sistema FilmArray	54

---

## Resumen

*Yersinia enterocolitica* y *Aeromonas* spp., son dos microorganismos que causan un síndrome diarreico, sin embargo, en México su búsqueda no se lleva a cabo de manera rutinaria. Estos dos géneros afectan a personas de todas las edades principalmente a los niños menores de 5 años por lo que determinar su incidencia es importante. Para la identificación de estos microorganismos se utilizan esencialmente los métodos convencionales no obstante, se han implementado los métodos de biología molecular que son herramientas diagnósticas confiables, rápidas, sensibles y específicas.

El objetivo del presente trabajo fue estandarizar y evaluar un método de biología molecular como lo es la PCR múltiple (PCRm) para la detección simultánea de *Y. enterocolitica* y *Aeromonas* spp. Se inoculó intencionalmente una muestra de heces con cepas tipo de *Y. enterocolitica* ATCC 23715<sup>T</sup> y *A. hydrophila* ATCC 7966<sup>T</sup>. Posteriormente, se extrajo el DNA metagenómico por la técnica fenol-cloroformo para llevar a cabo la PCRm y demostrar la presencia de los genes *ail* de 439 pb y el *yst* de 130 pb para *Y. enterocolitica*, y el gen *gcat* de 237 pb para *Aeromonas* spp.

La PCRm implementada se aplicó en un total de 81 muestras de heces diarreicas provenientes de pacientes de 2 lugares diferentes, se les extrajo el DNA metagenómico por la técnica fenol-cloroformo. En las muestras proporcionadas por el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) (n=50), no se detectó la presencia de *Aeromonas* spp., ni de *Y. enterocolitica*. De las muestras del Hospital de Especialidades CMN la Raza del área de Hematología (n=31), Se detectó la presencia de *Aeromonas* spp., en el 3.22 % (n=1) y en ninguna de las muestras se detectó a *Y. enterocolitica*. Adicional a lo anterior se confirmó la presencia de *Aeromonas* spp., mediante la detección de los genes *lafA* de 734 pb y *aer/hem* de 431 pb, ambos, factores putativos de virulencia del género *Aeromonas*. Simultáneamente en las muestras del HECMNR se utilizó el sistema FilmArray que cuenta con un panel gastrointestinal e identifica 22 patógenos y dentro de éstos se encuentra *Y. enterocolitica*, confirmando con éste sistema la ausencia de *Y. enterocolitica*.

---

## Abstract

*Yersinia enterocolitica* and *Aeromonas* spp., Are two microorganisms that cause a diarrheal syndrome, however, in Mexico their search is not carried out routinely. These two genera affect people of all ages, mainly children under 5 years of age, so determining their incidence is important. For the identification of these microorganisms the conventional methods are essentially used, however, molecular biology methods have been implemented which are reliable, fast, sensitive and specific diagnostic tools.

The objective of the present work was to standardize and evaluate a method of molecular biology such as multiple PCR (PCRm) for the detection of *Y. enterocolitica* and *Aeromonas* spp. A stool sample was intentionally inoculated with *Y. enterocolitica* strains ATCC 23715<sup>T</sup> and *A. hydrophila* ATCC 7966<sup>T</sup>. Subsequently, the metagenomic DNA was extracted by the phenol-chloroform technique to carry out PCRm. PCRm showed the three amplicons corresponding to the *ail* genes of 439 bp and the 130 bp *yst* for *Y. enterocolitica*, and the *gcat* gene of 237 bp for *Aeromonas* spp.

Implemented PCRm was applied in a total of 81 samples of diarrheic feces from 2 different places, the metagenomic DNA was extracted by the phenol-chloroform technique. In the samples provided by the Institute of Epidemiological Diagnosis and Reference (InDRE) (n = 50), the presence of *Aeromonas* spp., Or of *Y. enterocolitica* was not detected. From the specimens of the Hospital of Specialties CMN the Race of the area of Hematology (n = 31), the presence of *Aeromonas* spp., was detected in 3.22% (n = 1) and in none of the samples was detected to *Y. enterocolitica*. In addition, the presence of *Aeromonas* spp., was confirmed by detection of the *lafA* genes of 734 bp and *aer / hem* of 431 bp, both of which were putative virulence factors of the *Aeromonas* genus. Simultaneously, the FilmArray system was used, which has a gastrointestinal panel and identifies 22 pathogens, and within them *Y. enterocolitica* is found, confirming the absence of *Y. enterocolitica* with this system.

---

## 1. Introducción

En México, las infecciones intestinales representaron la segunda causa de morbilidad con 5 283 896 casos en 2011, lo que ubicó a estas infecciones como un serio problema de salud pública. La población más vulnerable a estos padecimientos han sido los menores de cinco años. El Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) y la Secretaría de Salud (SSA) reportaron en forma conjunta más del 74.4 % de los casos. Los estados que destacaron con los niveles más altos de morbilidad fueron Nayarit, Aguascalientes y Durango, en tanto que Baja California, Puebla y Veracruz mostraron los niveles más bajos (URL, 1).

Las enfermedades diarreicas son una de las causas importantes de mortalidad y morbilidad infantil en países en vías de desarrollo. En el año 2000, la 4ª causa de mortalidad nacional en niños menores de un año lo constituyeron las Enfermedades Infecciosas Intestinales (EII), que en el 2005 permanecieron en el mismo sitio con una tasa de 61.3 defunciones por cada 100 000 nacimientos estimados por el Consejo Nacional de Población (CONAPO) (URL, 2).

Por otro lado, también en el año 2000, las EII en el grupo de edad preescolar (1 a 4 años), tomaron el primer lugar de mortalidad nacional con una tasa de 7.96 por cada 100 000 habitantes. Se estima que en el año 2003 murieron 1.87 millones de niños menores de cinco años por esta causa, ocho de cada diez de estas muertes se dieron en los primeros dos años de vida. En promedio, los niños menores de tres años de edad en países en desarrollo experimentan de uno a tres episodios de diarrea al año (URL, 2).

Para el año 2005, las EII persistieron en el primer lugar, con una tasa de 7.9 por cada 100 000 habitantes, al analizar las consultas por enfermedad diarreica en menores de cinco años a nivel nacional, se observó que en el año 2000 se atendieron 911 493 niños con diarrea de los 5 473 660 menores de cinco años atendidos en consulta externa, lo que equivale a un 16.6 % y para el año 2006, el porcentaje de estas consultas disminuyó en 3 % (URL, 2).

---

Tan solo en el 2008 el Seguro Social brindó 2 188 000 consultas por enfermedades gastrointestinales, y los estados con mayor incidencia de estas fueron: Chihuahua, Coahuila, Jalisco, Michoacán, Guerrero y Oaxaca. Con base en estadísticas del IMSS, las infecciones, como gastroenteritis, salmonelosis, tifoidea, cólera y rotavirus representan un severo problema de salud pública en México (Hernández-Cortez *et al.*, 2011).

Para el año 2012, la Enfermedad Diarreica Aguda (EDA) se situó como la segunda causa de morbilidad y la número diecinueve en mortalidad general, la población menor de cinco años fue la más afectada, principalmente en comunidades con el menor índice de desarrollo humano. Posteriormente en el año 2013, la incidencia de las infecciones intestinales por otros organismos y las mal definidas muestra una incidencia total global de 5 329 815 casos y hasta la semana 40 del año en curso 2016 se encuentra un acumulado de enfermedades infecciosas intestinales de 4 003 177 casos, donde los más vulnerables a este padecimiento han sido los niños menores de cinco años (DGE/Salud, 2012; URL, 3; URL, 4).

Por lo anterior, México debe fortalecer los sistemas de vigilancia activa de EDA para determinar con mayor exactitud la morbilidad y mortalidad debida a los patógenos circulantes en el país. Derivado de las situaciones de globalización como viajes y comercio, crecimiento demográfico, pobreza, acontecimientos climáticos y sociales adversos, se pone de manifiesto la necesidad de prevenir y controlar las EDA (URL, 4).

Así mismo en el país las acciones de vigilancia para éstas infecciones se apoyan en el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), el cual cuenta con el subsistema de laboratorio para llevar a cabo las actividades de vigilancia de manera oportuna y uniforme para el diagnóstico de cólera, salmonelosis, shigelosis, otras enfermedades bacterianas transmitidas por alimentos, amibiasis intestinal, giardiasis, otras infecciones intestinales debidas a protozoarios, e infecciones intestinales por otros organismos y las mal definidas. La EDA está considerada dentro del SINAVE, y se presenta una amplia gama de manifestaciones clínicas que impiden caracterizar aquellos agentes etiológicos que causan mayor daño a la salud de la población.

---

---

Por tal motivo se estableció como estrategia complementaria dentro de la vigilancia epidemiológica de EDA el Núcleo Trazador de Vigilancia Epidemiológica (NuTraVE-EDA) (Moreno-Pérez *et al.*, 2014; URL, 4; DGE/Salud, 2012).

### **1.1. Enfermedades diarreicas**

La diarrea es una enfermedad caracterizada por la evacuación frecuente de deposiciones blandas o líquidas, lo cual implica pérdida de sales (electrolitos) y agua, importantes para mantener el estado de hidratación del individuo. También pueden contener sangre y moco, en cuyo caso se conoce como disentería (URL, 2).

Los microorganismos comúnmente asociados a las diarreas son: Rotavirus, *Shigella* spp., *Salmonella* spp., y otros que no son buscados rutinariamente como *Aeromonas* spp., *Campylobacter* spp., *Yersinia enterocolitica*. Estos agentes generalmente se diseminan por vía fecal-oral (ano-mano-boca), producto de la ingestión de agua o alimentos contaminados con microorganismos infecciosos provenientes de la materia fecal, o el contacto directo con residuos fecales. El número de evacuaciones intestinales varía según la dieta y la edad de la persona. La diarrea aguda comienza súbitamente y tarda menos de dos semanas. La diarrea persistente comienza como diarrea aguda, pero dura 14 días o más. Se estima que del total de muertes que ocurren por diarrea en todo el mundo, más del 90 % se presentan en niños menores de cinco años (URL, 2).

La diarrea es una consecuencia de la disfunción en el transporte de agua y electrólitos a nivel del intestino. Todo esto condiciona un riesgo, causando deshidratación y trastornos del equilibrio hidromineral (Riverón-Corteguera, 1999).

Las diarreas se pueden clasificar en: función del tiempo denominado como de corta duración o diarrea aguda y de evolución prolongada o diarrea crónica.

#### **1.1.1. Diarrea aguda**

La diarrea aguda se define como la expulsión de heces de menor consistencia e incluso líquidas, que generalmente se acompaña de un aumento en el número de deposiciones y de la disminución de su consistencia, el paciente experimenta

---

---

malestar general, náuseas, a veces vómitos y dolor abdominal. Con duración de menos de dos semanas. Aunque la causa que la produce pueden ser muy variada, la gran mayoría tiene su origen en un proceso infeccioso por bacterias, virus o parásitos (Monés, 2009).

Cuando la diarrea es severa puede ir acompañada de sangre, lo que indica un grado elevado de inflamación de la pared intestinal, sin que ello tenga connotaciones de especial gravedad para la gran mayoría de los casos (Monés, 2009).

La diarrea aguda es generalmente autolimitada resolviéndose sin secuelas, algunos de los patógenos pueden provocar una respuesta inflamatoria en el intestino donde el epitelio de revestimiento está dañado, ya sea por una toxina producida por el microorganismo que invade la mucosa, dentro de estos agentes patógenos se encuentran: *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* 0157:H7, aunque también hay otros organismos que causan diarrea aguda pero no producen una respuesta inflamatoria como *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae* y *E. coli* enterotoxigénica (Hernández-Cortez *et al.*, 2011).

Dentro de este tipo de diarrea está la diarrea secretora la cual se produce cuando hay un aumento en la cantidad de flujo en el lumen del intestino causado por las toxinas secretadas por algunos patógenos como *V. cholerae*, *E. coli*, *C. jejuni*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., y *Clostridium difficile*, siendo la forma más común de gastroenteritis, caracterizándose por evacuaciones intestinales frecuentes o menos líquidas (Hernández-Cortez *et al.*, 2011; URL, 5).

La diarrea aguda puede presentarse en tres formas:

- a) **Diarrea aguda leve:** de dos a cuatro deposiciones al día sin dolor abdominal, sin fiebre, sin sangre ni signos de deshidratación lo cual no impide la actividad cotidiana.
- b) **Diarrea aguda moderada:** de cuatro a seis deposiciones al día, malestar abdominal, fiebre (menos de 38 °C); deshidratación e impide o dificulta las actividades de la vida diaria.

- 
- c) **Diarrea aguda grave:** más de seis deposiciones al día, con o sin sangre, dolor abdominal, retortijones, fiebre de más de 38 °C y deshidratación que impide las actividades de la vida diaria y con frecuencia es necesaria la permanencia en cama (Monés, 2009).

Algunas veces los causantes de diarrea aguda son fármacos como antibióticos, tiroxina (medicamento hormonal substitutiva en pacientes con hipotiroidismo) y laxantes (Monés, 2009).

La diarrea aguda en la gran mayoría son de origen infeccioso, ocasionadas por agentes tales como: virus (Enterovirus, Norovirus, Rotavirus), bacterias que producen toxinas (*E. coli*, *S. aureus*, etcétera), bacterias que invaden la mucosa intestinal (*E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*) o parásitos (*Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica*, etcétera) (Monés, 2009).

La diarrea aguda bacteriana es más probable que se presente durante el verano, ya que las temperaturas altas favorecen el desarrollo de los microorganismos que pueden estar presentes en los alimentos, de tal manera que siempre, pero especialmente en ésta época del año, se aconseja no consumir comidas en puestos ambulantes, ya que allí se dan las condiciones óptimas para la infección y el desarrollo de los microorganismos que provocan la mayoría de las gastroenteritis y a diferencia de la temporada en invierno es más frecuente las diarreas producidas por virus (Monés, 2009).

Mientras la diarrea aguda puede entenderse como una respuesta protectora frente a una variedad de agresiones intestinales (agentes infecciosos, toxinas), la diarrea crónica es siempre inadecuada y perjudicial. En general, la diarrea implica la existencia de una alteración en el transporte de agua en el intestino. Normalmente, el intestino delgado y el colon absorben el 99 % del líquido procedente no solo de la ingesta, sino de las secreciones endógenas salivares, gástricas, hepatobiliares y pancreáticas. Todo ello supone unos 10 litros de fluido al día. La reducción de la absorción de agua en tan solo un 1 % de éste volumen total, puede ser causa de diarrea (Monés, 2009).

---



---

### **1.1.2. Diarrea crónica**

La diarrea crónica es el aumento en el número de deposiciones unido generalmente a una disminución en la consistencia de las heces, y cuya duración es de más de tres o cuatro semanas. Son muy diversas las causas que pueden provocar diarrea crónica, algunas son de tipo funcional (fundamentalmente el síndrome del intestino irritable), pero en otras ocasiones pueden ser secundarias a alteraciones orgánicas (Monés, 2009).

El transporte de agua intestinal está regulado por mecanismos muy precisos. Éstos comprenden un sistema complejo de comunicación de mensajeros extra e intracelulares que contribuyen a mantener el equilibrio hídrico en un amplio abanico de condiciones fisiológicas. Normalmente, en el intestino se produce tanto absorción como secreción de agua, sin embargo la primera es cuantitativamente superior. La diarrea puede surgir tanto por una disminución de la absorción, como por un aumento de la secreción. Este tipo de diarrea debida a la alteración del transporte epitelial de electrolitos y agua se conoce como diarrea secretora, aunque normalmente es debida a una disminución de la absorción y no a un aumento neto de la secreción (Fernández-Banares & Esteve-Comas, 2012).

#### **1.1.2.1. Clasificación y enfoque diagnóstico del paciente con diarrea crónica**

La lista de causas que pueden ocasionar diarrea crónica es extensa, en la mayoría de los tratados clásicos de gastroenterología, el enfoque diagnóstico se realiza con base en la clasificación fisiopatológica de la diarrea crónica (inflamatoria, secretora, osmótica y por alteración de la motilidad) (Cuadro 1) (Fernández-Banares & Esteve-Comas, 2012).

**Cuadro 1. Causas de diarrea crónica agrupadas con base en su mecanismo fisiopatológico**

<b>Mecanismo</b>	<b>Características clínicas</b>	<b>Causas</b>
<p><b>Osmótica</b></p> <p>Acúmulo de solutos no absorbibles en la luz intestinal.</p>	<p>Ceden con el ayuno Brecha osmótica fecal &gt;125 mOsm/Kg</p> <p>Tipos: <b>Con esteatorrea:</b> heces voluminosas, grasosas y malolientes; pérdida de peso.</p> <p><b>Sin esteatorrea</b> (mala absorción selectiva de carbohidratos): dolor abdominal, hinchazón, y flatulencia.</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Insuficiencia pancreática exocrina: pancreatitis crónica (adultos); fibrosis quística (niños).</li> <li>2. Déficit de sales biliares: obstrucción biliar, sobre crecimiento bacteriano.</li> <li>3. Patología mucosa: enfermedad celíaca, infecciones, fármacos, síndrome del intestino corto.</li> <li>4. Obstrucción linfática postmucosa.</li> </ol> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Ingestión de Mg o sulfatos (laxantes o polivitamínicos) o de carbohidratos no absorbibles (sorbitol, fructosa, lactulosa).</li> <li>2. Maldigestión de disacáridos: intolerancia a la lactosa.</li> </ol>
<p><b>Secretora</b></p> <p>Secreción excesiva de electrolitos y agua.</p>	<p>Diarrea acuosa. No cede con el ayuno. Brecha osmótica fecal &lt; 50 mOms/kg. Deshidratación más frecuente.</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Sustancias exógenas: cafeína, etanol, medicamentos, etc.</li> <li>2. Infecciones</li> <li>3. Patología gastrointestinal estructural: malabsorción de sales biliares, colitis microscópica y colitis colágena.</li> <li>4. Tumores productores de hormonas peptídicas.</li> </ol>
<p><b>Inflamatoria</b></p> <p>Inflamación de la mucosa con pérdida de sustancias. En ocasiones se suman alteraciones en la secreción, absorción y digestión.</p>	<p>Fiebre Dolor abdominal Sangre y/o leucocitos en heces.</p>	<p>Enfermedades estructurales de la mucosa: cáncer de colon, enfermedad inflamatoria intestinal, enterocolitis por radiación, gastroenteritis eosinofílica, enteropatías pierde-proteínas, infecciones asociadas al HIV.</p>
<p><b>Desmotilidad intestinal</b></p> <p>Tránsito rápido a veces sobre crecimiento bacteriano asociado.</p>	<p>Alternancia diarrea / estreñimiento.</p>	<p>Síndrome del intestino irritable, obstrucción intestinal parcial, neuropatías, divertículos colon, tirotoxicosis.</p>

mOsm/Kg: Miliosmoles por kilogramo de agua.

HIV: Virus de Inmunodeficiencia Humana (Human Immunodeficiency Virus)

Tomado y modificado de: Ruiz de Adana – Pérez, 2001.

Aunque la clasificación de la diarrea es interesante desde el punto de vista fisiopatológico, esta diferenciación posee escasa aplicación clínica ya que una misma entidad es capaz de producir diarrea por múltiples mecanismos fisiopatológicos que

---

conlleven un aumento de secreción hidroelectrolítica y de la motilidad intestinal, incluyendo los efectos de sustancias liberadas por las células neuroendocrinas (paracrinas), citoquinas liberadas por células inmunológicas activadas localmente o a distancia, péptidos y hormonas liberados de forma periférica y la propia actividad del sistema nervioso entérico. Estos moduladores pueden actuar además sobre más de un efector (función epitelial, contracción muscular, vías paracelulares, etc.) ocasionando alteraciones simultáneas en el transporte de iones, la motilidad o la permeabilidad de la mucosa (Fernández-Banares & Esteve-Comas, 2012).

Sin embargo, la mayoría de las causas de diarrea crónica producen alteraciones fisiopatológicas a diversos niveles, haciendo que esta clasificación sea irreal, y de hecho poco utilizada en la práctica clínica habitual. Desde un punto de vista práctico, tiene mucho más interés el enfoque diagnóstico basado en la presencia de una serie de características que permiten distinguir entre pacientes con una diarrea de probable origen funcional o de probable origen orgánico (Fernández-Banares & Esteve-Comas, 2012).

La ausencia de síntomas o signos de alarma, de antecedentes familiares de interés (Enfermedad inflamatoria intestinal, celiaquía o cáncer de colon), la normalidad del examen físico y la ausencia de alteraciones en las determinaciones analíticas y microbiológicas mencionadas, sugieren la existencia de una diarrea de posible origen funcional y en el caso de una diarrea crónica con características de organicidad es cuando la historia, el examen físico o las determinaciones elementales de laboratorio sugieren una causa orgánica y se deben solicitarse pruebas complementarias dirigidas a establecer con seguridad la causa de la diarrea, mencionando que ésta puede tener su origen en el intestino delgado o en el colon (Fernández-Banares & Esteve-Comas, 2012).

En adultos se pueden presentar distintas causas que provoquen la diarrea crónica como se muestra en el cuadro 2.

---

## Cuadro 2. Causas de diarrea crónica en los adultos

<p><b>Causas frecuentes que</b> suelen diagnosticarse con la evaluación inicial.</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Síndrome del intestino irritable (SII)<sup>1</sup></li><li>• Enfermedad inflamatoria intestinal<sup>1</sup>: colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, colitis colágena y linfocítica (microscópica).</li><li>• Infecciones crónicas o recurrentes: <i>Giardia</i><sup>1</sup>, <i>Clostridium difficile</i>.</li><li>• Esteatorrea<sup>3</sup>: insuficiencia pancreática exocrina, déficit de sales biliares, enfermedades de la mucosa.</li><li>• Malabsorción de carbohidratos<sup>3</sup>: déficit de disacaridasas (lactosa<sup>1</sup>, fructosa), ingesta de sustancias pobremente absorbibles (sorbitol, fructosa, lactulosa, fibra).</li><li>• Medicamentos y aditivos alimentarios<sup>3</sup>: antibióticos, antihipertensivos, antiarrítmicos, antineoplásicos, antiácidos con magnesio, edulcorantes, etanol<sup>2</sup>, cafeína<sup>2</sup>.</li><li>• Enfermedad diverticular de colon.</li><li>• Cirugía previa<sup>3</sup>: gastrectomía, vagotomía, colecistectomía, resección intestinal.</li><li>• Endocrinopatías: Addison, hiper o hipotiroidismo, diabetes mellitus, feocromocitoma.</li><li>• Abuso de laxantes<sup>2,3</sup>.</li><li>• Isquemia intestinal.</li><li>• Enterocolitis por radiación.</li><li>• Cáncer de colon.</li></ul>
<p><b>Causas menos frecuentes,</b> en las que la evaluación previa no determinó el diagnóstico.</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Tumores productores de hormonas: VIPoma, gastrinoma, carcinoides digestivos con metástasis hepáticas, carcinoma medular de tiroides, adenoma vellosa, feocromocitoma.</li><li>• Trastornos infiltrativos: escleroderma, amiloidosis, linfomas intestinales difusos<sup>2</sup>.</li><li>• Diarrea crónica epidémica.</li><li>• Diarrea crónica idiopática autolimitada.</li><li>• Incontinencia fecal<sup>2</sup>.</li><li>• Alergia a alimentos<sup>3</sup>.</li></ul>
<p><b>Diarrea en varones homosexuales sin SIDA</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Parásitos: <i>Giardia</i>, <i>Ameba</i>, <i>Blastocystis</i> spp.</li><li>• Bacterias: <i>Campylobacter</i>, gonorrea rectal.</li></ul>

<sup>1</sup> Causa más frecuente de diarrea crónica.

<sup>2</sup> Causa que con más frecuencia se pasan por alto en la evaluación.

<sup>3</sup> Responden con el ayuno o al dejar de ingerir el agente externo causal.

VIPoma: Tumor neuroendocrino de baja incidencia localizado la mayoría de los casos en el páncreas provocando la hipersecreción de péptido intestinal vasoactivo (VIP)

Tomado y modificado de: Ruiz de Adana – Pérez, 2001; Muñoz-Guijosa *et al.*, 2003.

También se puede considerar una diarrea inducida por fármacos, ya que múltiples medicaciones pueden ocasionar diarrea, siendo ésta el efecto secundario descrito regularmente (cuadro 3). Las clases de medicamentos que con mayor frecuencia pueden originar diarrea son: antiácidos, antiarrítmicos, antibióticos, antidiabéticos orales, antineoplásicos, antihipertensivos, colchicina, colinérgicos, lactulosa, suplementos de magnesio y prostaglandinas. No obstante, la diarrea suele aparecer pronto tras el inicio del fármaco o tras un aumento de la dosis (Fernández-Banares & Esteve-Comas, 2012).

**Cuadro 3. Fármacos que potencialmente pueden causar diarrea crónica**

<b>Antibióticos y antivirales</b>	<b>Antiestrógenos</b> - Tamoxifeno	<b>Inhibidores acetilcolinesterasa</b> - Donezepilo - Galantamina - Tacrina
<b>Antineoplásicos</b> - 5-fluoracilo - Irinotecan - Alemtuzumab - Capecitabina - Cis-platinum - Doxorubicina - Imatinib	<b>Antihipertensivos</b> - I-ECA - ARA-II - b-bloqueantes - Hidralacina - Reserpina	<b>Inhibidores de la fosfodiesterasa</b> - Sildenafil
<b>Agentes antiinflamatorios y antiarrítmicos</b> - AINE - Sales de oro - 5-aminosalicilatos - Colchicina - Leflunomida - D-penicilamina	<b>Antiácidos y antisecretores</b> - Contienen magnesio - Anti-H2 - IBP	<b>Inmunosupresores</b> - Ciclosporina A - Micofenolato mofetilo - Sirolimus - Tacrolimus
<b>Antiadrenérgicos en acción periférica</b> - Fentolamina - Fenoxibenzamina - Metirosina - Tolazolina	<b>Antiparkinsonianos y otros fármacos neurológicos</b> - Entacapone - Acetato de glatiramer - Rilucóle - Tolcapone	<b>Prostaglandinas y análogos</b> - Misoprostol
<b>Antiarrítmicos</b> - Quinidina - Digital Bifosfonatos - Alendronato - Etidronato	<b>Antiplaquetarios</b> - Dipiridamol - Ticlodipina - Clopidogrel	<b>Laxantes osmóticos</b> - Lactulosa - Lactitol - Sorbitol - Polietilenglicol - Fosfato de magnesio - Fosfato sódico
<b>Antiasmáticos</b> - Aminofilina - Esteroides inhalados	<b>Antirretrovirales</b>	<b>Laxantes estimulantes</b> - Fenolfataleína - Bisacodilo - Aceite de ricino - Antraquinonas (áloe, cáscara, sen)
<b>Antidepresivos</b> - ISRS	<b>Bifosfonatos</b> - Alendronato - Etidronato	<b>Quelantes del fósforo</b> - Sevelamero
<b>Antidiabéticos</b> - Acarbosa - Metformina - Repaglinida - Rosigilitazona - Sulfonilureas - Meglitinidas	<b>Agentes biológicos</b> - Interferón - Eritropoietina - Vacunas	<b>Progestágenos</b> - Megestrol
<b>Extractos tiroideos</b>	<b>Diuréticos</b> - Amiloride	<b>Broncodilatadores</b> - Teofilina
<b>Antiepilépticos</b> - Lamotrigina - Tiagabina - Ácido valproico	<b>Hipolipemiantes</b> - Colestiramina - Gemfibrozilo - Estatinas (Inhibidores de la HMG-CoA reductasa)	<b>Pilocarpina</b>
	<b>Tretinoína oral (ATRA)</b>	<b>Talidomida</b>
<b>Metales pesados</b>	<b>Vitaminas y suplementos minerales</b>	<b>Productos de herboristería</b>

AINE: Antiinflamatorios no esteroideos

I-ECA: Inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensina

ARA-II: Antagonistas de los Receptores de Angiotensina II

IBP: Inhibidores de la bomba de protones

ISRS: Inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina

Tomado y modificado de: Fernández-Banares & Esteve-Comas, 2012.

---

### **1.1.3. Diarrea en el anciano**

La diarrea en el anciano es una causa importante de morbilidad y mortalidad. El diagnóstico precoz y el tratamiento son necesarios para prevenir la deshidratación, la pérdida de electrolitos y la alteración del estado nutricional (Fernández-Banares & Esteve-Comas, 2012).

Con el envejecimiento, el aparato digestivo sufre una serie de cambios que pueden predisponer a padecer una eventual diarrea o síndrome malabsorción, presentándose como impactación fecal, una diarrea inducida por fármacos ya que usualmente el anciano está polimedicado (Fernández-Banares & Esteve-Comas, 2012).

### **1.1.4. Diarrea en el paciente inmunocomprometido**

La diarrea crónica es la principal manifestación del compromiso del tracto gastrointestinal del huésped inmunocomprometido, por enteropatógenos o agentes oportunistas. No es inusual que sea severa, persistente o refractaria al tratamiento, y que ocasione deshidratación, malabsorción y malnutrición (URL, 6).

Las personas con déficit inmunológico congénito o adquirido, son susceptibles de infectarse severamente, incluso con microorganismos oportunistas que difícilmente atacan a los inmunocompetentes (URL, 6).

Las principales causas que alteran el sistema inmunológico son las siguientes:

- A. Quimioterapia con drogas citotóxicas
- B. Terapia inmunosupresora: trasplante de tejidos, colangenopatías, etc.
- C. Corticoterapia prolongada
- D. Inmunodeficiencias primarias: deficiente producción de inmunoglobulinas, disfunción fagocítica, déficit de la inmunidad celular
- E. Virus de la Inmunodeficiencia Humana
- F. Malnutrición
- G. Miscelánea: uremia, enfermedad hepática crónica, diabetes mellitus, etc.

---

#### 1.1.4.1. Diarrea asociada a pacientes oncológicos

En el paciente oncológico las diarreas pueden ser causadas por los agentes habituales tanto por el propio cáncer como de su tratamiento. Así, en el caso de las diarreas agudas, la mayoría de las causas son infecciosas (cuadro 4) y su vía más común de adquisición es oral – fecal, o cuando ingresa el agente causal el cual afecta los mecanismos de defensa del huésped, incluidos pH ácido gástrico, movilidad intestinal, defensas locales y sistémicas inmunes, como el tejido linfoide intestinal y la producción de inmunoglobulinas y defensinas. Entre los agentes causales más frecuentes se encuentra *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *E. coli*, *C. difficile*, *Entamoeba histolytica* y *Yersinia* (González et al., 2007).

**Cuadro 4. Agentes infecciosos de diarrea aguda en el paciente oncológico**

Virus	Bacterias	Protozoos
Rotavirus	<i>Shigella</i> spp.	<i>Giardia lamblia</i>
Norwalk	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Entamoeba histolytica</i>
Adenovirus entérico	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica	<i>Criptosporidium</i>
Calcivirus	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica	<i>Cyclospora</i>
Astrovirus	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva	
Coronavirus		
Herpes simple	<i>Yersinia</i> spp.	
Citomegalovirus	<i>Clostridium difficile</i>	
	<i>Clostridium perfringens</i>	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	
	<i>Bacillus cereus</i>	
	<i>Vibrio</i> spp.	
	<i>Aeromonas</i> spp.	
	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	

Tomado y modificado de: González et al., 2007.

La inmunodepresión contribuye por otra parte a que las infecciones sean más graves y susceptibles de complicaciones. También en el enfermo oncológico es particularmente frecuente la diarrea asociada al uso de antibióticos, sobre todo cuando se han empleado cefalosporinas o clindamicina, debido a las toxinas de *C. difficile*. Esta diarrea puede oscilar desde una forma leve hasta cuadros graves

---

ocasionalmente fatales, asociados a una colitis pseudomembranosa. Finalmente, puede señalarse el papel de las reacciones a partir del injerto en el huésped ejerciendo las diarreas de los pacientes trasplantados (González *et al.*, 2007).

#### **1.1.4.2. Diarrea asociada a los tratamientos oncológicos**

La diarrea es un efecto adverso bien conocido de algunos agentes, como el 5-fluorouracilo (5-FU) o el irinotecan o de la radioterapia abdominopélvica. La combinación de estos tratamientos aumenta notablemente la incidencia y gravedad de las diarreas asociadas. La pérdida de electrolitos y agua inducida por éstos agentes puede resultar en insuficiencia renal y descompensación cardiovascular. Además, la mucositis que induce altera la barrera epitelial, con lo que se desarrolla un riesgo de diarrea enteroinvasiva que se acrecienta con las citopenias y la inmunodepresión asociadas (González *et al.*, 2007).

### **1.2. Agentes etiológicos**

Los agentes etiológicos que causan los diversos síndromes diarreicos, así como algunas características de éstos para provocar daño se presentan en el cuadro 5.

Los agentes patógenos bacterianos causantes de enfermedades diarreicas son *E. coli*, *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Yersinia* spp., y *V. cholerae*. En la mayoría de los estudios epidemiológicos en niños, éstos son los agentes bacterianos causantes de diarreas. Sin embargo, en algunos países como en México no se conoce la incidencia real de microorganismos como *Aeromonas* spp., y *Y. enterocolitica* ya que no son buscados de manera rutinaria (Hernández-Cortez *et al.*, 2011).



**Cuadro 5. Agentes etiológicos de diversos síndromes diarreicos**

Síndromes	Características	Agentes etiológicos
Diarrea aguda líquida	Mecanismo no inflamatorio, mediado por enterotoxinas	<p><i>Rotavirus</i>  <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica (ETEC)  <i>Escherichia coli</i> enteropatogénica (EPEC)  <i>Escherichia coli</i> enteroadherente (EAEC)</p> <p><i>Salmonella</i> spp.</p> <p><i>Cryptosporidium</i> spp.</p> <p><i>Vibrio cholerae</i></p> <p><i>Clostridium perfringens</i>  <i>Bacillus cereus</i>  <i>Staphylococcus aureus</i></p> <p><i>Vibrio parahaemolyticus</i></p> <p><i>Giardia lamblia</i>  Virus Norkwalk  Adenovirus 40, 41  <i>Campylobacter jejuni</i>  <i>Campylobacter coli</i>  <i>Aeromonas</i> spp.</p>
Diarrea con sangre	Mecanismo inflamatorio por invasión del epitelio intestinal, denominado usualmente disentería. También hay presencia de moco y leucocitos en las heces.	<p><i>Shigella</i> spp.  <i>Entamoeba histolytica</i>  <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (EHEC)  <i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva (EIEC)  <i>Campylobacter jejuni</i>  <i>Salmonella enterica</i> (Serovar Enteritidis, Choleraesuis, Paratyphi)  <i>Vibrio parahaemolyticus</i>  <i>Yersinia enterocolitica</i>  <i>Trichinella spiralis</i>  <i>Schistosoma japonicum</i>  <i>Balantidium coli</i>  <i>Clostridium difficile</i>  <i>Aeromonas</i> spp.</p>
Diarrea crónica/Mal absorción	Interferencia del agente infeccioso con la actividad normal del tracto gastrointestinal, pero sin daño aparente en pacientes no inmunodeficientes.	<p><i>Giardia lamblia</i>  <i>Ascaris lumbricoides</i>  <i>Necator americanus</i>  <i>Strongyloides stercoralis</i></p> <p><i>Trichuris trichura</i></p> <p><i>Cryptosporidium</i></p> <p><i>Isospora belli</i></p> <p><i>Enterocytozoon bieneusi</i></p>
Fiebre entérica	Mecanismo invasivo con penetración a través de la mucosa intestinal y diseminación hematogena a todo el organismo <i>Salmonella entérica</i> serovarTyphi.	<p><i>Yersinia enterocolitica</i>  <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>  <i>Salmonella enterica</i> serovar Paratyphi A y B  <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>  <i>Yersinia pseudotuberculosis</i></p>
Gastritis o atrofia gástrica	Colonización del epitelio gástrico con ulceración.	<i>Helicobacter pylori</i>

Tomado de: Hernández-Cortez *et al.*, 2011.

---

### 1.2.1. *Yersinia enterocolitica*

El género *Yersinia* está formado por al menos 17 especies, de las cuales *Yersinia pestis*, *Yersinia enterocolitica* y *Yersinia pseudotuberculosis* son consideradas patógenos para los humanos. La enfermedad causada por *Y. enterocolitica* es la yersinosis, se caracteriza generalmente por síntomas, tales como, la gastroenteritis con diarrea y/o con vómito; sin embargo, la fiebre y el dolor abdominal son los síntomas que la definen. Las infecciones causadas por *Yersinia* spp., pueden ocasionar síntomas similares a la apendicitis y a la linfadenitis mesentérica, pero también puede causar infecciones en otras áreas como en heridas, en articulaciones y en el tracto urinario (Rodríguez *et al.*, 2000; Biatas *et al.*, 2012).

*Y. enterocolitica* perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* es una bacteria Gram negativa, que no forma esporas, es anaerobio facultativo, móvil por flagelos peritricos a 22-25 °C, pero no a 37 °C, oxidasa negativo y catalasa positivo, crece a una temperatura entre 30-37 °C a un pH entre 7 y 8, tiene la capacidad de reproducirse a  $\pm 5$  °C. *Y. enterocolitica* es una especie que incluye tanto a las cepas patógenas y no patógenas que están distribuidas en diferentes bio y serotipos los cuales constan de 6 biotipos (1A, 1B, 2, 3, 4, 5) y más de 70 serotipos, basados en antígenos O, la patogenicidad está asociada a los biotipos 1, 2 y 4, y a los serotipos O:3, O:8 y O:9 (Elizalde-Castañeda *et al.*, 2001; Biatas *et al.*, 2012; Terech-Majewska *et al.*, 2016).

Se ha aislado a *Y. enterocolitica* de muestras ambientales como lagunas y lagos, de alimentos como la carne, los helados y la leche. La aparición de la enfermedad se da entre las 24 y 48 horas después de la ingestión, esta es la ruta usual de infección ya que los alimentos y las bebidas son los vehículos de transmisión. Los cuadros clínicos más frecuentes producidos por este microorganismo son: enterocolitis, ileítis terminal, linfadenitis mesentérica, septicemia y algunos otros cuadros extraintestinales (Rodríguez *et al.*, 2000; URL, 7).

En los casos de enterocolitis se presenta la diarrea con dolor abdominal, y presencia

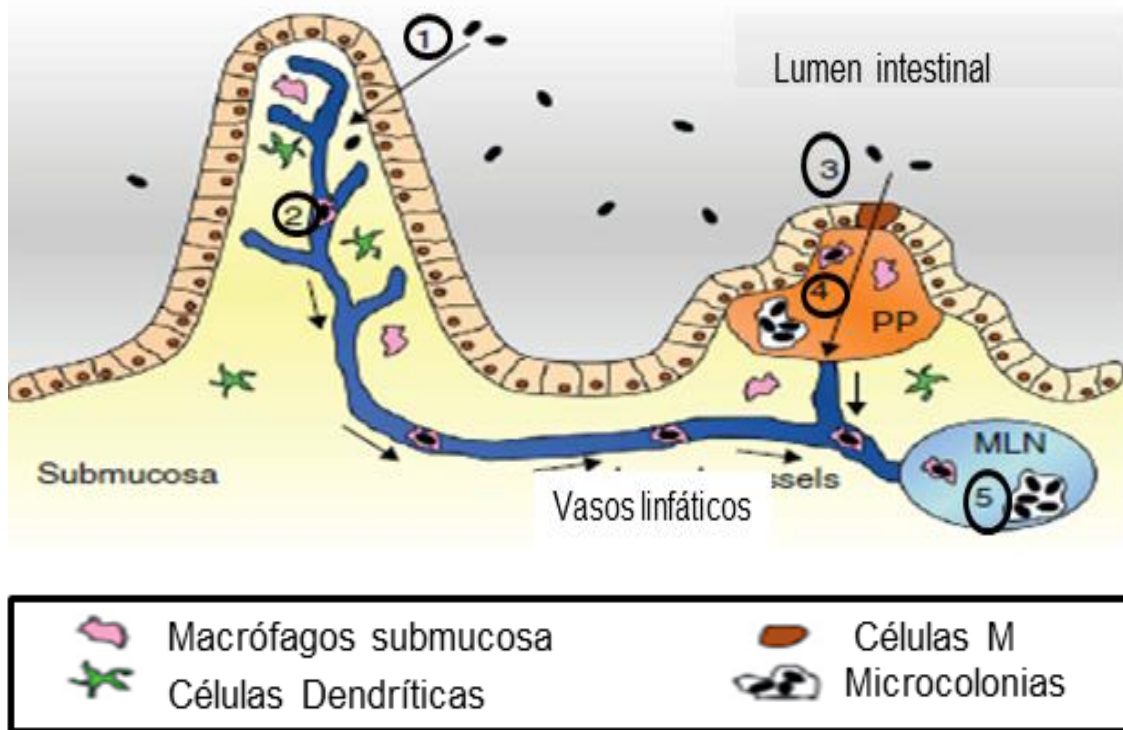
---

---

de sangre en las heces. La gastroenteritis causada por *Y. enterocolitica* es la forma frecuente de yersinosis, por lo general afecta a bebés y niños pequeños, en niños mayores y adultos jóvenes la yersinosis se puede presentar como síndrome pseudoapendicular que con reiteración se confunde con apendicitis (URL, 8; Fredriksson-Ahomaa *et al.*, 2006).

#### **1.2.1.1. Mecanismo de patogenicidad y factores de virulencia**

La ruta habitual de este patógeno es a través de alimentos o agua contaminados. *Y. enterocolitica* coloniza el tracto intestinal en particular el intestino delgado (íleon terminal) y colon proximal. En consecuencia, la mayoría de los efectos patológicos y las manifestaciones clínicas ocupan este sitio, donde *Yersinia* atraviesa el lumen intestinal y penetra la barrera mucosa para que finalmente se adhiera a las células intestinales. La bacteria se une preferentemente a las células M de las placas de Peyer, y una vez en el interior, las bacterias son transportadas y expulsadas al lado basolateral de la célula M, los fagocitos internalizan las bacterias, estas se replican en los macrófagos y por lo tanto se supone que son transportados dentro de los ganglios linfáticos mesentéricos, provocando una respuesta inflamatoria que provoca dolor abdominal. Una vez situada en la placa de Peyer, *Y. enterocolitica* se replica provocando microabcesos y ulceración del epitelio, posteriormente la infección se extiende a los ganglios linfáticos mesentéricos (Figura 1) (Fábrega & Vila, 2012).



**Figura 1. Modelo de la patogénesis de *Yersinia enterocolitica*.**

1. *Yersinia enterocolitica* atraviesa el epitelio intestinal a través de las células epiteliales de la submucosa. 2. En la submucosa los macrófagos fagocitan al patógeno y entran en el sistema linfático alcanzando así a los ganglios linfáticos mesentéricos. 3. Por otra parte las bacterias pueden ser envueltas por las células M. 4. Una vez *Yersinia* en las placas de Peyer forma microcolonias y comienza a replicarse. 5. Finalmente, las células bacterianas se encuentran en los ganglios linfáticos mesentéricos (MLN) y pueden formar microcolonias para permitir su replicación. Tomada y modificada de: Fabrega & Vila, 2012.

La patogenicidad de esta especie está relacionada en mayor grado con la presencia del plásmido de virulencia de 70 kb llamado pYV (pCD1 en *Y. pestis*) ausente en cepas no virulentas, además de otros factores de virulencia codificados en el cromosoma (Chen *et al.*, 2010).

El biotipo 1B de *Y. enterocolitica* contiene una isla de patogenicidad (HPI por sus siglas en inglés *high pathogenicity island*) móvil, localizada en el cromosoma. En la HPI existe un grupo de genes que codifican para la síntesis de Yersinia bactina, un sideróforo de unión a hierro necesario para la infección sistémica y también tiene una enterotoxina termoestable *Yst* que codifica para los genes cromosomales *ystA*, *ystB* y *ystC*.

Todas las cepas de *Y. enterocolitica* portan el gen *yst* cromosomal, pero no siempre llegan a expresar la enterotoxina (Chen *et al.*, 2010; Rusac *et al.*, 2014; Hernández-Cortez, 2012; Fábrega & Vila, 2012).

Sin embargo, los genes *ail*, *inv* y *yst* situados en el cromosoma de *Y. enterocolitica* son los más utilizados como blancos cromosómicos, el gen *ail* (adhesina de unión a la invasión) y el gen *inv* (que expresa una invasina durante el proceso de la invasividad), son 2 genes que al menos son requeridos para la adhesión e invasión hacia las capas epiteliales del intestino (Rusac *et al.*, 2014; Fredriksson-Ahomaa *et al.*, 2006).

La bacteria es capaz de absorber hierro, ya que posee un complejo de sideróforos y receptores necesarios para captarlos. El complejo de hierro-sideróforo producido de esta manera es transportado al interior de la célula por receptores específicos localizados en la superficie de la bacteria. Por otra parte, *Yersinia* posee otros factores que son significantes en su virulencia. Algunos factores de virulencia cromosomal se desactivan a 37 °C mientras que otros factores se activan a ésta temperatura (Cuadro 6) (Arbeitskreis *et al.*, 2000).

**Cuadro 6. Principales factores de patogenicidad de *Y. enterocolitica*, y su dependencia de la temperatura**

Localización	Factor de patogenicidad	Expresado	
		37 °C	< 25 °C
<b>Cromosoma</b>	Estructura del lipopolisacárido	Cadena corta	Cadena larga
	Forma de la colonia	Rugosa	Lisa
	Morfología celular	Pleomórfica	Cocoide
	Adherencia a células fagocíticas	Débil	Fuerte
	Presencia de flagelos (motilidad)	No	Si
	Hialuronidasa	Bajo	Alto
<b>Plásmido</b>	Proteínas específicas sobre la membrana externa	Si	No
	Hidrofobicidad de la superficie celular	Si	No
	Dependencia de calcio en el crecimiento	Si	No
	Resistencia a sueros bactericidas	Si	No
	Resistencia a fagocitosis	Si	No
	Resistencia a destrucción intracelular	Si	No

Tomado y modificado de: Arbeitskreis *et al.*, 2000.

Los principales genes de virulencia que codifican para diversas sustancias que participan en el mecanismo de patogenicidad de *Y. enterocolitica* se muestran en el cuadro 7.

**Cuadro 7. Genes de virulencia de *Y. enterocolitica***

Genes de virulencia	Mecanismo de patogenicidad
Proteínas Yops ( <i>Yersinia</i> outer proteins)	Resistencia a fagocitosis, citotoxicidad, desfosforilación de proteínas del huésped.
<i>inv, ail</i>	Genes implicados en patogénesis.
<i>rfbC</i>	Para identificar cepas serotipo O:3.
<i>yst</i>	Codifica para una enterotoxina termoestable.
Proteína MyF (Mucoïd <i>Yersinia</i> Fibrillae)	Adhesina fimbrial, involucrado en la apariencia mucoides de las colonias bacterianas.

Tomado y modificado de: Hernández-Cortez *et al.*, 2012.

### 1.2.2. *Aeromonas* spp.

En la primera edición del Manual de Bacteriología Determinativa de Bergey, el género *Aeromonas* fue dividido en dos grandes grupos: las especies mesófilas y móviles (*Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae* y *Aeromonas sobria*), y las especies psicrófilas e inmóviles (*Aeromonas salmonicida*). En la clasificación actual aún se mantiene esta división, distinguiendo entre: el grupo de las *Aeromonas* mesófilas que contienen diferentes especies móviles por flagelo polar y un 60 % también por flagelo lateral (a excepción de *Aeromonas media*); y el grupo de las *Aeromonas* psicrófilas, que contiene una única especie inmóvil, *A. salmonicida* (Castro-Escarpulli *et al.*, 2015).

El género *Aeromonas*, pertenece a la familia *Aeromonadaceae* está constituido por bacilos Gram negativos, oxidasa y catalasa positivas, heterótrofos, anaerobios facultativos, capaces de catabolizar tanto la glucosa como numerosos carbohidratos con producción de ácidos y frecuentemente gas, reductores de nitritos a nitratos y con una temperatura óptima de crecimiento de 22 – 28 °C. Poseen una amplia distribución en medios acuáticos principalmente dulceacuícolas, este género ha sido descrito, por una parte como componente de la microbiota asociada a animales poiquiloterms, y por otra, como patógenos de peces y del ser humano en enfermedades de transmisión hídrica (Castro-Escarpulli *et al.*, 2015).

---

Los miembros de este género producen varias exoenzimas como: proteasas, DNAsas, RNAsas, elastasas, lecitinasas, amilasas, gelatinasas y lipasas, entre otras, muchas de ellas consideradas factores de virulencia. En la actualidad, el género comprende 25 especies, algunas de las cuales se han aislado a partir de muestras clínicas humanas, animales, alimentos y agua (Figueras & Beaz-Hidalgo, 2014).

La incidencia de *Aeromonas* se investiga como parte del conjunto de microorganismos que pueden estar presentes en distintos alimentos tales como: carne (ternera, oveja, cerdo y pollo), vegetales, huevos, pescado, mariscos y alimentos preparados.

El agua y alimentos de origen animal tiene un papel importante en la transmisión de estos microorganismos al humano. Debido a que estas bacterias pueden desarrollarse a bajas temperaturas y que en la actualidad los consumidores demandan alimentos con un mínimo de procesamiento y con baja cantidad de aditivos, existiendo el riesgo de que la cadena fría no sea suficiente para mantener a raya su proliferación y que al menos la especie *A. hydrophila* se relaciona directamente con brotes de diarreas ocasionadas por consumo de pescado crudo, mariscos mal cocinados, vegetales no desinfectados correctamente, así como la contaminación cruzada durante la preparación de los alimentos y contaminación post-pasteurización. Actualmente *Aeromonas* spp., se considera agente etiológico emergente que causa varias infecciones que pueden ocurrir tanto en personas inmunocompetentes e inmunocomprometidos. El aislamiento más común en humanos es en muestras de heces de pacientes con diarrea principalmente, segundo de heridas y finalmente en sangre. También es capaz de producir infecciones tales como meningitis, peritonitis, miocarditis, síndrome urémico hemolítico (HUS: *Haemolytic uraemic syndrome*), fascitis necrosante en heridas (Castro-Escarpulli *et al.*, 2015; Figueras & Beaz-Hidalgo, 2014; Bravo *et al.*, 2011).

---

### **1.2.2.1. Mecanismo de patogenicidad y factores putativos de virulencia**

El mecanismo de patogenicidad causado por el género *Aeromonas* spp., es llevado a cabo por la colonización, invasión y proliferación del microorganismo, lo que le da una habilidad para causar daño en los tejidos del huésped, así como evadir su sistema inmune y producir infección (Bravo *et al.*, 2011).

Se han identificado una serie de factores putativos de virulencia descritos en el género, incluyen tanto componentes estructurales como productos extracelulares (cuadro 8) (Latif, 2015).



**Cuadro 8. Principales factores putativos de virulencia del género *Aeromonas***

Factores de virulencia (genes) <sup>a</sup>	Función
<b>Adhesinas filamentosas</b>	
Flagelos polares ( <i>flaA, B,G,H,i, maf-1, fliA</i> )	Movilidad, mejora la adherencia, la formación de biopelícula y la invasión celular.
Flagelos laterales ( <i>iafA-U, maf-5, flhA, fliU</i> )	
Pili o tipos de fimbrias I – IV ( <i>tapA – D, flp</i> )	
<b>Adhesinas no filamentosas</b>	
Cápsula (Kps C, D, E, M, S, T)	Mejora la resistencia de las defensas inmunitarias no específicas.
Capa S <sup>b</sup> ( <i>vapA</i> )	Protege contra las bacterias de la defensa del huésped.
Lipopolisacárido ( <i>wahA-F, waaA, C, E, F</i> )	Responsable de la actividad inflamatoria.
<b>Productos extracelulares</b>	
Enterotoxina citotóxica ( <i>act</i> )	Inhibe actividad fagocítica del huésped, produce hemólisis y aumenta los niveles del factor de necrosis tumoral.
Enterotoxina citotóxica ( <i>alt, ast</i> )	Aumenta el nivel de cAMC <sup>c</sup> y las prostranglandinas en la mucosa intestinal.
Hemolisina ( <i>aerA, hylA</i> )	Crea poros en las membranas de la célula huésped y crea lisis.
Proteasas ( <i>tagA</i> ) y lipasas ( <i>gcat, pla</i> )	Facilita la invasión y daño tisular.
Toxina Shiga-like ( <i>stx1, stx2</i> )	Inactiva los ribosomas (las paradas de la síntesis de proteínas) de las células del endotelio vascular que conduce a muerte celular.
<b>Sistemas de secreción</b>	
T2SS ( <i>exeA, exeB, exeD</i> )	Secreción de amilasa, proteasa, aerolisina, etc.
T3SS ( <i>ascF-G, ascV</i> ) y T6SS ( <i>vasH, vas K</i> )	Inyección de proteínas efectoras en las células huésped.
T4SS ( <i>traA-K, VirB11, VirD</i> )	Entrega de proteínas y DNA en las células huésped actuando como un sistema de conjugación bacteriana.
a= Sólo algunos genes se enumeran.	
b= Se trata de una proteína de membrana externa.	
c= cAMP (Adenosin monofosfato cíclico).	

T2SS: Sistema de secreción tipo II (*Type II secretion systems*)

T3SS: Sistema de secreción tipo III (*Type III secretion systems*)

T4SS: Sistema de secreción tipo IV (*Type IV secretion systems*)

T6SS: Sistema de secreción tipo VI (*Type VI secretion systems*)

Tomado y modificado de: Figueras & Beaz-Hidalgo, 2014.

### 1.3. Identificación de los agentes etiológicos causantes de enfermedades gastrointestinales

Un interrogatorio y un examen físico apropiado, aunados al análisis de las heces son el primer diagnóstico a decidir si se trata de una diarrea secretoria, donde hay una

---

gran pérdida de líquido y lo que necesita el paciente es hidratación; o una diarrea inflamatoria donde hay invasión de la mucosa por bacterias como *Shigella flexneri* o *Campylobacter* spp., y las heces presentan moco, sangre o ambos, en este tipo de diarrea es necesario una terapia antimicrobiana.

En el laboratorio de microbiología se realiza el coprocultivo con la intención de aislar el grupo bacteriano causante de infecciones gastrointestinales, actualmente las pruebas de biología molecular, ayudan a identificar a los agentes etiológicos que son nutricionalmente difíciles de aislar o bien la cantidad secretada es pequeña con el fin de dar un diagnóstico preciso (Guillén & Lucho, 2011).

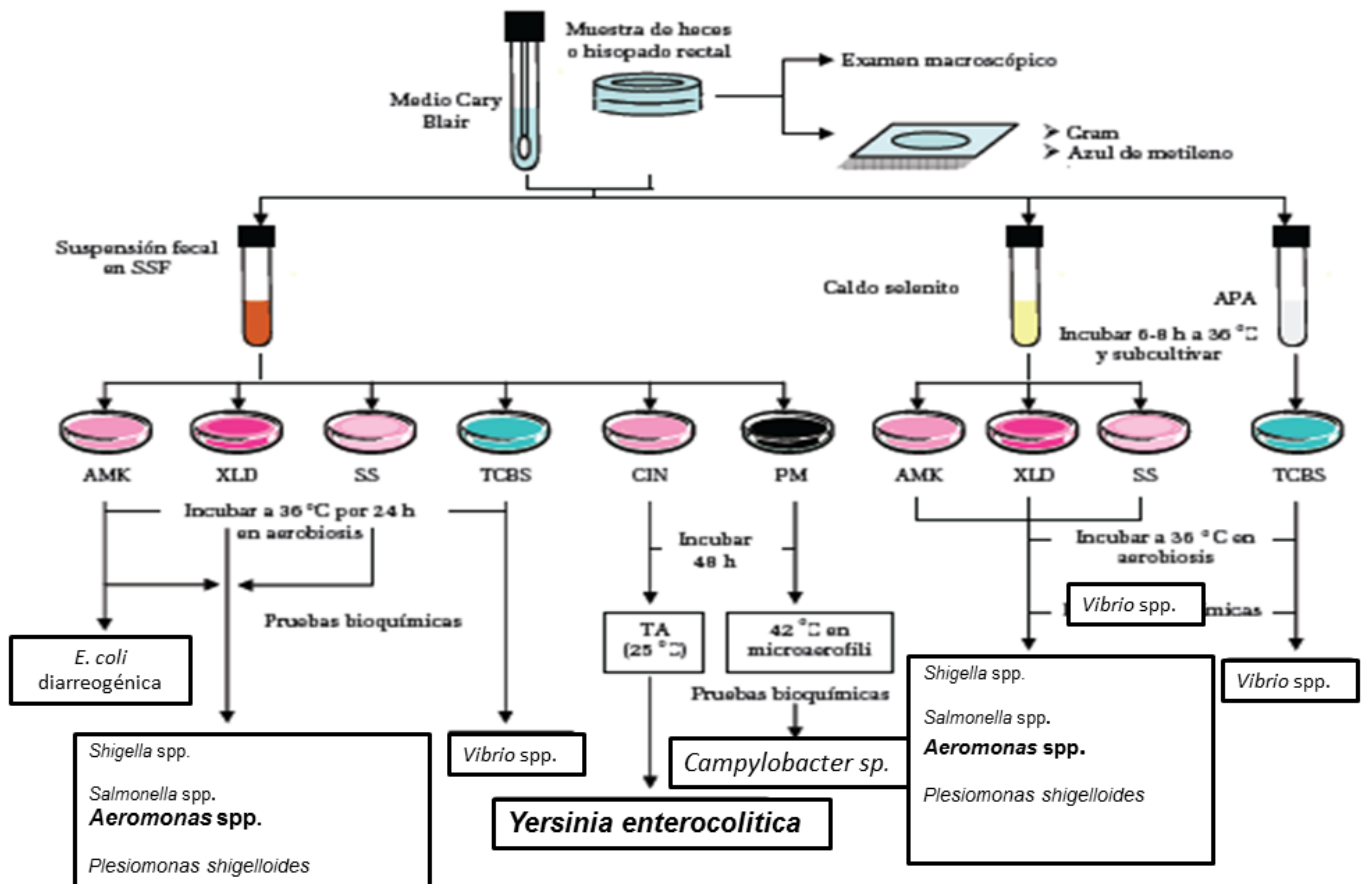
### **1.3.1. Coprocultivo**

En el estudio microbiológico se debe considerar razones tanto clínicas como epidemiológicas. Las primeras están dadas por la gravedad del proceso (deshidratación, fiebre elevada, pus o moco en las heces) o por la susceptibilidad del paciente (granulopenia, SIDA, hospitalización, edades extremas de la vida, HUS). En las segundas, por los brotes epidémicos (banquetes, guarderías, hospitales), diarrea del viajero y en sospecha de posibles agentes etiológicos (Ruiz de Alegría-Puig & Perea-López, 2010).

El coprocultivo o cultivo de heces es el método utilizado usualmente para la investigación de las bacterias productoras de diarrea. Se conoce que la sensibilidad para detectar al agente etiológico es de un 60–80 %, quedando un 20 % sin identificar mismo que se engloba en el término de diarrea mal definida (García-Martos & Fernández, 1994).

Dentro del conjunto de la microbiota normal hay que buscar los microorganismos patógenos eventualmente presentes. En ciertos casos, estos patógenos son abundantes, siendo fácil su detección, pero en otras ocasiones se encuentran en menor cantidad y su búsqueda resulta muy laboriosa, por lo que es indispensable utilizar técnicas especiales de aislamiento selectivo (García-Martos & Fernández, 1994).

El coprocultivo esta dirigido para el aislamiento e identificación de bacterias enteropatógenas denominadas clásicas (*Salmonella* y *Shigella*), sin embargo, otras bacterias como *Y. enterocolitica* debe buscarse con orientación especial. En el caso de *Aeromonas* puede crecer en los medios diferenciales y selectivos empleados para el aislamiento de las bacterias Gram negativas. En la figura 2 se puede observar la metodología sugerida para realizar un coprocultivo (Castro-Escarpulli *et al.*, 2002; Romero-Cabello & Herrera, 2002; Castro-Escarpulli *et al.*, 2015).



**Figura 2. Método convencional: coprocultivo.**

Metodología para llevar a cabo un coprocultivo donde se utilizan medios selectivos y diferenciales para aislar específicamente los enteropatógenos. Tomado y modificado de: Velasco *et al.*, 2008.

Dentro del procedimiento de coprocultivo empleado para la identificación bacteriana están los métodos basados en pruebas bioquímicas que han sido utilizadas para diferenciar las bacterias enteropatógenas. Estas pruebas se fundamentan en demostrar si el microorganismo es capaz de fermentar azúcares, la presencia de

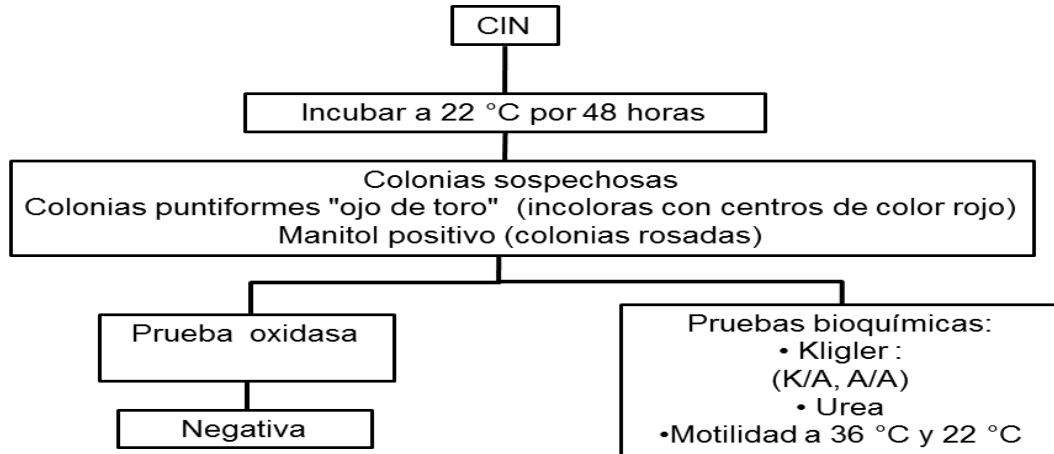
---

enzimas, la degradación de compuestos, etc. Aún bacterias fuertemente relacionadas pueden separarse en biotipos diferentes con base en el metabolismo microbiano (URL, 9).

Las principales ventajas del uso de métodos convencionales (cultivos) es el bajo costo, el aislamiento de poblaciones bacterianas, obtención de cultivos puros y viables de microorganismos. Entre los factores que afectan al método convencional están la demora en la obtención de datos, el empleo de grandes cantidades de medios de cultivo y detección de algunos microorganismos de lento crecimiento (Andreo & Durán, 2004; URL, 10).

#### **1.3.1.1. Identificación del género *Yersinia* por el método convencional**

*Y. enterocolitica* puede crecer en medio rico y también en gelosa MacConkey y gelosa Desoxicolato Citrato Lisina (DCL). Sin embargo, se destaca el medio selectivo Cefsulodina Irgasan Novobiocina (CIN), en donde después de 48 horas de incubación a temperatura ambiente (22 °C), se seleccionan colonias de bacterianas que fermentaron el manitol, la identificación se lleva a cabo mediante pruebas bioquímicas a 25 °C (utilizando medios como: movilidad y Voges Proskauer (VP)) y a 36 °C (triple azúcar hierro (TSI), Kliger, urea, hierro-lisina (LIA), citrato de Simmons). La metodología que se debe seguir fundamentalmente con el medio selectivo CIN se observa en la figura 3 (Elizalde-Castañeda *et al.*, 2001; Velasco *et al.*, 2008; URL, 11).



**Figura 3. Algoritmo en la identificación de *Yersinia enterocolitica***

CIN = Cefsulodina Irgasan Noviobiocina

K = alcalino

A = ácido

Tomado y modificado de: Velasco *et al.*, 2008.

### 1.3.1.2. Identificación del género *Aeromonas* por el método convencional

La morfología colonial del género *Aeromonas* en gelosa MacConkey se presenta como colonias brillantes, lactosa negativa. En gelosa sangre las colonias son de color gris perlado, de 2 – 3 mm de diámetro y pueden presentar alfa o beta hemólisis. El medio selectivo de elección para su aislamiento es el agar dextrina ampicilina (ADA) donde *Aeromonas* spp., es identificado a partir de colonias positivas de color amarillo por la fermentación de la dextrina. También se encuentra el medio cromogénico - CromoCen® AGN desarrollado para la identificación de una gran variedad de organismos patógenos. Estos medios facilitan la identificación de estos organismos en el género y en algunos casos a nivel de especie. *Aeromonas* forma colonias con pigmentos de color verde claro, verdosos y salmón con o sin una amplia zona transparente que rodea (halo) de 2-3 mm de diámetro alrededor de toda la colonia (Castro-Escarpulli *et al.*, 2012; Aguilera-Arreola *et al.*, 2012).

La identificación microbiológica de este género se puede realizar con 10 pruebas bioquímicas básicas incluyendo: la citocromo oxidasa, crecimiento en gelosa tiosulfato citrato sales bilis sacarosa (TCBS), producción ácido a partir de, manitol y sacarosa, descarboxilación de la ornitina e hidrólisis de la gelatina. Adicionalmente,

es recomendable realizar la prueba de crecimiento en presencia del agente Vibriostático O/129 (10 µg/150 µg) lo que permite la diferenciación con el género *Vibrio* y con *Plesiomonas shigelloides* (cuadro 9) (Castro-Escarpulli *et al.*, 2015).

**Cuadro 9. Características diferenciales del género *Aeromonas* y otros géneros relacionados**

Prueba	<i>Aeromonas</i>	<i>Plesiomonas</i>	<i>Vibrio</i>
Crecimiento en 0% de NaCl	+	+	- <sup>a</sup>
6% NaCl	-	-	+
Resistencia de O/129 <sup>b</sup>	+	-	- <sup>c</sup>
Descarboxilación de la ornitina	(-)	+	+
Fermentación de inositol	-	+	-
Fermentación de D-manitol	(+)	-	+
Fermentación de sacarosa	(+)	-	(+)
Hidrólisis de la gelatina	+	-	+
Crecimiento en TCBS	(-)	-	(+)

+, > 90% positivo; -, 0 -10% positivo.

(+) Positivas la mayoría de las cepas pero algunas especies pueden ser negativas, (-) negativas la mayoría de las cepas pero algunas especies pueden ser positivas

a = Excepto *Vibrio mimicus*, *Vibrio cholerae* y *Vibrio fluvialis*

b = Factor vibriostático (2, 4-diamino – 6, 7 - diisopropylpteridine; 150 µg/disco)

c = excepto *V. cholerae* serogrupo O1 y O139

Tomado y modificado de: Figueras & Beaz-Hidalgo, 2014; Castro-Escarpulli *et al.*, 2015.

### 1.3.2. Métodos comerciales

Existen sistemas o equipos multipuebas con el fin de conseguir una mayor rapidez en la identificación de algunas bacterias. Estos sistemas pueden ser miniaturizados, semiautomatizados o automatizados.

#### 1.3.2.1. Sistemas comerciales manuales o galerías multipuebas

Se trata de celdillas aisladas con un sustrato liofilizado que se inoculan individualmente y que permiten realizar simultáneamente entre 10 y 50 pruebas bioquímicas. Los resultados de las pruebas se expresan de forma numérica (los resultados de las pruebas se agrupan de tres en tres, de manera que el resultado de cada trío de pruebas queda reducido a un dígito). Cada especie está definida por un código numérico, resultado de la codificación de las reacciones a las pruebas que se hubieran utilizado. Ante un microorganismo problema, se busca el código numérico y

---

se comprueba a qué bacteria pertenece. Algunos de los sistemas comerciales disponibles en el mercado son: API (BIOMÉRIEUX), Enterotube (BBL), Oxi/FermTube (BD), RapIDsystems y MicroID (Remel), Biochemical ID systems (Microgen), etc (Fernández-Olmos *et al.*, 2012).

### 1.3.3. Técnicas inmunológicas

Las técnicas inmunológicas de detección de antígenos permiten poner de manifiesto la presencia de microorganismos en las muestras clínicas. El desarrollo de estas técnicas se inició con el propósito de poder acelerar el diagnóstico de las enfermedades infecciosas tratando de superar algunos de los inconvenientes, especialmente la lentitud en el desarrollo en los medios de cultivo. Estas técnicas son particularmente útiles en aquellos casos en que el microorganismo causal crece lentamente o bien, no crece en los medios de cultivo. Además, los resultados de los mismos no se ven alterados por la administración previa de antimicrobianos. Como inconvenientes principales de las mismas cabe destacar que no ofrecen información sobre la sensibilidad y especificidad deseadas (Alonso *et al.*, 2005).

Estas técnicas inmunológicas se basan en la de detección de antígenos que se fundamentan en la afinidad antígeno-anticuerpo (Alonso *et al.*, 2005).

Las principales técnicas de detección de antígeno son (Alonso *et al.*, 2005):

a) contrainmunolectroforesis, b) inmunocromatografía, c) enzimoimmunoanálisis, d) inmunofluorescencia y f) métodos luminométricos.

Las técnicas inmunológicas más utilizadas para la identificación de enteropatógenos son la técnica de enzimoimmunoensayo (ELISA por sus siglas en inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) y aglutinación con partículas de látex (URL, 12).

A pesar que las técnicas convencionales y técnicas inmunológicas ayudan a la identificación del microorganismo, se encuentra en aumento el uso de las técnicas moleculares ya que son más rápidas, tienen una mayor sensibilidad, no requieren que el microorganismos se encuentre viable y detectan microorganismos que no son identificados por las técnicas convencionales.

---

### **1.3.4. Técnicas de biología molecular**

Las técnicas de Biología Molecular permiten la detección de material genético, tanto DNA como RNA, que constituye la característica inequívoca de cada especie, a partir de diferentes muestras clínicas. Su aplicación surge como una necesidad para poder detectar microorganismos de difícil crecimiento en cultivos o desarrollos tardíos. La microbiología molecular ayuda en la caracterización de bacterias desconocidas y de comunidades microbianas (URL, 13; URL, 14).

#### **1.3.4.1. Extracción de DNA**

Para extraer los ácidos nucleicos del material biológico es preciso provocar una lisis celular, inactivar las nucleasas celulares y separar los ácidos nucleicos de los restos de células. El procedimiento de lisis idóneo suele consistir en un equilibrio de técnicas que ha de ser suficientemente fuerte para romper el material inicial complejo, pero suficientemente suave para preservar el ácido nucleico blanco. La importancia del proceso de obtención y purificación de DNA es recobrar la mayor cantidad de material genético libre de proteínas, fenol e inhibidores de las enzimas empleadas en el análisis genético. La purificación de ácidos nucleicos es un requisito imprescindible para realizar diversas técnicas de biología molecular (Camacho-García, 2013; URL, 14).

#### **1.3.4.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*) ha sido la principal herramienta diagnóstica que ha aprovechado las bondades de la biología molecular a tal punto de alcanzar gran valor y versatilidad como técnica de análisis debido en parte, a su adaptabilidad y aplicabilidad (Bolívar *et al.*, 2013).

La PCR es una alternativa para el estudio de los genes, la cual tiene una amplia gama de campos que abarca desde la detección de agentes etiológicos, pasando por genotipificación, análisis de enfermedades genéticas y oncológicas, amplificación y



---

modificación de fragmentos de DNA, marcador genético para aplicaciones forenses, prueba de paternidad entre otros (Bolívar *et al.*, 2013).

Esta técnica ha demostrado que la especificidad, el rendimiento y fidelidad se encuentra influenciada por los diversos componentes: 1. Mezcla de reacción, 2. Régimen de ciclos, 3. DNA polimerasa (Bolívar *et al.*, 2013).

La PCR es una reacción que requiere de varios componentes básicos (Bolívar *et al.*, 2013):

- *Desoxirribonucleósidos trifosfatados* (dNTP's), los cuatro dNTPs son los ladrillos para construir las nuevas cadenas de DNA.
- *Ión  $Mg^{++}$*  que actúa como cofactor de la enzima.
- *Solución reguladora* para mantener el pH adecuado para el funcionamiento de la DNA polimerasa.
- *Par de iniciadores* los cuales delimitan la zona de DNA a amplificar.
- *DNA molde* que contiene la región de DNA que se va a amplificar.
- *DNA polimerasa* termoestable, cataliza la reacción.

A partir de estos componentes tres son los pasos necesarios a seguir y repetir por cada ciclo de la PCR. Comúnmente se les refiere como desnaturalización, alineamiento y extensión. Regularmente se genera una etapa previa de desnaturalización (generalmente a 94 °C) para relajar las posibles estructuras secundarias y de otros tipos; y un ciclo de extensión final.

#### **1.3.4.2.1. PCR múltiple**

La PCR múltiple (PCRm) que es una variante de la PCR, lo que se persigue es amplificar en una sola reacción distintas secuencias específicas, lo cual necesariamente implica que los reactivos mezclados y el programa utilizado sean suficientes y adecuados para permitir la detección de cada blanco y no inhibir el de las demás, teniendo en cuenta el escoger o diseñar oligonucleótidos que no interaccionen entre sí, que tengan temperaturas de alineamiento similares; que cada pareja amplifique una única secuencia blanco, y que generen amplicones de tamaño

---

suficientemente diferente como para poder ser separados y diferenciados tras la amplificación. En cuanto a la calidad y cantidad de DNA molde, por supuesto se debe partir de la ausencia de sustancias inhibidoras que puedan interferir en la reacción. Esta técnica de biología molecular sirve como base para el equipo FilmArray (Méndez-Álvarez & Pérez-Roth, 2004).

#### **1.3.4.2.2. FilmArray**

El diagnóstico de las enfermedades infecciosas puede ser un reto. A menudo hay un sinnúmero de posibilidades y descubrir cuál es la causa que está enfermando a un paciente requiere respuestas y decisiones rápidas para que pueda efectuarse un tratamiento inmediato y adecuado (URL, 15).

Existen en el mercado, equipos que se basan en biología molecular y que permiten la identificación de una diversidad de enteropatógenos, entre ellos el FilmArray el cuál se ha demostrado la funcionalidad sobre la detección de bacterias, virus y parásitos. FilmArray, es un sistema que se basa en una PCRm fácil de usar, que se puede utilizar en situaciones de diagnóstico complejos que requieren múltiples respuestas en un período de tiempo críticamente corto para (URL, 15):

- *Infecciones del tracto respiratorio superior*
- *Identificación de los organismos en los cultivos de sangre positivos*
- *Las infecciones gastrointestinales*

##### **1.3.4.2.2.1. FilmArray Gastrointestinal (GI) Panel**

El FilmArray GI Panel puede detectar e identificar simultáneamente ácidos nucleicos procedentes de múltiples bacterias, virus y parásitos directamente en muestras de heces obtenidos de individuos con indicios o síntomas de infección gastrointestinal (URL, 15).

El FilmArray GI Panel detecta simultáneamente 22 patógenos (Cuadro 10), a partir de muestras de heces conservadas en medio de transporte Cary Blair. Los resultados de los análisis realizados con el panel GI de FilmArray están disponibles

en aproximadamente una hora y se deben usar en conjunto con otros datos clínicos de laboratorios y epidemiológicos. Este panel indica su utilidad en el diagnóstico de agentes específicos de enfermedades gastrointestinales (BioFireDiagnostics, 2014).

#### **Cuadro 10. Bacterias, virus y parásitos detectados por el FilmArray GI Panel**

<b>Bacterias</b>	<b>Parásitos</b>	<b>Virus</b>
<i>Campylobacter</i> ( <i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i> y <i>C. upsaliensis</i> ) <i>Clostridium difficile</i> (Toxinas A/B) <i>Plesiomonas shigelloides</i> <i>Salmonella</i> spp. <i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Vibrio</i> ( <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. vulnificus</i> , y <i>V. cholerae</i> ), incluida la identificación específica de <i>V. cholerae</i> ) <i>E. coli</i> enteroagregativa (EAEC) <i>E. coli</i> enteropatógena (EPEC) <i>E. coli</i> enterotoxigénica <i>lt/st</i> <i>E. coli</i> productora de toxina tipo Shiga (STEC) <i>stx1/stx2</i> (incluida la identificación específica del serogrupo O157 de <i>E. coli</i> dentro de STEC) <i>Shigella</i> / <i>E. coli</i> enteroinvasiva (EIEC)	<i>Cryptosporidium</i> <i>Cyclospora cayetanensis</i> <i>Entamoeba histolytica</i> <i>Giardia lamblia</i> (también conocida como <i>G. intestinalis</i> y <i>G. duodenalis</i> )	Adenovirus F 40/41 Astrovirus Norovirus GI/GII Rotavirus A Sapovirus (Genogrupos I, II, IV, y V)

Tomado y modificado de: BioFireDiagnostics, 2014.

#### **1.3.4.3. Validación de técnicas moleculares**

Cuando se realizan análisis diagnósticos de material clínico es importante producir datos de buena calidad. Es necesario establecer los sistemas de garantía de calidad y control de calidad, incluyendo el empleo de muestras control, que aseguren que el sistema está funcionando adecuadamente. La validación del método es un factor fundamental para garantizar que los resultados de las pruebas reflejan el estado real de las muestras (URL, 16; URL, 17).

##### **1.3.4.3.1. Sensibilidad**

La sensibilidad analítica es la mínima cantidad de analito detectable, con base en este parámetro se detecta la cantidad más pequeña de copias de genomas de agentes infecciosos que pueden distinguirse de un resultado. Utilizando una serie de diluciones hasta que el ensayo ya no pueda detectar el blanco en cuestión (Camaro-Salas *et al.*, 2013; URL, 16).

---

La sensibilidad analítica es muy diferente a la sensibilidad diagnóstica. La sensibilidad diagnóstica sólo es pertinente cuando un ensayo se usa para detectar una condición o enfermedad en una población, definiéndose esta como la proporción o porcentaje de los individuos con una patología dada. Un ensayo con sensibilidad analítica puede dejar de dar un resultado positivo si la sustancia objetivo del análisis no está presente en la muestra procesada (Camaro-Salas *et al.*, 2013).

#### **1.3.4.3.2. Especificidad**

La especificidad analítica es la capacidad de un ensayo para distinguir entre el agente blanco y otros agentes infecciosos (por ejemplo, anticuerpo, organismo o secuencia genómica), dicha capacidad se determina mediante el análisis de los patógenos genéticamente relacionados entre sí y el material clínico obtenido de los participantes portadores de enfermedades. Refiriéndose a la especificidad analítica como la capacidad de un ensayo para detectar sólo el objetivo pretendido y que la cuantificación del blanco no se debe ver afectada por reactividad cruzada de otros analitos relacionados o potencialmente interferentes. Los dos aspectos de especificidad analítica son la reactividad cruzada y la interferencia (Camaro-Salas *et al.*, 2013; URL, 16; URL, 18).

La especificidad diagnóstica se refiere al porcentaje de individuos que no presentan una condición dada y están identificados por el ensayo como falso positivos para la condición. En algunas situaciones, la especificidad de diagnóstico de un ensayo puede disminuir sin pérdida de la especificidad analítica. Las situaciones que contribuyen a la disminución de especificidad diagnóstica de las pruebas en enfermedades infecciosas incluyen reacciones en falsos positivos que se producen a causa de la contaminación de la muestra o de la detección de otros microorganismos (Camaro-Salas *et al.*, 2013).

La validación, establece las características aplicables al método de la prueba, tales como, el grado de sensibilidad y especificidad, siendo estos parámetros importantes durante la validación de un ensayo para la detección de patógenos causantes de enfermedades gastrointestinales (URL, 16; URL, 17).

---

## 2. Antecedentes

Actualmente, la introducción de métodos de biología molecular en los laboratorios de microbiología clínica supone un gran apoyo a la hora de obtener diagnósticos sensibles y específicos para la identificación del agente etiológico causante de la patología estudiada.

A continuación, se muestran algunos artículos publicados internacionalmente sobre PCR con aplicación para la identificación de *Aeromonas* spp., y *Y. enterocolitica* (Cuadro 11).

**Cuadro 11. Artículos publicados de PCR simple y PCRm para la detección de *Y. enterocolitica* y *Aeromonas* spp., en varios países**

<b>Autores</b>	<b>Año</b>	<b>Trabajo realizado</b>
Ibrahim <i>et al.</i>	1997	Desarrollo de un ensayo altamente específico para la identificación rápida de cepas patógenas de <i>Yersinia enterocolitica</i> por PCR. Amplificación del gen <i>yst</i> que codifica para una enterotoxina termoestable.
Jourdan <i>et al.</i>	2000	Desarrollo de un ensayo fluorógeno 5'Nucleasa de PCR para la detección del gen <i>ail</i> de <i>Yersinia enterocolitica</i> patógena.
Wannet <i>et al.</i>	2001	Detección de patogenicidad de <i>Yersinia enterocolitica</i> por un rápido y sensible ensayo de PCR dúplex.
Cerro <i>et al.</i>	2002	Detección simultánea de <i>Aeromonas salmonicida</i> , <i>Flavobacterium psychrophilum</i> y <i>Yersinia ruckeri</i> , por PCRm.
Wang <i>et al.</i>	2003	Detección y caracterización de los genes que codifican para la hemolisina en <i>Aeromonas hydrophila</i> y <i>Aeromonas sobria</i> por PCRm.
Paz <i>et al.</i>	2004	Análisis de una cepa de <i>Yersinia enterocolitica</i> aislada de heces diarreicas humanas en Argentina.
Thisted-Labertz & Danielsson-Tham	2005	Identificación y caracterización de cepas patógenas de <i>Yersinia enterocolitica</i> mediante PCR y electroforesis en campo pulsado.
Kingombe <i>et al.</i>	2010	Método de PCRm para la detección de tres genes que codifican para la enterotoxina de <i>Aeromonas</i> .
Senderovich <i>et al.</i>	2012	Estudio molecular sobre la prevalencia y virulencia potencial de <i>Aeromonas</i> spp., en pacientes con diarrea en Israel.

En México son pocos los trabajos que han implementado una PCRm para detectar *Y. enterocolitica* y *Aeromonas* spp., en muestras clínicas y otros enteropatógenos. A continuación, se mencionan algunos trabajos (cuadro 12).

**Cuadro 12. Artículos publicados utilizando una PCRm en México**

Autores	Año	Trabajo realizado
Cerna <i>et al.</i>	2003	PCRm para la detección de tres genes del plásmido transmitidas por cepas de <i>E. coli</i> enteroagregativa
Rojas-Herrera & González-Flores.	2006	Detección e identificación de bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos mediante la reacción en cadena de la polimerasa.
Aguilera-Arreola <i>et al.</i>	2011	PCRm “ <i>in House</i> ” para detectar los factores de virulencia de especies de <i>Aeromonas</i> .
Hernández-Cortez <i>et al.</i>	2013	Diseño y estandarización de cuatro PCRm para detectar bacterias causantes de enfermedades gastrointestinales.
Camacho-García	2013	Evaluación de la sensibilidad y especificidad de cuatro PCRm para el diagnóstico de enfermedades gastrointestinales.

---

### 3. Justificación

Actualmente, existen diferentes métodos para la identificación de los agentes etiológicos causantes de enfermedades gastrointestinales, entre ellos se encuentran los métodos convencionales y los de biología molecular, dentro de estos últimos el más empleado es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y una de sus variantes, la PCR múltiple (PCRm).

Con la PCRm se pueden detectar microorganismos en una sola reacción, por lo que, en el presente trabajo, se estandarizó una técnica, que permitirá realizar la detección de dos patógenos no buscados de manera rutinaria en los laboratorios clínicos como *Aeromonas* spp., y *Y. enterocolitica* con ello se podrá conocer la incidencia de estas bacterias como agentes causales de síndrome diarreico

---

#### 4. Hipótesis

Si se estandariza y determina que una PCR múltiple es útil para la detección simultánea de *Aeromonas* spp., y *Yersinia enterocolitica* a partir de muestras de heces humanas, entonces sería una técnica con potencial para su implementación en los laboratorios clínicos.



---

## 5. Objetivos

### 5.1. Objetivo general

Estandarizar una PCRm para la identificación de *Aeromonas* spp., y *Yersinia enterocolitica* a partir de materia fecal.

### 5.2. Objetivos particulares

- Estandarizar una PCRm para la detección de *Aeromonas* spp., y *Y. enterocolitica* en una muestra inoculada artificialmente.
- Determinar la sensibilidad de la PCRm estandarizada.
- Aplicar la PCRm estandarizada de *Aeromonas* spp., y *Yersinia enterocolitica* en muestras de materia fecal.

## 6. Esquema general de trabajo

Para la realización del siguiente trabajo, se llevó a cabo la siguiente metodología (figura 4).

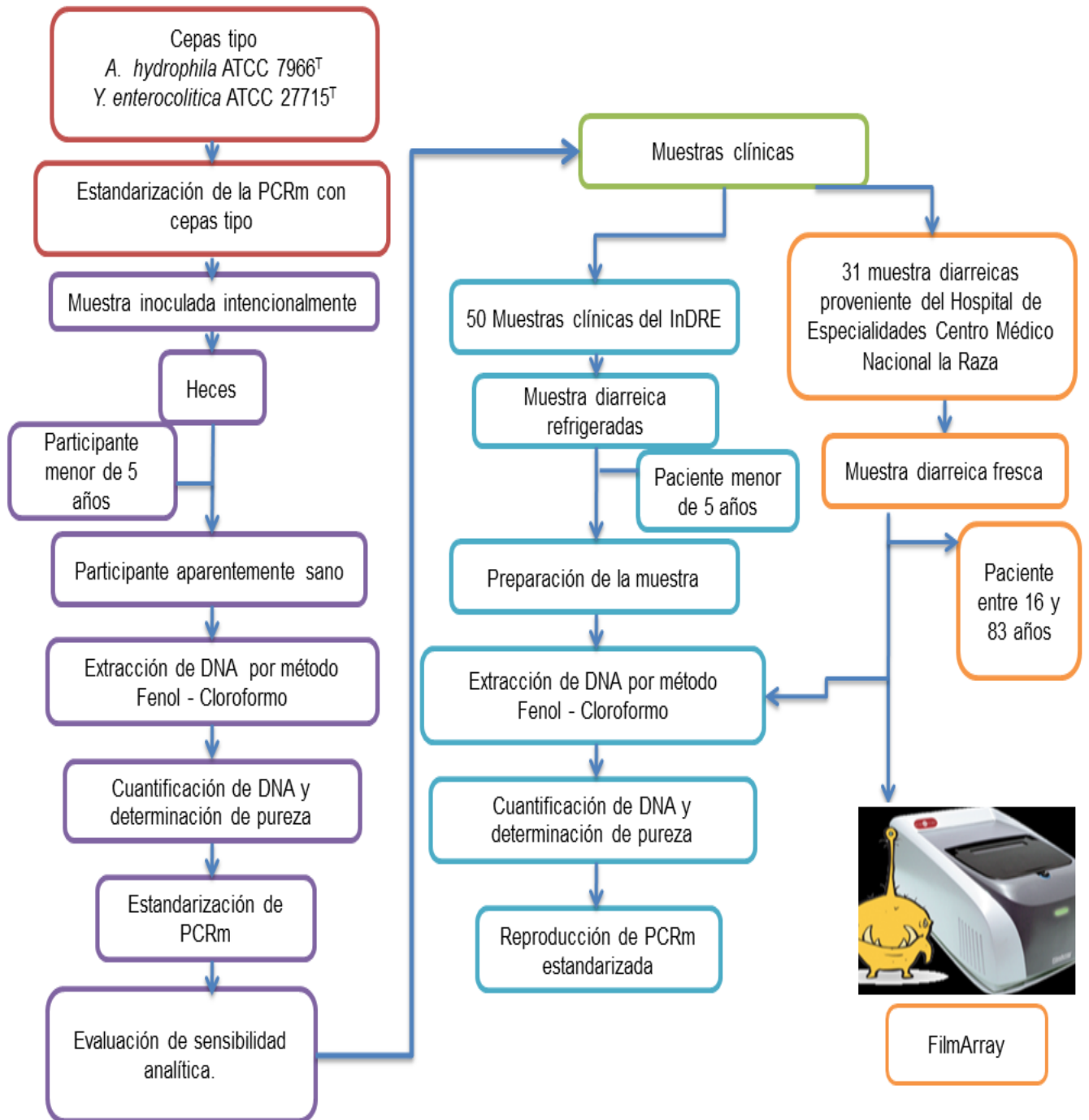


Figura 4. Diagrama de flujo

---

## 7. Materiales y Métodos

### 7.1. Muestras biológicas

- Muestra de heces de un niño aparentemente sano.
- 50 muestras de heces diarreicas de pacientes del InDRE conservadas en refrigeración (recolectadas del 1 de julio al 31 de octubre 2014).
- 31 muestras de heces diarreicas de pacientes del Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional la Raza (HECMNR) (recolectadas del 16 de febrero al 12 de mayo 2016).

#### 7.1.1. Criterios de inclusión

- Niño menor de 5 años aparentemente sano.
- Niños menores de 5 años con diagnóstico de diarrea o algún otro síntoma de infección gastrointestinal, para muestras procedentes del InDRE.
- Hombres y mujeres de 16 años en adelante, que asistieron al servicio de hematología y presentaron diarrea 48 horas después de haber ingresado HECMNR.

#### 7.1.2. Criterio de exclusión

- Muestra insuficiente de heces diarreicas para el análisis.

### 7.2. Cepas tipo

En el presente trabajo se contaron con cepas tipo para la inoculación intencionada de las muestras de materia fecal del participante aparentemente sano (cuadro 13).

**Cuadro 13. Cepas tipo y/o de referencia**

Cepas	Donado por :
<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966 <sup>1</sup>	Dra en C. Graciela Castro Escarpulli
<i>Yersinia enterocolitica</i> ATCC 23715 <sup>1</sup>	I.B.Q. Marcela León

### 7.3. Estandarización de la PCRm con cepas tipo

#### 7.3.1. Recuperación de las cepas

Las cepas tipo se recuperaron en placas de gelosa Infusión Cerebro y Corazón (BHI por sus siglas en inglés *Brain Heart Infusion*), se sembró por estría cruzada y fueron incubadas a 37 °C por 24 horas.

#### 7.3.2. Extracción de DNA de cepas tipo

A partir de las colonias aisladas de las cepas tipo sembradas en gelosa BHI, se extrajo el DNA por medio del kit comercial InstaGene™ Matrix, se tomaron de 2 a 3 colonias para realizar una suspensión en agua estéril, se centrifugó a 11 269 x g durante 1 minuto, el botón se resuspendió en 200 µL de la matriz del kit y fue llevado a incubación en baño maría a 56 °C durante 30 minutos al finalizar se llevó a ebullición durante 8 minutos, posteriormente se centrifugó a 11 269 x g durante 2 minutos y se recuperó el sobrenadante en donde se encontraba el DNA, el cual se conservó a -20 °C hasta su uso (Camacho-García, 2013).

#### 7.3.3. Condiciones de reacción para la PCRm con cepas tipo

Se llevó a cabo una PCRm con el DNA de las cepas tipo de *A. hydrophila* ATCC 7966<sup>T</sup> y de *Y. enterocolitica* ATCC 23715<sup>T</sup>, se utilizaron los iniciadores y las condiciones descritas previamente por Hernández Cortez, en 2012 y Chacón *et al.*, en 2003 (cuadro 14, 15 y 16). Llevándose a cabo la reacción en un termociclador T-Gradient (Biometra®; Goettingen, Alemania).

**Cuadro 14. Genes seleccionados y secuencia de los iniciadores**

Microorganismo	Gen blanco de detección	Iniciadores	Tamaño del amplicón (pb)	Referencia
<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>ail</i>	F:5'GCCTGTTTATCAATTGC3' R:5'ATCGAGTTTGGAGTATTC3'	439	Hernández-Cortez, 2012
	<i>yst</i>	F:5' AATGCTGTCTTCATTTGGAGC3' R: 5' ATCCAATCACTACTGACTTC3	130	
<i>Aeromonas</i> spp.	<i>gcat</i>	F: 5' CTCCTGGAATCCCAAGTATCAG3' R: 5' GGCAGGTTGAACAGCAGTATCT3'	237	Chacón <i>et al.</i> , 2003

**Cuadro 15. Mezclas de reacción para la PCRm**

Reactivo	Concentración inicial	Volumen de cada tubo ( $\mu\text{L}$ )	Concentración final
Agua	Sin concentración	23.3	Sin concentración
Regulador de PCR	10X	5	1X
DNTP's	2 mM	7.5	200 $\mu\text{M}$
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	2.8	2.8 mM
Iniciadores Forward y Reverse	0.3 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{L}$ de cada uno	0.10 $\mu\text{M}$
Taq polimerasa	5 U	0.5	2.5 U
DNA	Depende de la cepa	5	Depende de la cepa
Volumen final		50	

Tomado de: Camacho-García, 2013

**Cuadro 16. Condiciones de reacción para las PCRm**

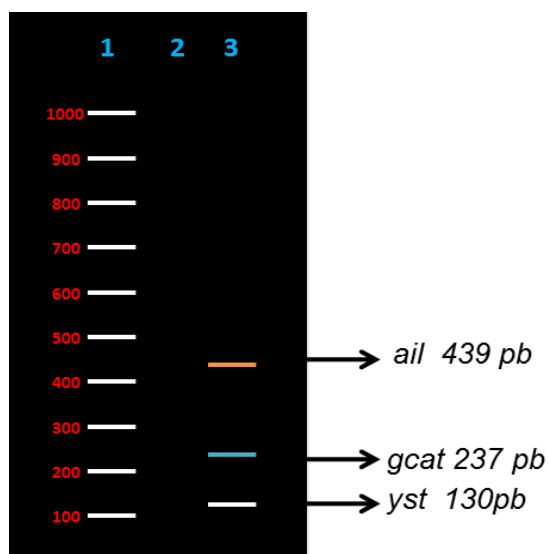
Pasos de la PCR	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Tiempo (minutos)	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	94	5	1
Desnaturalización	94	1	30
Alineamiento	55	1	
Extensión	72	1	
Extensión final	72	10	1

Tomado y modificado de: Camacho-García, 2013

#### 7.3.4. Demostración de los amplicones

Se realizó el corrimiento en geles de agarosa al 2 % a 60 V durante aproximadamente 130 minutos, en los cuales se colocó a cada pozo una mezcla de 5  $\mu\text{L}$  de DNA con 2  $\mu\text{L}$  de regulador de carga IV (0.25% azul de bromofenol 40 % (w/v) sacarosa en agua), después los geles se tiñeron con bromuro de etidio 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y posteriormente se visualizaron en un transiluminador de luz UV. Para la determinación de los amplicones, se corrió paralelamente un marcador de talla molecular de 50 y 100 pb *Ladder* (Invitrogen, USA).

A continuación se observa una representación gráfica de la distribución de las PCRm y los amplicones esperados (figura 5).



**Figura 5. Representación gráfica de la distribución de la PCRm.**

Se exhiben los amplicones correspondientes a la PCRm estandarizada de *Aeromonas* spp., y *Y. enterocolitica*. 1. MTM = Marcador de talla molecular de 100 pb; 2. Vacío; 3. PCRm

### 7.3.5. PCRm en gradiente de temperatura

Se realizó una PCRm en gradiente de temperatura con el DNA de las cepas tipo. Las temperaturas evaluadas fueron 50, 55 y 60 °C. La PCRm se llevó a cabo bajo las condiciones que se mostraron en los cuadros 15 y 16.

## 7.4. Estandarización de la PCRm con muestra de heces

### 7.4.1. Preparación e inoculación de las muestras

La muestra de heces de un niño menor de cinco años se colectó en un frasco limpio y se llevó al laboratorio para su inoculación.

La inoculación de la muestra se llevó a cabo con base en la cantidad de bacterias excretadas en el proceso diarreico, como se muestra en el cuadro 17, para simular dicho propósito se realizaron suspensiones a partir de un cultivo puro de cada cepa tipo y a partir de esto se ajustaron cada una de ellas al 0.5 del patrón del nefelómetro de MacFarland (correspondiente a  $1.5 \times 10^8$  células/mL) posteriormente se realizaron las diluciones necesarias. La inoculación de la muestra se llevó a cabo

---

tomando 500  $\mu\text{L}$  de cada una de las suspensiones bacteriana ajustadas y se inocularon a 500  $\mu\text{L}$  de la muestra de heces, para el caso de las muestras que simulaban un proceso disentérico se adicionaron 5 y 10  $\mu\text{L}$  de sangre (Camacho-García, 2013).

**Cuadro 17. Cantidad de bacterias excretadas por gramo de heces en un proceso diarreico**

Agente patógeno	Cantidad excretada en heces UFC/g
<i>Yersinia enterocolitica</i>	$10^5 - 10^9$
<i>Aeromonas</i> spp.	$10^8 - 10^9$

Tomado y modificado de: Aguilar-Prieto *et al.*, 1998; Camacho-García, 2013.

Después se llevó a cabo la extracción de DNA metagenómico como se describe a continuación (Camacho-García, 2013).

#### **7.4.2. Extracción de DNA metagenómico**

Se realizó la extracción de DNA metagenómico por el método de fenol cloroformo, para las muestras de heces como a continuación se indica (Camacho-García, 2013):

Se centrifugó la muestra a  $100 \times g$  a  $4^\circ\text{C}$  por 5 minutos para la eliminación de las partículas fecales de mayor tamaño, se tomó una alícuota del sobrenadante de 200  $\mu\text{L}$  y se centrifugó a  $11\,269 \times g$  a  $4^\circ\text{C}$  por 5 minutos, se realizaron dos lavados empleando solución salina estéril 0.85 % para la eliminación de detritos e inhibidores que pudieran afectar tanto la extracción de DNA como la reacción de PCR. Se descartó el sobrenadante, se colectó el sedimento para la extracción de DNA y posteriormente se siguió el método de fenol – cloroformo.

##### **7.4.2.1. Fenol – Cloroformo**

La técnica de extracción del DNA por Fenol – Cloroformo se describe a continuación (Conde *et al.*, 2006).

---

Se adicionó 200  $\mu\text{L}$  de la muestra inoculada en un microtubo adicionando una alícuota de 900  $\mu\text{L}$  de PBS estéril 10X, se homogeneizó la muestra en vortex, se centrifugó a 100 x  $g$  por 2 minutos para la eliminación de dendritos presentes en la muestra, una vez centrifugada se colectó el sobrenadante y se transfirió a otro tubo limpio, se centrifugó a 11 269 x  $g$  durante 5 minutos, para la formación de un botón de células, se realizaron 2 lavados con 1000  $\mu\text{L}$  de PBS 10X estéril, el botón resultante se resuspendió en 500  $\mu\text{L}$  de agua estéril y se adicionó 10  $\mu\text{L}$  de SDS (Dodecilsulfato de sodio) al 10 %.

Se dejó incubar 10 minutos a 100  $^{\circ}\text{C}$ , después de la incubación los tubos se enfriaron a temperatura ambiente, se realizaron 2 lavados con 500  $\mu\text{L}$  de fenol cloroformo 1:1 colectando la fase acuosa, se transfirió a un tubo limpio donde se realizó la precipitación del DNA con 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol dejándolo toda la noche a  $-20^{\circ}\text{C}$  y finalmente se resuspendió en 100  $\mu\text{L}$  de agua inyectable, el DNA se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ , hasta su uso

#### **7.4.3. Cuantificación del DNA**

Para la cuantificación de DNA se realizó una dilución 1:25 de cada uno de los DNA extraídos de las muestras. La concentración y pureza del DNA metagenómico se evaluó en un espectrofotómetro AmpliQuant AQ-07 a una longitud de 260 nm, teniendo en cuenta que una unidad de densidad óptica (1 D. O.) equivale a 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de DNA

#### **7.4.4. Estandarización de la PCRm**

Con el DNA metagenómico obtenido de la muestra de heces se procedió a realizar la PCRm previamente estandarizada con cepas tipo, (empleando las condiciones e iniciadores mostrados en los cuadros 14,15 y 16), agregando 1.5  $\mu\text{L}$  de BSA (por sus siglas en inglés *Bovine Serum Albumin*) a una concentración de 0.4 % a cada muestra, modificando el volumen de agua de 23.3 a 21.7  $\mu\text{L}$ , para un volumen final de la mezcla de 50  $\mu\text{L}$ .



---

La demostración de los amplicones se realizó como se mencionó en el apartado 7.3.4 a partir de este experimento se empleó el reactivo SYBR Green™ Bio-Rad para su observación en el documentador de geles y posterior demostración de los amplicones.

#### **7.4.5. Evaluación de la sensibilidad de la PCRm**

En la evaluación de la sensibilidad de la PCRm se prepararon suspensiones bacterianas en solución salina al 0.8 % de las cepas tipo de *A. hydrophila* ATCC 7966<sup>T</sup> y *Y. enterocolitica* ATCC 23715<sup>T</sup>. Con estas suspensiones, por separado, se realizaron diluciones y se ajustó a  $1 \times 10^8$  células por mL, y a partir de estas se obtuvieron diluciones decimales hasta  $1 \times 10^5$  células por mL, con las suspensiones bacterianas se tomó de cada una 500  $\mu$ L se adicionaron a 500  $\mu$ L de la muestra de heces, de cada tubo se extrajo el DNA por el método Fenol – Cloroformo. El DNA obtenido se utilizó para realizar una PCRm, que se llevó a cabo bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Los amplicones obtenidos se observaron mediante un gel de electroforesis, como se describió en el apartado 7.3.4.

La sensibilidad se determinó seleccionando la última dilución en la que se observaron los amplicones del tamaño esperado (Camacho-García, 2013).

### **7.5. PCRm aplicada a las muestras diarreicas**

#### **7.5.1. Recolección y manejo de las muestras**

La PCRm se aplicó a un total de 81 muestras. 50 muestras diarreicas de pacientes con diagnóstico de gastroenteritis viral proporcionadas por el InDRE y recolectadas del 1 de julio al 31 de octubre del 2014 y 31 muestras diarreicas del área de hematología del HECMNR de la Ciudad de México, del 16 febrero al 12 de mayo del 2016.

Ambas muestras se recolectaron en frascos estériles los cuales se analizaron en el laboratorio de Bacteriología Médica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Cada muestra fue procesada en condiciones asépticas tomando 200  $\mu$ L para la

---

extracción del DNA metagenómico mediante la técnica de fenol – clororformo como se describió en el apartado 7.4.2.1.

### **7.5.2. PCRm con DNA metagenómico de las muestras diarreicas**

Con el DNA metagenómico obtenido de cada muestra diarreica, se llevó a cabo la PCRm estandarizada para la detección de *Y. enterocolitica* y *Aeromonas* spp., bajo las condiciones previamente descritas en los cuadros 15 y 16, con la adición de 1.5 µL BSA al 0.4 %, después de la amplificación se llevó a cabo la demostración de los amplicones, como se describió en el apartado 7.3.4.

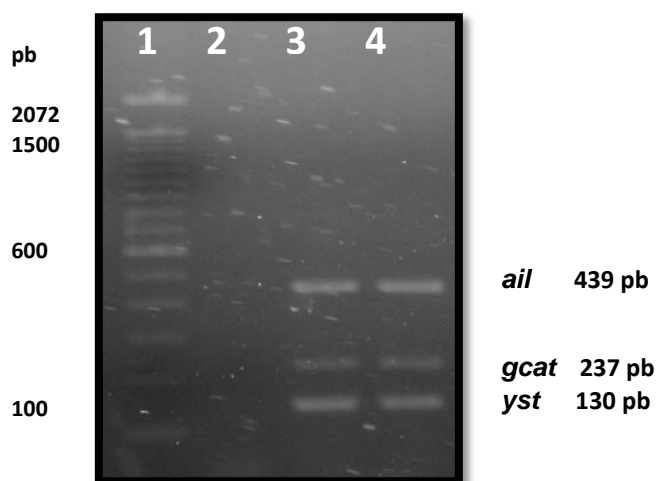
---

## 8. Resultados

### 8.1. PCRm con cepas tipo

A partir de la extracción del DNA de las cepas tipo de *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966<sup>T</sup> y *Yersinia enterocolitica* ATCC 23715<sup>T</sup> se llevó a cabo la PCRm.

La PCRm mostró que bajo las condiciones propuestas por Hernandez-Cortez *et al.*, 2013, los tres pares de iniciadores amplificaban exitosamente y la temperatura de alineamiento fue a 55 °C. El resultado obtenido de dicho experimento se muestra en la figura 6.



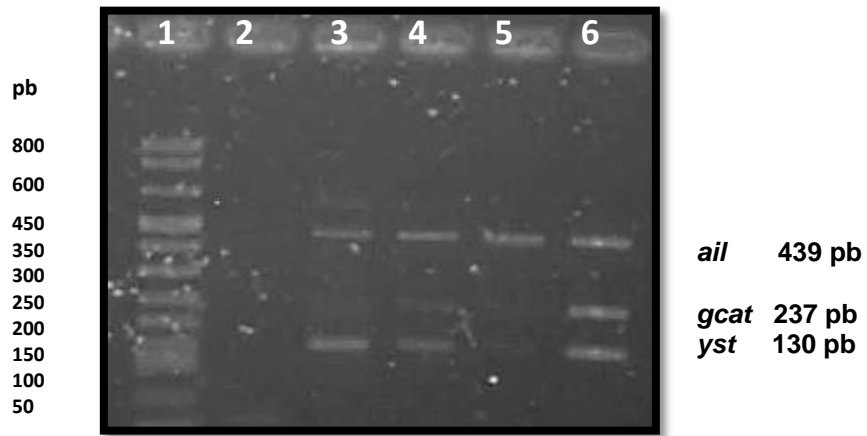
**Figura 6. Electroferograma de la amplificación de los genes *ail*, *gcat* y *yst* por PCRm de *Yersinia enterocolitica* ATCC 23715<sup>T</sup> y *Aeromonas* spp., ATCC 7966<sup>T</sup>. Carril 1. Marcador de talla molecular de 100 pb. Carril 2. Control negativo. Carril 3. PCRm *Y. enterocolitica* - *A. hydrophila*. Carril 4. PCRm de *Y. enterocolitica* - *A. hydrophila*. Alineamiento a 55 °C**

#### 8.1.1. PCRm de cepas tipo en gradiente de temperatura.

Debido a que los iniciadores de *Y. enterocolitica* y de *Aeromonas* spp., tienen diferente temperatura de fusión ( $T_m$ ) entre 55 °C y a 56 °C respectivamente se buscó confirmar la amplificación óptima de los tres pares de iniciadores utilizando un gradiente de temperatura desde 50 °C hasta 60 °C, obteniendo la temperatura óptima a 55 °C, mientras que a 50 °C la amplificación tubo bajo rendimiento, no

---

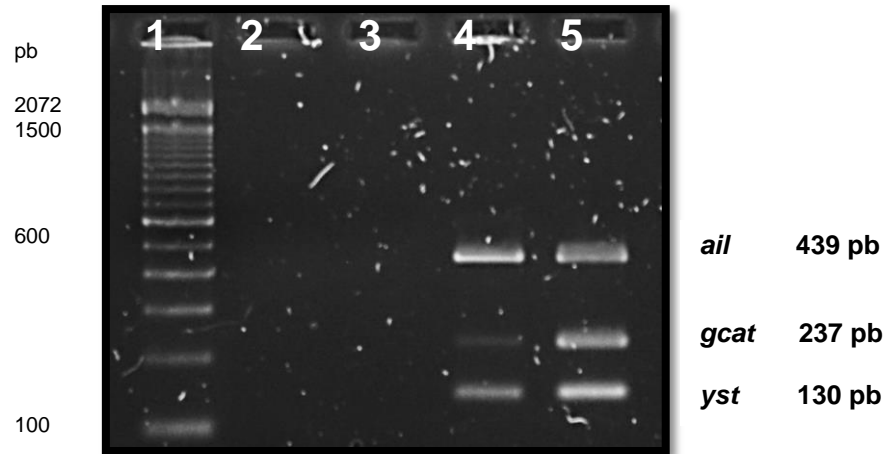
observándose los 3 amplicones, y a 60 °C no se obtuvo una señal de amplificación de los tres genes esperados, como se muestra en la figura 7.



**Figura 7 Electroferograma de los amplicones *ail*, *gcat* y *yst* por PCRm en gradiente de temperatura, a partir de cepas tipo.** Carril 1. Marcador de talla molecular de 50 pb; Carril 2. Control negativo; Carril 3. PCRm 50 °C; Carril 4. PCRm a 55 °C; Carril 5. PCRm a 60 °C; Carril 6. Control de PCRm a 55 °C.

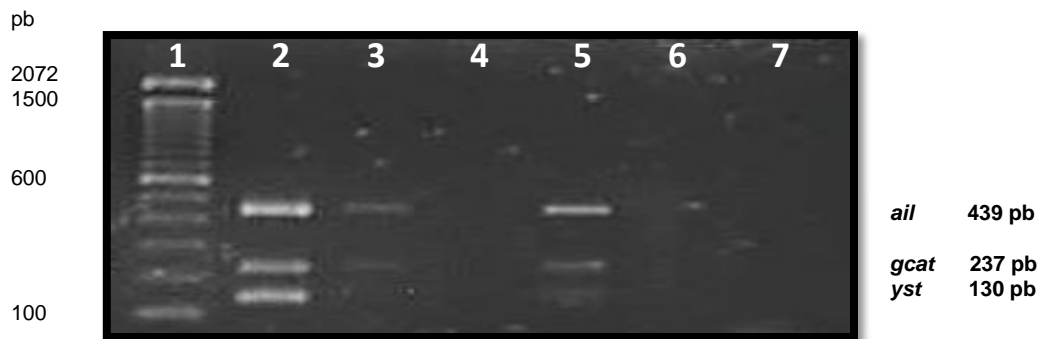
## 8.2. Estandarización de la PCRm con muestras de heces inoculadas intencionalmente

Una vez determinada la temperatura óptima de los iniciadores correspondientes a los genes buscados se realizó la estandarización de la PCRm con una muestra de heces inoculada intencionalmente con las cepas de *A. hydrophila* ATCC 7966<sup>T</sup> y *Y. enterocolitica* ATCC 23715<sup>T</sup>. Con la obtención del DNA metagenómico a partir de la técnica fenol - cloroformo (figura 8).



**Figura 8. Electroferograma de la PCRm con DNA obtenido por el método fenol – clororformo, en muestra inoculada con cepas tipo.** Carril 1. Marcador de talla molecular de 100 pb; Carril 2. Control negativo; Carril 3. PCRm sin inoculo; Carril 4. PCRm con inoculo; Carril 5. Control positivo de PCRm.

A partir de la obtención de la PCRm de heces inoculadas intencionalmente con las cepas tipo se decidió adicionar sangre en las muestras de heces, para simular un proceso diarreico con sangre ya que estos microorganismos pueden causar cuadros disentericos (figura 9).



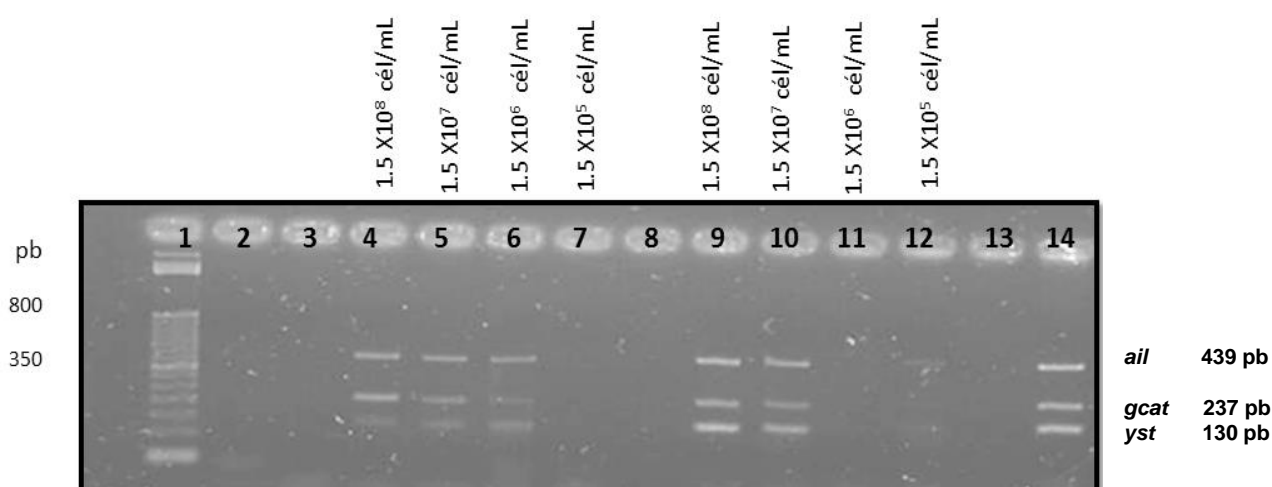
**Figura 9. Electroferograma de la PCRm con el DNA obtenido por el método fenol – clororformo, en muestra inoculada con cepas tipo y sangre.** Carril 1. Marcador de talla molecular 100 pb; Carril 2. Control positivo de PCRm; Carril 3. PCRm con inoculo y 10 µL de sangre; Carril 4. Vacío; Carril 5. PCRm con inoculo y 5 µL de sangre; Carril 6. PCRm sin inocular; Carril 7. Control negativo

### 8.3. Sensibilidad de la PCRm

Al observarse que en una concentración de  $1 \times 10^8$  células/mL la reacción de PCRm se veía inhibida y en las concentraciones menores se observaban los amplicones esperados se realizó un cambio en la mezcla de reacción del cuadro 15,

disminuyendo la cantidad de DNA de 5  $\mu\text{L}$  a 3  $\mu\text{L}$ , modificando el volumen del agua de 21.7 a 23.7  $\mu\text{L}$  para mantener el un volumen final de la mezcla de 50  $\mu\text{L}$ , y los amplicones obtenidos se observaron mediante un gel de electroforesis (como se describe en el apartado 7.3.4).

En el ensayo realizado para la determinación de la sensibilidad analítica mostró que se pueden detectar hasta  $1.5 \times 10^6$  células/mL sin sangre y  $1.5 \times 10^7$  células/mL con sangre, con el protocolo establecido de inoculación de una muestra de heces (figura 10).



**Figura 10. Electroferograma de la sensibilidad analítica de la PCRm estandarizada.** Carril 1. Marcador de talla molecular 100 pb; Carril 2. Control negativo; Carril 3 PCRm sin inocular; Carril 4 – 7 PCRm con diluciones seriadas del DNA 1:1, 1: 10, 1: 100, 1:1000 muestra con cepas tipo y sin sangre; Carril 9 – 12 PCRm con diluciones seriadas del DNA 1:1, 1: 10, 1: 100, 1:1000 muestra con cepas tipo y con sangre; Carril 8 y 13 vacíos; Carril 14 PCRm control positivo.

## 8.4. PCRm aplicada a muestras diarreas

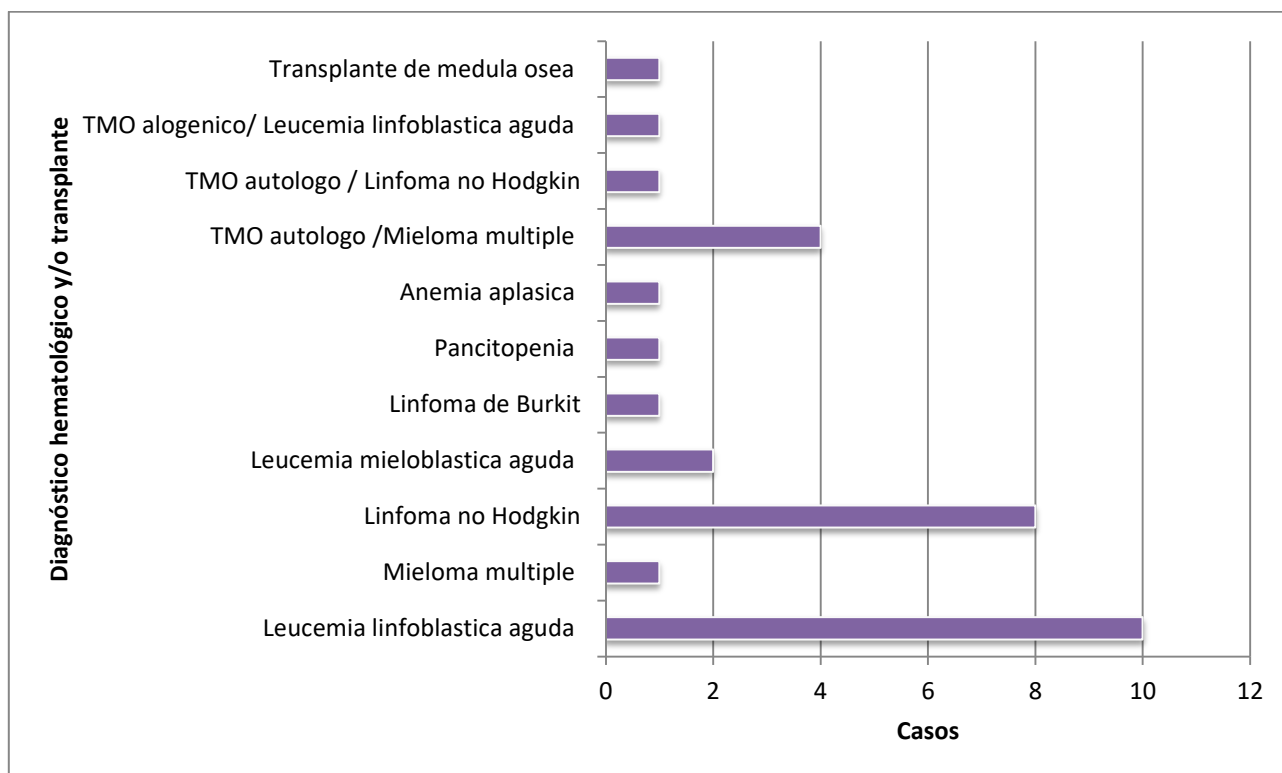
### 8.4.1. PCRm con muestras de heces diarreas provenientes del InDRE

Con el DNA metagenómico de 50 muestras proporcionadas por el InDRE se realizó la PCRm con las condiciones de reacción establecidas. El resultado obtenido fue negativo para estas muestras ya que no se detectó la presencia de los genes *ail* (439 pb), *yst* (130 pb) y *gcat* (237 pb).

---

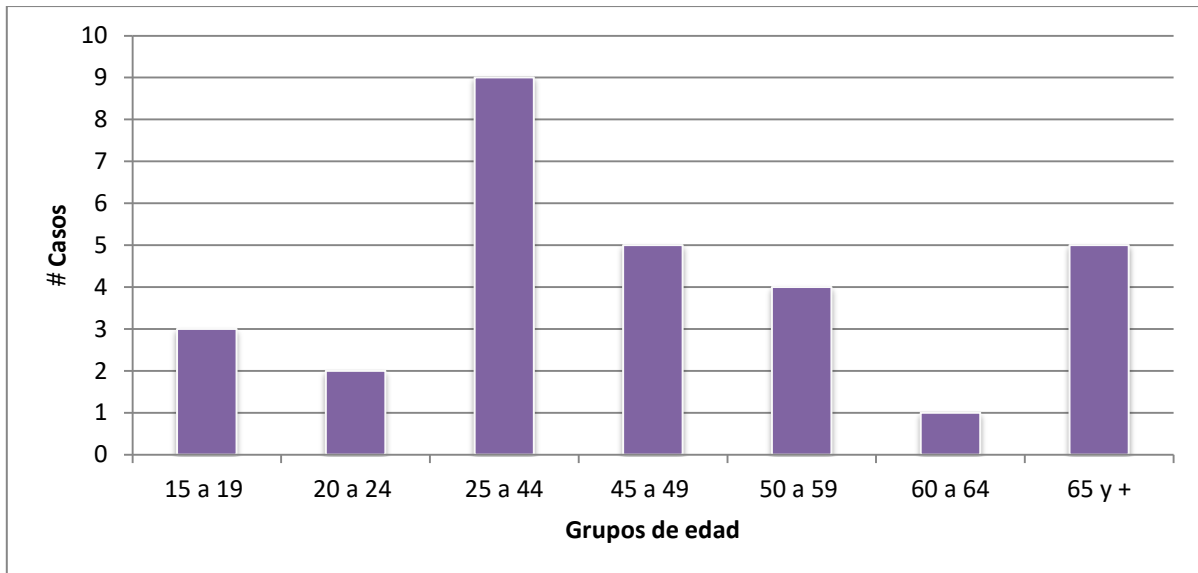
#### 8.4.2. Aplicación de la PCRm con muestras diarreas provenientes del Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional la Raza.

Se recolectaron 31 muestras diarreas de pacientes del HECMNR con diversos diagnósticos hematológicos que firmaron un consentimiento informado (figura 11).



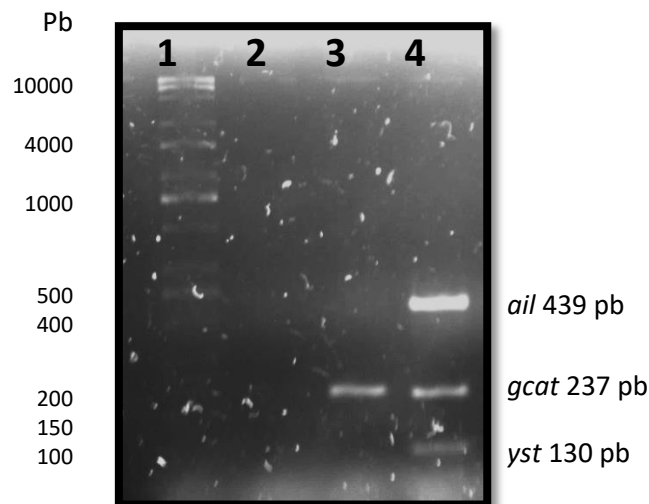
**Figura 11. Diagnóstico hematológico y / o trasplante de los 31 pacientes del HECMNR.**

Estos pacientes presentaron un cuadro diarreico, donde el grupo de edad más afectado estaba entre los 25 – 44 años de edad; le siguieron los grupos de 44 – 49 años y los mayores de 65 años (figura 12).



**Figura 12. Casos de diarrea con base en el grupo de edad de las 31 muestras de pacientes del area de hematología y trasplantes del HECMNR.**

Después de aplicar la PCRm con el DNA metagenómico obtenido de las 31 muestras, se determinó la presencia de *Aeromonas* spp., en una de las muestras, se detectó la presencia del gen *gcat* (237pb), en ninguna muestra se demostró la presencia del los genes *ail* (439 pb) y *yst* (130 pb) correspondientes a *Y. enterocolitica* (figura 13).



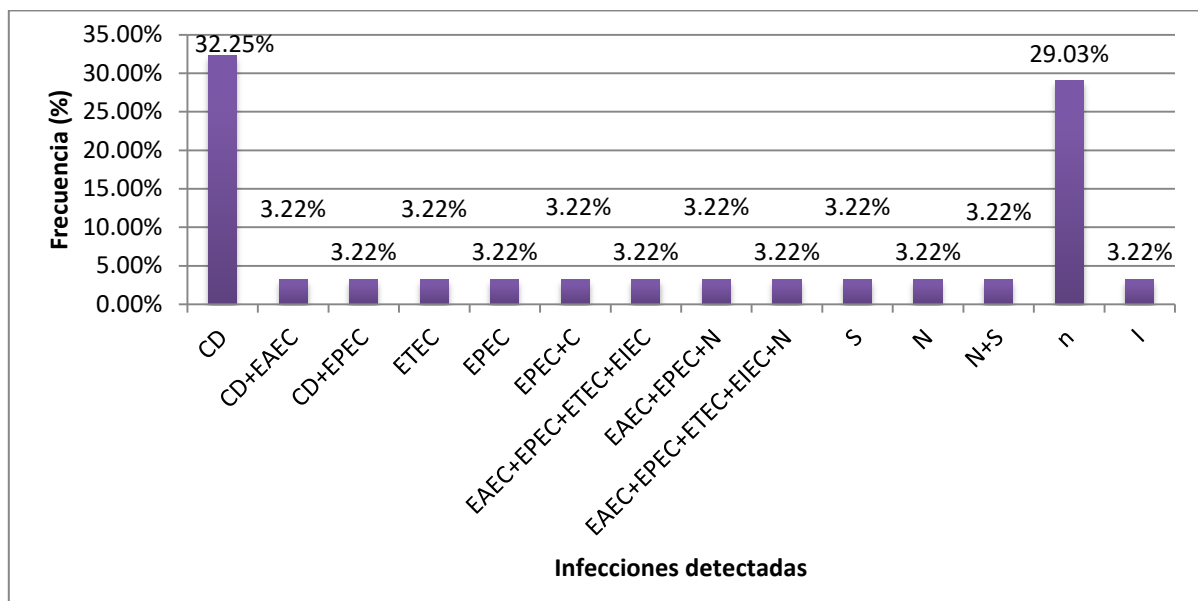
**Figura 13. Electroferograma de la PCRm con DNA metagenómico de muestra clínica positiva para *Aeromonas* spp.** Carril 1. Marcador de talla molecular de100 pb; Carril 2. Control negativo; Carril 3. PCRm con DNA metagenómico de muestra clínica; Carril 4 Control positivo.



## 8.5. Identificación con el sistema FilmArray

Las muestras del HECMNR fueron analizadas por el sistema FilmArray, en 16 muestras se demostró la presencia de bacterias (52 %), en 3 muestras se detectaron virus (10 %) y en 2 muestras se notó la presencia de diversos microorganismos (6 %), 9 muestras fueron negativas (29 %) y 1 muestra con resultado inválida (3.22 %).

El sistema FilmArray permitió conocer a otros microorganismos dentro de bacterias y virus como agentes causales de diarrea de las 31 muestras analizadas. En 10 muestras se confirmó la presencia de la toxina de *C. difficile* se detectó en 10 muestras (32.25 %), seguido por *E. coli* en conjunto con *C. difficile*, algún patotipo de *E. coli* u otra bacteria como *Campylobacter* o en combinación con un virus como Norovirus GI/GII en 8 muestras (25.8 %) y finalmente en 3 muestras (9.67 %) se demostró la presencia de Norovirus GI/GII y/o Sapovirus (figura 14). No se detectó *Aeromonas* spp., en estas muestras analizadas por el sistema FilmArray ya que este género no se encuentra integrado al panel GI incorporado a FilmArray.



**Figura 14. Microorganismos detectados por el sistema FilmArray.** CD= *C. difficile*, EAEC= *E. coli* enteroagregativa, ETEC= *E. coli* enterotoxigénica, EPEC= *E. coli* enteropatógena, C= *Campylobacter*, EIEC= *E. coli* enteroinvasiva, N= Norovirus GI/GII, S= Sapovirus, n= negativo, l= Inválida.

---

## 9. Discusión

La enfermedad diarreica es definida como un trastorno digestivo manifestado por un incremento en el volumen, fluidez y frecuencia en las deposiciones fecales, el cual provoca una escasa absorción de agua y nutrientes. Esta enfermedad representa un problema de salud pública a nivel mundial, produciendo su mayor impacto en la población infantil, debido a la deshidratación y desnutrición que genera (Albarado *et al.*, 2005).

Muchas de las diarreas son ocasionadas por diversos agentes etiológicos como: virus, bacterias y parásitos, estos microorganismos pueden estar presentes en agua y alimentos contaminados por falta de higiene en la preparación manejo y conservación. Esto conlleva a que en el mundo las enfermedades diarreicas agudas continúen siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad, principalmente entre las poblaciones con menor índice de desarrollo humano, en este sentido, México no es la excepción a pesar de los importantes avances que se han obtenido en últimos años en el control de estas enfermedades, continúan siendo la segunda causa de morbilidad, y se encuentran dentro de las 20 principales causas de mortalidad general y entre las primeras cinco causas de decesos en menores de cinco años. La Organización Panamericana de la Salud (OPS) considera que las enfermedades diarreicas constituyen un problema de salud pública en el mundo, dada la importancia de esta patología frecuente en niños (URL, 4; Cermeño *et al.*, 2008).

Uno de los mayores obstáculos en el diagnóstico de las infecciones gastrointestinales es el amplio número de patógenos virales, bacterianos y parasitarios asociados. La detección de estos microorganismos causantes de enfermedades diarreicas se realiza a través de pruebas como coprocultivos, enzimoimmunoanálisis o métodos moleculares. Los métodos moleculares son utilizados para la detección e identificación de microorganismos en general basándose en el estudio de las moléculas de DNA y RNA. La PCR es una reacción que ha sido la principal herramienta diagnóstica que ha alcanzado gran valor y versatilidad como técnica de análisis debido en parte, a su adaptabilidad y

---

---

aplicabilidad, posee un elevado poder de discriminación, es rápida y permite trabajar con un mayor número de muestras. Esta reacción consiste en la amplificación selectiva de una secuencia blanco flanqueada por secuencias cortas de polinucleótidos llamados iniciadores, una de sus variantes es la PCRm, reacción donde se consigue la amplificación simultánea de diferentes secuencias blanco en una sola reacción, dada la aplicabilidad de este método como herramienta para la detección de bacterias (Ratón, 2004; Flores & Herrera, 2005; Guillen & Lucho, 2011; Bolivar *et al.*, 2013).

El uso de estas técnicas en el estudio de las infecciones gastrointestinales, ha ampliado el número de patógenos detectados. Las técnicas de PCR y sus variantes aún no son empleadas en todos los laboratorios donde se realiza la búsqueda de enteropatógenos, tanto de microorganismos clásicos como de los microorganismos que no lo son. Lo anterior sugiere la necesidad de implementar en el laboratorio, métodos rápidos y eficientes para la detección del agente causal, que permitan la detección e identificación del microorganismo responsable del cuadro gastrointestinal. Sobre todo, para la detección de microorganismos de los cuales se desconoce la incidencia real con la que se encuentran involucrados, entre ellos *Aeromonas* spp., y *Y. enterocolitica* por mencionar 2 ejemplos (Flores & Herrera, 2005; Torrens *et al.*, 2015; Farfán *et al.*, 2016).

El género *Aeromonas* es un microorganismo descrito como autóctono del medio acuático, considerándolo agente causal de varias infecciones que pueden ocurrir tanto en personas inmunocompetentes e inmunocomprometidas; entre otros. Por otro lado, *Y. enterocolitica* se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, está reconocido como un patógeno importante que ocasiona una serie de infecciones que abarcan desde diarreas inespecíficas hasta afectaciones invasivas dependiendo de la cepa; también se han descrito cepas no patógenas. Los factores que pueden contribuir a desarrollar la enfermedad por esta bacteria son la dosis infectiva, factores genéticos, edad y condiciones inmunológicas del huésped. El número de casos de enfermedad gastrointestinal por *Aeromonas* o *Yersinia* no son reportados de manera obligatoria en el boletín epidemiológico de la Ciudad de México por lo que se

---

desconoce la prevalencia de ambos patógenos, esto debido a que su búsqueda no se lleva a cabo generalmente, o a que se desconoce su presencia como agentes patógenos intestinales (Paz *et al.*, 2004; Albarado *et al.*, 2005; Figueras & Beaz-Hidalgo, 2014; Molina-López *et al.*, 2015).

El objetivo principal del presente trabajo fue detectar a estos dos patógenos en muestras diarreicas ya que generalmente los agentes que se identifican son considerados como clásicos tales como: *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *E. coli*, *V. cholerae*, *C. jejuni* y en baja frecuencia *Y. enterocolitica*, mientras que el otro género de interés casi no es reportado como causante de enfermedad gastrointestinal, a pesar de que los miembros del género *Aeromonas* spp., se consideran enteropatógenos de reciente reconocimiento en diferentes áreas geográficas incluyendo México (Castro-Escarpulli *et al.*, 2015).

Es necesario comenzar a estandarizar una técnica de PCR que se vaya a emplear con propósitos diagnósticos, con cepas de referencia las cuales se saben poseen los genes con los que se pretende identificar a los microorganismos de interés, en el presente trabajo a partir de placas con gelosa BHI se recuperaron las cepas tipo de *A. hydrophila* ATCC 7966<sup>T</sup> y *Y. enterocolitica* ATCC 23715<sup>T</sup>, cepas que están certificadas y aseguran la calidad de los resultados en los ensayos realizados. A partir de éstas cepas se realizaron las suspensiones bacterianas y se obtuvo el DNA bacteriano mediante la matriz de purificación comercial InstaGene™ Matrix que es una técnica rápida que demanda poco tiempo y en donde se obtiene una concentración de DNA y pureza adecuados, el valor de pureza obtenido se encuentra dentro del rango aceptable que es de 1.8 a 2 (Conde *et al* 2006; URL, 19; URL, 20).

La realidad del éxito en la implementación de la PCR para la identificación de microorganismos depende, entre otros factores, como la elección correcta de la secuencia blanco, que debe permitir la identificación del microorganismo de interés, independientemente de la presencia de otras fuentes de DNA procedente de microorganismos concomitantes o de la misma muestra (Flores & Herrera, 2005).

---

En el caso de la búsqueda simultánea de ambos microorganismos, para la detección de *Y. enterocolitica* se utilizaron dos pares de iniciadores, uno para el gen *ail* de 439 pb, el cual es un gen que participa en adhesión e internalización, una adhesina que se detecta principalmente en las cepas patógenas y el gen *yst* de 130 pb el cual es un gen que codifica para una enterotoxina termoestable que daña el intestino, el epitelio y facilita el acceso microbiano al intestino y que se encuentra presente en todas las cepas. La patogenicidad del género está relacionada con un plásmido de virulencia de 70 kb, llamado plásmido pYV y este se encuentra regulado por proteínas codificadas en el cromosoma (Molina-López., 2015).

Para el género de *Aeromonas* spp., se realizó la detección mediante el gen *gcat* (Glicerofosfolipido colesterol acetil transferasa) de 237 pb, un gen que se encuentra en todas las especies de éste (Chacón *et al.*, 2003; Thisted-Lambertz & Danielsson-Tham, 2005; Hernández-Cortez, 2012; Castro-Escarpulli *et al.*, 2015; Terech-Majewska *et al.*, 2016).

El diseño de los iniciadores es un punto clave para que la reacción sea estrictamente específica y permita detectar solamente al patógeno buscado, sobre todo cuando se utilizan en una PCRm, debido a esto los amplicones resultantes deben ser de tamaños diferentes, además de que debe cuidarse que los iniciadores alineen correctamente a temperaturas similares, ésta generalmente oscila entre 50-60 °C. Los iniciadores utilizados en esta investigación fueron previamente diseñados y evaluados por Hernández-Cortez en 2012 (*ail* y *yst*) y (*gcat*) por Chacón en 2003. En el 2013 Camacho-García, evalúa la sensibilidad y especificidad de los iniciadores *ail* y *yst* ya que provienen de una PCRm para la detección de los principales enteropatógenos (Millar *et al.*, 2007; Tamay de Dios *et al.*, 2013).

Después de la estandarización de la PCRm con las cepas tipo, se procedió a estandarizar la PCRm a partir de DNA obtenido de una muestra de heces, que fue inoculada intencionalmente con cepas tipo de *Y. enterocolitica* ATCC 23715<sup>T</sup> y *A. hydrophila* ATCC 7966<sup>T</sup>, con un inóculo correspondiente de  $1.5 \times 10^8$  células/mL, cantidad mínima excretada en un proceso diarreico ocasionado por *Aeromonas* spp.,

---

y la cantidad intermedia en un proceso diarreico producido por *Y. enterocolitica*. Es importante elegir la técnica de extracción de DNA adecuada para una muestra más compleja debido la importancia que tiene la calidad del DNA molde para el éxito de la PCR y evitar que esté degradado o presente impurezas que puedan inhibir la reacción de PCR (Fuentes *et al.*, 2009).

Se han diseñado gran cantidad de protocolos con la finalidad de obtener DNA de pureza y concentración adecuado, así como garantizar la eliminación de inhibidores. Es un paso fundamental en las técnicas moleculares y depende del organismo de estudio, el tejido disponible, los recursos económicos y el tiempo para obtener los resultados. Dentro de los métodos recomendados para extraer DNA a partir de una muestra clínica se encuentra la técnica de Fenol – Cloroformo. Con el cual se obtiene una adecuada concentración de material genético, presentando resultados reproducibles. Por lo anterior, se tomó esta técnica debido a que fue probada en un trabajo previo realizado por Camacho-García en 2013, en el cual se utilizaron 5 técnicas diferentes de extracción de DNA en muestras de heces inoculadas intencionalmente, los resultados mostraron que fue la segunda mejor opción para obtener DNA de una muestra de este tipo, con base en la concentración y pureza del DNA; dicho resultado permitió elegirla como la mejor opción en este protocolo. La técnica de Fenol-Cloroformo permitió obtener un DNA con un valor de pureza dentro del rango aceptable de 1.8 a 2, sin embargo, por medio de esta técnica no se eliminan completamente los inhibidores presentes en la materia fecal (Conde *et al.*, 2006; Menghi *et al.*, 2006; Sandoval-Arias, 2014; URL, 20; URL, 21; URL, 22;).

Al obtener el DNA directamente de una muestra clínica, este material genético puede contener algunos compuestos que pueden inhibir la reacción de PCR. La repercusión de estos compuestos es la obtención de resultados falso-negativos, pueden eliminarse empleando polimerasas adecuadas, uso de membranas, o agentes inhibidores de inhibidores de la PCR, como es el caso de la BSA, gp32, polietilenglicol, dimetilsulfóxido, entre otros. En esta PCRm se utilizó como inhibidor de inhibidores a la albúmina sérica bovina (BSA). Se realizó la adición de la BSA en la mezcla de reacción, puesto que en la práctica cuando se utiliza la PCR para el

---

análisis de DNA proveniente de heces, la eficiencia de amplificación disminuye significativamente debido a la presencia de sustancias inhibidoras, como en el caso de las heces que contienen polisacáridos complejos, sales biliares y bilirrubina. Adicionalmente, en sangre se encuentran como inhibidores el grupo hemo, inmunoglobulina G (Ig G), hemoglobina, lactoferrina y con la adición de BSA, disminuye la probabilidad de inhibición, por la presencia de estas sustancias mediante la unión a ellos además, se puede unir a compuestos fenólicos evitando la inhibición de la PCR e incrementa y facilita la eficiencia de la reacción, la BSA actúa como una proteína captadora de iones y otros inhibidores de la Taq polimerasa, permitiendo la amplificación de los genes como se mostró en la figura 9 y 10 (Lantz *et al*, 1997; Moreira, 1998; Rådström *et al.*, 2003; Asuar, 2007; Sandoval-Arias, 2014; URL, 23; URL, 24; URL, 25).

Se realizaron suspensiones de *Aeromonas* spp., y *Y. enterocolitica* a partir del inóculo  $1 \times 10^8$  células/mL y posteriormente se realizaron diluciones de la concentración inicial. En la dilución de  $1 \times 10^8$  células/mL, se presentó un problema para el desarrollo de la PCRm debido a la gran cantidad de DNA detectado (1099.709 ng/ $\mu$ L). El cual cuenta de igual forma con una gran cantidad de inhibidores y este inhibidor de inhibidores utilizado no pudo actuar eficientemente en la reacción de PCRm al no captar a estos inhibidores en una cantidad adicionada de DNA de 5  $\mu$ L, por otro lado otro de los factores que pueden afectar la reacción de PCR es la concentración de DNA, se observó que a grandes concentraciones de DNA se afecta la reacción por lo que se decidió disminuir el volumen de DNA inicial que era de 5 a 3  $\mu$ L obteniendo un resultado favorable.

Después de la estandarización de la PCRm se determinó la sensibilidad realizando suspensiones de *Aeromonas* spp., y *Y. enterocolitica* para obtener las diferentes diluciones con las que fue inoculada la muestra, observando que con la cantidad establecida de DNA los tres amplicones se detectaron en este ensayo en la muestra de heces adicionada de cepas tipo de *Aeromonas* spp., y *Y. enterocolitica* de  $1 \times 10^6$  células/ g de heces correspondiente a la dilución ( $10^{-2}$ ), y en la muestra de heces adicionada de cepas tipo de *Aeromonas* spp., y *Y. enterocolitica* más sangre de

---

1x10<sup>7</sup> células/ g de heces correspondiente a la dilución (10<sup>-1</sup>) de heces. En el estudio realizado por Camacho – García., en 2013, se detectó hasta 1x10<sup>7</sup> células/ g de heces, por otro lado Hegde *et al.*, en 2012 reportó una sensibilidad de 10<sup>3</sup>, 10<sup>2</sup> UFC/mL por ensayo. Esto demuestra la complejidad que representa la implementación de una PCRm a partir de heces (URL 26; Asuar, 2007; Hegde *et al.*, 2012; Camacho – García, 2013).

La sensibilidad obtenida en el presente trabajo, se comparó con la cantidad de bacterias excretadas por gramo de heces en un proceso diarreico en donde para *Y. enterocolitica* es de 10<sup>5</sup> – 10<sup>9</sup> UFC/g de heces y para *Aeromonas spp.*, es de 10<sup>8</sup> – 10<sup>9</sup> UFC/g de heces. Considerando que la PCRm no es capaz de detectar a estos patógenos cuando se encuentren en una cantidad menor a 1x10<sup>6</sup> células/g de heces, para el caso de *Y. enterocolitica* que se puede encontrar en una concentración de 10<sup>5</sup> UFC/g, se puede utilizar como alternativa viable la realización de un enriquecimiento en frío, donde las heces se pueden inocular en agua peptonada a 4 °C, esto para obtener una mejor sensibilidad (Aguilar-Prieto *et al.*, 1998; Rodríguez *et al.*, 2000; Camacho-García, 2013).

Estandarizada la PCRm, se aplicó a muestras donadas por el InDRE (N=50) procedentes de diferentes estados de la República Mexicana recolectados durante el periodo del 1 de julio al 30 de octubre del 2014, fueron previamente reportados como negativos a virus (Rotavirus, Norovirus, Sapovirus, Astrovirus y Adenovirus entéricos). Por lo tanto, se realizó la búsqueda de *Y. enterocolitica* y *Aeromonas spp.*, como posibles enteropatógenos causantes de la diarrea, se aplicó la PCRm y no se detectó la presencia de ninguno de los patógenos buscados, estos resultados pueden deberse a que, en México, el Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) estimó que los médicos recetan antibióticos al 70 % de los pacientes con diarreas agudas sin una identificación previa del patógeno involucrado. A pesar de que el uso de antibióticos ha sido foco de variada investigación en México, es poca la información publicada que resuma la situación actual del país, o bien que describa la respuesta y uso de estos, ya que en algunos casos el uso inadecuado de antibióticos incluye la prescripción excesiva, selección inadecuada de tratamiento (tipo, dosis,



---

curso) por médicos y personal de las farmacias, así la autoprescripción y falta de adherencia al tratamiento por parte de los consumidores. En relación con el abuso de antimicrobianos, un trabajo de la Semana de Gastroenterología de la Unión Europea, de un grupo de la Universidad de Graz en Austria notificó dos casos de enterocolitis con diarrea grave hospitalizados posterior al uso de antibióticos, en la unidad de terapia intensiva. En ambos casos, el cuadro diarreico inició aproximadamente un mes después de recibir antimicrobianos (penicilinas, cefalosporinas, fluoroquinolonas, meropenem, linezolid y caspofungina), así como esteroides. Presentaron en forma inicial diarrea masiva e intratable, sin conseguir identificar con los estudios habituales patógeno alguno. Debido a la gran prevalencia y las altas tasas de morbilidad y mortalidad, la identificación de casos de diarrea infecciosa es todavía un reto para los clínicos; ya que la prescripción inadecuada de antibióticos en relación con EDA, en el sector público y privado, se reporta que entre un 60 y 80% de los pacientes reciben antibióticos, cuando en realidad su uso se justifica en tan sólo en 10 a 15 % de los casos. Por otro lado, se encuentra la automedicación el cual es un problema real en la mayoría de los países latinoamericanos, donde además de la propia cultura y tradición de sus habitantes, las facilidades para conseguir medicamento sin prescripción médica y la ingesta de este en niños puede agravar la enfermedad.

En el caso de la diarrea requiere en mayor medida el uso de sales de rehidratación oral y mantener la alimentación con dieta blanda (Dresler *et al.*, 2008; Bielsa – Fernández, 2011; Quiñonez-Landazuri & Quinancela-Alvarado, 2014; Díaz-Quiñonez., 2015).

En el caso de las muestras de heces diarreicas procedentes de pacientes del Hospital de Especialidades del CMN la Raza del área de hematología (n=31), al aplicar la PCRm, se detectó la presencia de *Aeromonas* spp., (n=1). Corroborando su presencia con la detección de 2 genes el *aer/hem* que codifica para una hemolisina, y el gen *lafA*, que codifica para una proteína estructural del flagelo. Ambas proteínas consideradas como factores putativos de virulencia de *Aeromonas* spp., detectándose la presencia del gen *aer/hem*, pero no del gen *lafA*, esto a que algunas

---

especies no presentan este gen. En muchos de los casos de diarrea asociados con *Aeromonas* pueden pasar desapercibidos, pues muchas veces no se realiza el adecuado estudio microbiológico de las heces y esta pudiera ser una de las razones por las que no se notifican los casos de brotes de diarrea causados por este microorganismo. (Arteaga-Garibay, 2009; Bravo *et al.*, 2012; Vara-Brenes *et al.*, 2014).

En México, generalmente no se lleva a cabo el reporte obligatorio de casos de infección causados por *Aeromonas*, por lo tanto se desconoce la incidencia y probablemente pueda estar sobreestimado. Éste microorganismo ha sido reportado sobre todo en niños menores de 2 años detectándose una mayor frecuencia de *Aeromonas* en los meses de verano. En otro estudio por Barnes *et al.*, en 1999 detectaron *Aeromonas* spp., con una frecuencia de 5 % investigación realizada en México, sobre la etiología de la gastroenteritis en niños hospitalizados (Guevara *et al.*, 2002; Albarado *et al.*, 2005).

Durante los últimos 25 años, el género *Aeromonas* ha recibido una atención creciente como agente emergente de enfermedades transmitidas por alimentos, en España los datos del Centro Nacional de Epidemiología indican que este microorganismo ocupa el cuarto lugar entre las causas de enfermedades gastrointestinales de 1997 – 2006, ya que se investigó su presencia en 800 muestras de heces donde en 32 muestras se identificó al género *Aeromonas* con una frecuencia de 4 % en la mayoría de estas muestras se identificó que eran niños alimentados con leche materna (46.9 %). Debido a la naturaleza ubicua de *Aeromonas* spp., en alimentos crudos y agua, se ha argumentado que en infecciones polimicrobianas estas bacterias son colonizadores transitorios sin relación causal con la enfermedad, además que los múltiples patógenos pueden actuar sinérgicamente para producir diarrea (Pablos *et al.*, 2010).

Simultáneamente, las 31 muestras de heces diarreicas se analizaron con el sistema FilmArray donde se detecta la presencia de 22 patógenos entéricos tanto viral, bacteriano y parasitario, integrando en esta técnica la extracción y purificación del DNA directamente de la muestra, la PCRm y la detección de las regiones génicas

---

---

amplificadas. La detección de múltiples patógenos por la técnica de FilmArray ha tenido un fuerte impacto en el diagnóstico de las diarreas, principalmente por la rapidez de la obtención de resultados y el número de patógenos incluidos en una sola determinación. Pese a que el equipo detecta 22 patógenos, no realiza la detección de *Aeromonas* spp., por lo que no se puede corroborar la presencia de este microorganismos con este sistema, por otro lado, en el equipo se detectó a EAEC, EPEC, ETEC y EIEC (Farfán *et al.*, 2016; Pablos *et al.*, 2010).

Asimismo, no se detectó la presencia de *Y. enterocolitica* en ninguna de las muestras de heces diarreicas trabajadas, por PCRm ni por FilmArray, *Y. enterocolitica* se identifica como causa de enfermedad diarreica aguda en países fríos especialmente en invierno en Europa y Estados Unidos demostrándose bajos porcentajes de aislamiento en niños con EDA de países de América del Sur, Caribe y en el lejano Irán. Por lo tanto, se recomienda realizar un enriquecimiento en frío, por lo que las heces diarreicas se pueden inocular en regulador de fosfatos e incubar a 4 °C y aunque también es capaz de crecer a 25 y 37 °C. En un estudio realizado para ver la incidencia anual de diarrea aguda infantil en los países industrializados se estimó que *Y. enterocolitica* tiene una frecuencia de 1.5 % siendo uno de los microorganismos menos frecuente. En otro trabajo realizado por Monté *et al.*, en 1990, en una investigación con 1 300 niños menores de 5 años con EDA no obtienen aislamientos de *Y. enterocolitica* de ninguno de los pacientes estudiados a pesar de emplear medios altamente selectivos. En México, se realiza el hallazgo de este microorganismo en un niño con enfermedad diarreica aguda y para el 2007 en Cuba se localizó a 2 pacientes afectados por *Y. enterocolitica* uno de 4 años y el otro de 8 meses de edad, lo cual revela el predominio de las edades infantiles de (3 – 9 años) uno de los casos fue reportado en Noviembre y el otro caso en el mes de Febrero concordando el hallazgo de este microorganismo en meses invernales. Planteándose que *Y. enterocolitica* pasa desapercibido en los coprocultivos que se realizan tal como refiere Rodríguez *et al.*, en 2007. Como se mencionó anteriormente a la identificación con el sistema FilmArray en las 31 muestras tampoco se detectó la presencia de *Y. enterocolitica*, lo cual habla de una correlación de un 100 % entre la detección por molecular del sistema FilmArray y de la PCRm, debido a la baja

---

prevalencia de *Y. enterocolitica* en México (Grande *et al.*, 1998; Rodríguez & Vargas, 2000; Rodríguez *et al.*, 2000; Rodríguez *et al.*, 2007; Farfán, 2016).

Por otro lado, de las 31 muestras analizadas con el sistema FilmArray se obtuvieron 16 pacientes afectados por bacterias (52 %), seguido por 3 pacientes afectados por virus (frecuencia del 10 %), 9 pacientes con un cuadro diarreico en el cual no se detectó ningún microorganismo causante de la diarrea (frecuencia de 29 %) y 1 muestra con resultado inválido. Se observa que el principal patógeno detectado fue *C. difficile* (32.25 %), la diarrea asociada a este microorganismo constituye del 20 al 30 % de los casos es la primera causa de diarrea que se presenta y/o se asocia a enfermedades que favorecen la inmunosupresión produciendo una alteración en la microbiota del colon, creando condiciones propicias para la adquisición y/o proliferación de *C. difficile*, como factores de riesgo para esta infección se tienen el uso frecuente de antibióticos que alteran la microbiota normal del intestino, los pacientes mayores de 65 años, la hospitalización reciente y principalmente en este caso el estado de inmunosupresión (cáncer, quimioterapia y/o trasplante). En E.U.A., los datos del CDC (Centers for Disease Control and Prevention) muestran que los pacientes con diagnóstico de infección por *C. difficile* han aumentado de forma significativa, pasando de 31/100.000 casos en 1996 a 61/100.000 habitantes en el año 2003. En estudios realizados en España de forma anual muestran un incremento significativo en la prevalencia de *C. difficile* entre el período 1999-2007 fue de 3,9 a 12,2 casos/10.000 pacientes hospitalizados. Estos casos de diarrea asociada a *C. difficile* se han convertido en una importante causa de morbilidad y mortalidad. *C. difficile* es la principal causa de diarrea en pacientes adultos hospitalizados, en el 2013 las tasas de incidencia fue de hasta 228 casos/100.000 habitantes internados en hospitales y centros geriátricos.

En México, es tiempo de preocuparse, ya que en un hospital privado tienen la infraestructura económica para la realización de pruebas para la detección de las toxinas de *C. difficile*, sin embargo en los hospitales de atención pública y de servicios de salud menos del 10 % realizan dichas pruebas, y actualmente con el recorte económico hacia los laboratorios en el sector público, la mayor parte de los

---

---

casos de *C. difficile* no serán detectados. En un estudio realizado por Ramírez-Rosales *et al.*, en 2012, evaluaron la mortalidad asociada con infección por *C. difficile* en una serie de 66 casos de un hospital privado al norte de México, demostrando que la mortalidad por esta entidad puede ser cercana al 10 %, comparando dichos datos con los obtenidos en este trabajo se obtuvo que en el 32.25 % de las 31 muestras analizadas se detectó a *C. difficile* y a partir de esta frecuencia el 16.12 % de los casos fallecieron. Estas defunciones ocurrieron en personas hospitalizadas del área de hematología teniendo como antecedente que son pacientes inmunocomprometidos los cuales tienen un uso elevado de antibióticos de forma intrahospitalaria. Finalmente, mientras en otras partes del mundo es clara la situación emergente de la infección por *C. difficile* y se avanza en el conocimiento molecular o se plantean nuevas opciones de tratamiento, en México se desconoce la prevalencia y el comportamiento del microorganismo (Camacho-Ortiz, 2012; Remes-Troche, 2012; Perez *et al.*, 2013; Rodríguez-Prado *et al.*, 2013; Sabatt, 2015).

En las muestras de heces diarreicas donde no se encontró a ningún microorganismo (frecuencia del 29 %), probablemente está asociada a antibióticos, ésta se presenta en la mayoría de los pacientes mediante mecanismos tales como: alteraciones inducidas en el metabolismo como efecto de la alteración de la población bacteriana intestinal, efectos tóxicos y/o alérgicos sobre la mucosa intestinal. La mayoría de las veces se presenta durante el curso de la terapia antibiótica, en ocasiones combinaciones de tratamientos altamente eficaces, pero también altamente tóxicos. Los diferentes agentes tóxicos, la quimioterapia que tiene efecto sobre la mucosa intestinal lo que lleva a la malabsorción y alteraciones en el ritmo gastrointestinal. Manifestándose en forma de náuseas, vómito y diarrea. Dentro de los pacientes que se manejaron aparte de ser del área de hematología también algunos de ellos se les realizó un trasplante de medula ósea el cual es un procedimiento que induce grandes cambios a nivel gastrointestinal provocando trastornos en forma de diarrea prolongada. También en algunas de las muestras 8/31 (25.8 %) se detectó una infección mixta aislando: *E.coli* (algunos patotipos juntos), *C. difficile* (con ETEC o EPEC). *Campylobacter* spp., (con EPEC), Norovirus (con EAEC y EPEC o con

---

Sapovirus) y Sapovirus. Estas infecciones polimicrobianas o por patógenos resistentes, suelen presentarse microorganismos tanto anaerobios obligados como anaerobios facultativos (Brook, 2001). La diarrea infecciosa es causada por otros microorganismos donde se puede encontrar la presencia de virus, bacterias y parásitos, cuya capacidad de patogenicidad depende, en parte, del número de estos y de su capacidad de adherencia, enterotóxica, invasividad. Los agentes más frecuentes encontrados son: *E. coli* (patotipos), *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., representando más del 80 % de todas las infecciones entéricas, estos agentes pueden encontrarse como únicos productores de la diarrea o como una infección polimicrobiana, donde las muestras analizadas por el sistema FilmArray detectó diferentes infecciones de este tipo, las cuales en su mayoría están asociadas a co-infecciones. En la gastroenteritis viral, tres categorías virales han sido reconocidos como causa importante de gastroenteritis en humanos: rotavirus, adenovirus y virus de 20 – 30 nm de diámetro, los cuales incluyen el agente Norovirus, Calicivirus y Astrovirus principalmente, realizándose la comparación ya que este sistema utilizado identificó a los virus *Norovirus* y *Sapovirus* con una frecuencia de 9.67 %, los virus son pertenecientes a los *Calicivirus* humanos. Estos afectan más comúnmente a niños mayores de 5 años y adultos, son la principal causa de gastroenteritis vírica esporádica en adultos y de gastroenteritis vírica epidémica en todos los grupos de edad, produciéndose la infección todo el año. La afectación por estos virus se da en comunidades cerradas como hospitales, residencias de ancianos y colegios. Aumenta la frecuencia de Norovirus durante los meses de invierno y Sapovirus durante los meses de verano observando con esto que las muestras se recolectaron del 16 febrero al 12 de mayo del 2016 este periodo se encuentra todavía en temporada de invierno y eso demuestra el aumento de *Norovirus* sobre *Sapovirus*. A nivel global, los calicivirus constituyen la causa principal de brotes de cuadros diarreicos no bacterianos, originan el 18 % de los casos de gastroenteritis en el mundo. El Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav), indicó que este padecimiento es típico en personas de grupos cerrados barcos, hoteles, hospitales. En particular la diarrea es ocurrida en 700 millones de casos anuales y

---

muchos terminan en decesos; resaltando que en los hospitales los pacientes que han sido transplantados o que reciben quimioterapia están más comprometidos y aumenta la probabilidad de tener una afectación por *Norovirus* y pueden contraer este virus a través del consumo de alimentos, sin embargo también por el contacto entre persona (Romero-Cabello & Herrera, 2002; Gómez-Candela *et al.*, 2012; Sabatt, 2015; Farfan., 2016; URL, 23; URL, 24; URL, 27).

Si bien en la actualidad se han desarrollado nuevos métodos y combinaciones de técnicas que hacen del proceso de detección, un procedimiento menos engorroso, rápido, sensible y específico, sin embargo, el alto costo de los equipos y reactivos, limita su uso, al empleo de unos pocos con capacidad económica. La detección de *Aeromonas spp.*, y *Y. enterocolitica* en heces mediante PCRm ha demostrado mayor eficiencia, sensibilidad, rapidez que el método convencional ya que se realiza una búsqueda específica comparada con los métodos convencionales donde no se realiza la búsqueda rutinaria de estos microorganismos. Permitiendo con el uso de este tipo de métodos, incrementar el diagnóstico etiológico de las diarreas, y eventualmente, el control de estas infecciones (Pedraza *et al.*, 2014; Farfan *et al.*, 2016).

---

## 10. Conclusiones

- Con la metodología propuesta se logró estandarizar una PCRm para la búsqueda simultánea de los genes *ail*, *yst* y *gcat* de *Y. enterocolitica* y *Aeromonas* spp.
- La PCRm estandarizada mostró una sensibilidad analítica al definir su nivel mínimo de detección para la PCRm de la muestra sin sangre de  $1.5 \times 10^6$  células/g de heces y para la muestra con sangre fue de  $1.5 \times 10^7$  células/g de heces.
- No se encontró la presencia de *Y. enterocolitica* en las muestras diarreicas.
- Se detectó la presencia de *Aeromonas* spp., en una de las 81 muestras analizadas.
- A partir del panel GI del sistema FilmArray utilizado para las 31 muestras del Hospital de Especialidades del CMN la Raza, se confirmó la ausencia de *Y. enterocolitica*, correlacionando los resultados con la PCRm estandarizada.



---

## **11. Prospectivas**

Probar la PCRm estandarizada en una población dirigida a personas de la tercera edad y en niños menores de 2 años, aumentando el tamaño de la población.

Probar la PCRm estandarizada dirigida al periodo invernal.

Identificar otros enteropatogenos, empleando las 4 PCRm propuestas por Hernández-Cortez en 2012.

---

## 12. Referencias

### Artículos originales

- Albarado, L., Samper, I., & Guzmán, M. (2005). *Aeromonas* spp. as a Causal Agent of Acute Diarrhetic Syndrome in Children Under Six Years of Age. *Revista Kasmera*, 33(1).
- Aguilar-Prieto, P., Rodríguez, F., Cepero-Martín, J. (1998). *Agua y Salud.*, 3, (2).
- Arbeitskreis, B., Untergruppe, B., Blutassoziierter, K. (2000). *Yersinia enterocolitica*. *Infuse TherTransfus Med*, (27):58-66.
- Aguilera-Arreola, M.G., Carmona, A., Castro-Escarpulli, G. (2011). An in-house Multiplex PCR method to detect of putative virulence factors in *Aeromonas* species. *Brazilian Journal of Microbiology*, (42), 1314-1320.
- Aguilera-Arreola, M.G., Portillo-Muñoz, M.I., Rodriguez-Martínez, C., Castro-Escarpulli, G. (2012). Usefulness of Chromogenic CromoCen® AGN agar medium for the identification of the genus *Aeromonas*: Assessment of faecal samples. *Journal of Microbiological Methods* (90): 100-1204.
- Asuar, L.E. (2007). Guía práctica sobre la técnica de PCR. *Thought A Rev Cult Idea*. 110034 (11):517–40.
- Barnes, G., Uren, E., Bishop, R. (1999). Etiology of acute gastroenteritis in hospitalized children. *J. Clin. Microbiol*; 36: 133-138.
- Biatas, N., Kasper-Kiewicz, J., Radziejewska-Lebrecht, M., Arch, S. (2012). Bacterial Cell Surface Structures in *Yersinia enterocolitica*. *Arch Inmuno Ther Exp*. (60): 199–209.
- Bielsa-Fernández, M.V. (2011). *Diarrea Infecciosa*. *Revista de Gastroenterología de México* 2011; Supl.1 (76): 69-71
- Bolivar, A., Rojas, A., García-Lugo, P. (2013). PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. *AvanBiomed*. 3(1): 25–33.
- Bravo, L., Fernández, A., Ledo, J., Ramírez, M., Águila, A., Núñez, F. (2011). Caracterización fenotípica y factores de virulencia en cepas de *Aeromonas*

---

aisladas de pacientes con enfermedad diarreica en Cuba. *Rev Chil Infect.* 28 (2): 159-165.

- Bravo, L., Fernández, A., Nuñez, F.A., Rivero, L.A., Ramírez, M., Águila, A., Ledo, Y., Cruz, Y., Hernández, J. (2012). *Aeromonas* spp., asociada a enfermedades diarreica aguda en Cuba: estudio de casos y controles. *Rev. Chil Infect*; 29(1): 44-48
- Camacho-Ortiz, A. (2012). *Clostridium difficile*: ¿llegó el momento de empezar a preocuparnos? *Revista de Gastroenterología de México*, 77(4): 229-230
- Castro-Escarpulli, G., Aguilera-Arreola, M.G., Giono-Cerezo, S., Hernández-Rodríguez CH., Rodríguez-Chacon, M., Soler-Falgas, I., Aparicio-Ozores, G & Figueras-Salvat, MJ. (2002). El género *Aeromonas* ¿Un patógeno importante en México? *Enf Inf Microbiol*, (22): 206–216.
- Cermeño, J.R., Hernández de Cuesta, I., Camaripano, M., Medina, N., Guevara, A., Hernández, R.C. (2008). Etiología de diarrea aguda en niños menores de 5 años Ciudad Bolívar, Venezuela. *Revista de la sociedad Venezolana de microbiología*, (28): 55-60.
- Cerna, J. F., Nataro, J. P., & Estrada-Garcia, T. (2003). Multiplex PCR for detection of three plasmid-borne genes of enteroaggregative *Escherichia coli* strains. *Journal of clinical microbiology*, 41(5), 2138-2140.
- Cerro, A., Marquez, I., Guijarro, J.A. (2002). Simultaneous Detection of *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium psychrophilum*, and *Yersinia ruckeri*, three Major Fish Pathogens, by Multiplex PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 68, (10), 5177-5180.
- Chacón, M.R., Figueras M.J., Castro-Escarpulli G., Soler L y Guarro J. (2003). Distribution of virulence genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 84 (4), 269–278.
- Chen, P. E., Cook, C., Stewart, A. C., Nagarajan, N., Sommer, D. D., Pop, M., Sozhamannan, S. (2010). Genomic characterization of the *Yersinia* genus. *Genome biology*, 11(1), 1.

- 
- Conde, M., Revollo, S & Espada. (2006). A. Implementación de la Técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa en el diagnóstico de *Salmonella* y *Shigella* directamente en muestras fecales. Biofarbo, (14): 67-75.
  - Dreser, A., Wirtz, V.J., Corbett, K.K., Echániz, G. (2008). Uso de antibióticos en México: revisión de problemas y políticas salud pública de México. 50; 5480-5487.
  - Elizalde-Castañeda, P., Díaz-Aparicio, E., Hernández-Andrade, L., Jaramillo-Aranjo, J. (2001). Identificación y tipificación de biotipos y serotipos de *Yersinia enterocolitica*. Rev. Saúce Pública, 35 (4): 380–384.
  - Fábrega, S, Vila, J. (2012). *Yersinia enterocolitica*: Pathogenesis, virulence and antimicrobial resistance. Enferm Infecc Microbiol Clin, 30 (1): 20–32.
  - Farfán, M., Piemonte, P., Labra, Y., Henríquez, J., Candia, E y Torres, J. (2016). Panel FilmArray GI® en la detección de patógenos entéricos en deposiciones: experiencia preliminar. Rev Chilena Infectol, 33 (1): 89–91.
  - Fredriksson-Ahomaa., Stolle, A., Korkeala, H. (2006). Molecular epidemiology of *Yersinia enterocolitica* infection. FEMS Inmunol Med Microbiol, (47): 315-329.
  - Flores, T. G., & Herrera, R. A. R. (2005). Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. Sal Púb de Méx, 47(5), 388-390.
  - Fuentes, S., Condori, G., Luna, R. (2009). Detección del marcador Y-STR de uso forense DYS393 en heces humanas. Visión Científica. 1, 23
  - Guevara, D., Huamaní, C., Zerpa, R., Valencia, E., Guevara, G., Anaya, M. (2002). *Aeromonas* en la diarrea aguda de niños menores de 5 años. Anales de la Fac de Medvol. 63 (2).
  - Guillén, A., Lucho, J. (2011). Retos y problemas en el diagnóstico microbiológico en diarrea. Rev. Perú MedExp Salud Pública, 28 (1), 116-120.
  - Gómez-Candela, C., Canales-Albendea, M.A., Palma–Milla, S., Paz-Arias, R., Díaz–Gómez, J., Rodríguez–Duran, D., Villarino–Sanz, M., Arribas-Hortiguella, L., Burgos-Peláez, R. (2012). Intervención nutricional en el paciente oncohematológico. Nutr. Hosp, 27(3): 669–680.
-

- 
- Grande, A., Gayol, B., Redondo, A., Gonzalez, H. (1998). Mesa Redonda. Infecciones gastrointestinales en pediatría. Bol pediatr, 38: 220 - 241
  - Hegde, A., Ballal, M., & Shenoy, S. (2012). Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* by multiplex PCR. Indian Journal of Medical Microbiology, 30 (3), 279.
  - Hernández-Cortez, C., Aguilera-Arreola, M.G., Castro-Escapulli, G. (2011). Situación de las Enfermedades gastrointestinales en México. Enf Inf Microbiol. 31(4): 137-151.
  - Hernández-Cortez C., Méndez-Tenorio A., Aguilera-Arreola M.G., Castro-Escarpulli G. (2013). Design and standardization of four multiplex polymerase chain reactions to detect bacteria that cause gastrointestinal diseases. African Journal of Microbiology Research. 7 (21), 2673-2681.
  - Ibrahim, A., Liesack, W., Griffiths, M., Robins-Browne, R. (1997). Development of a Highly Specific Assay for Rapid Identification of Pathogenic Strains of *Yersinia enterocolitica* Based on PCR Amplification of the *Yersinia* Heat stable Enterotoxin Gen (*yst*). Journal of Clinical Microbiology, 35 (6): 1636-1638.
  - Jourdan, A., Scott, J., Wesley, I. (2000). Development of a Fluorogenic 5'Nuclease PCR Assay for Detection of the *ail* Gene of Pathogenic *Yersinia enterocolitica*. Applied and Environmental Microbiology, 66 (9), 3750-3755.
  - Kingombe, C., D'Aoust, J., Huys, G., Hofmann, L., Rao, M., Kwan, J. (2010). Multiplex PCR Method for Detection of Three *Aeromonas* Enterotoxin Genes. Applied and Environmental Microbiology, 76 (2), 425-433.
  - Lantz, P. G., Matsson, M., Wadström, T., & Rådström, P. (1997). Removal of PCR inhibitors from human faecal samples through the use of an aqueous two-phase system for sample preparation prior to PCR. Journal of Microbiological Methods, 28(3), 159-167.
  - Méndez-Álvarez, S., Pérez-Roth, E. (2004). La PCR múltiple en microbiología clínica. Enferm Infecc Microbiolclin, 22(3): 183-92.
-

- 
- Menghi, C. I., Gatta, C. L., Makiya, R., Cesar Méndez, O. (2006). Detección molecular de *Dientamoeba fragilis* en heces: eliminación de los inhibidores de la DNA polimerasa. *Parasitología latinoamericana*, 61(3-4), 146-151.
  - Millar, B. C., Xu, J., & Moore, J. E. (2007). Molecular diagnostics of medically important bacterial infections. *Molecular Diagnostics: Current Technology and Applications*, 9(1), 21-39.
  - Monté, R., Pérez, J., Ramírez, M., Dumas, S (1990). *Yersinia enterocolítica*: Investigación en 1300 niños menores de cinco años con enfermedad diarreica aguda. *Rev. Cub Med Trop.* 42(1): 13-8.
  - Moreira, D. (1998). Efficient removal of PCR inhibitor using agarose – embedded DNA preparations. *Nucleic Acid Research*, 26 (13): 3309–3310.
  - Muñoz-Guijosa, C., Morala, A., Hernández, A., Sanchob, F.J., Artigasa, V., Triasa, M. (2003). VIPoma pancreático: aportación de dos casos con diferente malignidad *Cir Esp* ;74(4):239-41
  - Paz, M., Muzio, H., Teves, S., Santini, P. (2004). Análisis de una cepa de *Yersinia enterocolitica* aislada de heces diarreicas humanas en Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, (36): 164-169.
  - Pablos, M., Remarcha, M. A., Rodríguez-Calleja J. M., Santos, J. A., Olero, A., García – López, M. L. (2010). Identity, virulence genes and clonal relatedness of *Aeromonas* isolates from patients with diarrhea and drinking wáter. *Eur J Clin. Microbiol Infect Dis*, (29): 1163-1172.
  - Pedraza, J. G., Sanandres, N. P., Varela, Z. S., Aguirre, E. H., & Camacho, J. V. (2014). Aislamiento microbiológico de *Salmonella* spp. y herramientas moleculares para su detección. *Salud Uninorte*, 30(1), 73-94.
  - Pérez, M., Hurtado, A.I., Couto, I., Gutiérrez, J.M., Seoane, L., Suárez, J.M., Galeiras, R. (2013). Abordaje multidisciplinario de la infección por *Clostridium difficile*. *Revista Chilena de infectología*. 30(2); 165-185
  - Rådström, P., Knutsson, R., Wolffs, P., Dahlenborg, M., & Löfström, C. (2003). Pre-PCR processing of samples. *PCR detection of microbial pathogens*, 31-50.
-

- 
- Ratón, T. O. (2004). Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. *Revista Iberoamericana de Micología*, 21, 15-19.
  - Ramírez-Rosales, A., Cantú-Llanos, E. (2012). Mortalidad intrahospitalaria en pacientes con diarrea asociada a infección por *Clostridium difficile*. *Rev Gastroenterol Mex*, 77 : 60-65
  - Remes-Troche, J.M. (2012). Diarrea asociada con infección por *Clostridium difficile* ¿es tiempo de preocuparnos en México? *Rev Gastroenterol Méx*, 77; (2): 58-59
  - Riverón-Corteguera, R. (1999). Fisiopatología de la diarrea aguda. *Rev Cubana Pediatr*, 71(2): 86-115.
  - Rodríguez, J., Vargas A., Herrera M. (2000). Diarrea por *Yersinia enterocolitica*. Reporte de un caso. *Rev. Med. Hosp. Nac. Niños (Costa-Rica)*. 35 (I-2), 79-82.
  - Rodríguez, F., Sanchen, C., Hernández, C., Cordero, R. (2007). *Yersinia enterocolitica*. Reporte de dos casos con enfermedad diarreica aguda. *Archivo Médico de Camagüey*; 11(2)
  - Rodríguez-Prado, D., Mirelis, B., Navarro, F. (2013). Infecciones producidas por *Clostridium difficile*. *Enferm Infecc Microbid Clin*. 31(4): 254-263
  - Rojas-Herrera, R.A., González-Flores, T. (2006). Detección e Identificación de bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos mediante la reacción en cadena de la polimerasa, 31(2): 69-72.
  - Ruiz de Alegría-Puig, C., Perea-López, B. (2010). Indicaciones y valoración clínica del urocultivo y coprocultivo. *Medicine*, 10 (49): 3317-3320.
  - Rusac, Al., Barbosa, A.V., Mercés, S.A., Paixáo, R., Hofer, E., Vallim, D.C., Dutra, A.M. (2014). Phenotypic and genotypic analysis of bio-serotypes of from various sources in Brazil. *L Infect Dev Ctries*; 8 (12): 1533-1540.
  - Sabatt, T.S. (2015). Diarrea asociada a antibióticos. *Rev. Med. Clin. Condes*, 26 (5) 687 – 695.
  - Sandoval-Arias, S.M. (2014). Extracción de DNA humano mediante dos métodos para la tipificación forense a partir de muestras fecales en papel FTA. *Tecnología en marcha*, 27 (4): 14–21.
-

- 
- Senderovich, Y., Ken-Dor, S., Vainblat, I., Blau, D., Izhaki, I., Halpern, M. (2012). A Molecular study on the Prevalence and Virulence Potential of *Aeromonas* spp. Recovered from Patients Sufferin from Diarrhea in Israel, 7 (2), e30070
  - Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Investigación en discapacidad, 2(2), 70-78.
  - Terech – Majewska, E., Pajdak, J., Platt – Samoraj, A., Szczerba – Turek, A., Bancercz – Kisiel, A., Grabowska, K. (2016). The presence of *Yersinia enterocolitica* strains potentially virulent for humans and animals in river wáter. Journal of applied microbiology.
  - Thisted-Lambertz, S and Danielsson-Tham, M.L. (2005). Identification and characterization of pathogenic *Yersinia enterocolitica* Isolates by PCR and Pulse – Field Gel Electrophoresis. Applied and Environmental Microbiology, 71 (7): 3674– 3681.
  - Torrens, H. R., Argilagos, G. B., Cabrera, M. S., Valdés, J. B., Sáez, S. M., & Viera, G. G. (2015). Las enfermedades transmitidas por alimentos, un problema sanitario que hereda e incrementa el nuevo milenio. REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria, 16(8), 1-27.
  - Vara-Brenes, D., Santiago-Cuñer, A., Mateos-Rodríguez, J. M., Fernández-Bermejo, M., & Molina-Infante, J. (2014). Colitis por *Aeromonas hydrophila* como primera manifestación de un cáncer de colon. Gastroenterología y Hepatología, 37(4), 270-272.
  - Wang, G., Clark, C., Liu, C., Pucknell, C., Munro, C., Kruk, T., Caldera, R., Woodward, D., Rodgers, F. (2003). Detection and Characterization of the Hemolysin Genes in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* by Multiplex PCR. Journal of Clinical Microbiology, p. 1048 – 1054.
  - Wannet, W., Reessink, M., Brunings, H., Maas, H. (2001). Detection of Pathogenic *Yersinia enterocolitica* by a Rapid and Sensitive Duplex PCR Assay. Journal of Clinical Microbiology, p. 4483-4486.
-



---

## Libros

- Andreo, B., Durán, J.J. (2004). Investigaciones en sistemas kárstico y españoles. España: Instituto Geológico y Minero de España. pp. 433.
- Brook., Geo, F., Jawetz., Melnick., Adelberg. (2001). Microbiología Médica. Mc Graw Hill. pp 278
- García-Martos, P., Fernández, T.M. (1994). Microbiología Clínica práctica. España: Universidad de Cadiz. 2da Edición. pp. 227–228.
- González, B., Ordóñez, A., Feliu, J., Zamora, P., Espinosa, E. (2007). Tratado de medicina paliativa y tratamiento de soporte del paciente con cáncer. Madrid: Médica Panamericana. pp. 241–242.
- Monés, X. (2009). Comprender el estreñimiento y la diarrea. España: Amat. pp. 96 – 100.
- Romero Cabello., Herrera, B. (2002). Síndrome diarreico infeccioso. Médica panamericana. pp. 522.

## Capítulos de libros

- Alonso, C., Bartolomé, R., Domínguez, J., Matas, L., Rabella, N. (2005) Técnicas rápidas de detección de antígeno. Procedimientos en Microbiología Clínica. España: SEIMC. pp 1 – 65
- Camaro-Salas, ML., Catalá-Cuenca, V., Gimeno-Cardona, C., Martínez-García, R., Olmos-Martínez, P. (2013) Validación y verificación analítica de métodos microbiológicos. Procedimientos en Microbiología Clínica. España: SEIMC. pp 1-35
- Castro-Escarpulli, G., Aguilera-Arreola, M.G., Giono-Cerezo, S (2015). Género *Aeromonas*. Capítulo 22. En: Microbiología Bacteriología y Virología. México: Méndez S.A de C.V. pp. 261–272.
- Castro-Escarpulli, G., Giono-Cerezo, S., Aguilera-Arreola, M.G (2012). *Aeromonas*. Capítulo 37. En: Microbiología y Parasitología Médico de Tay. México: Méndez S.A de C.V. pp. 303–312.

- 
- Fernández-Banares, F., Esteve-Comas, M. (2012). Diarrea crónica. Servicio de Aparato Digestivo. Hospital Mutua Terrasa. pp. 125-146.
  - Fernández-Olmos, A., García de la Fuente, C., Sáenz-Nieto, J.A., Valdezate-Ramos, S. (2012). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Procedimientos en Microbiología Clínica. España: SEIMC. pp 1 – 52.
  - Figueras, MJ., Beaz-Hidalgo, R. (2014). *Aeromonas*: Introduction. In: Batt C.A., Tortorello. ML. (Eds), Encyclopedia of Food Microbiology, col 1. Elsevier Ltd, Academic Press, pp 24 – 30.
  - Molina-Lopez, J., Chávez-Berrocal, M.E., Estalva-Campos, C.A. (2015). Capítulo 67. Genero *Yersinia*. Microbiología y Parasitología Médica de Tay. Tay J., Gutierrez M., López M., Molina J., Manjarrez M.E. Editores Méndez S.A de C.V. México, D.F. Cuarta Edición. pp-900-905

## Tesis

- Artega – Garibay, R.I. (2009). El Biofilm de *Aeromonas* spp., y su relación con el sistema flagelar como mecanismo de patogenicidad y resistencia. Departamento de Microbiología. Laboratorio de Bacteriología Médica. ENCB - IPN
- Camacho-García, J.F. (2013). Evaluación de la sensibilidad y especificidad de 4 PCRm para el diagnóstico de enfermedades gastrointestinales. Tesis de licenciatura. ENCB-IPN. México DF, 2013.
- Hernández-Cortez, C. (2012). Diseño y Estandarización de cuatro PCRm para la detección de patógenos bacterianos causantes de enfermedades gastrointestinales. Departamento de Microbiología. Laboratorio de Bacteriología Médica. ENCB-IPN.
- Latif Eugén, F. (2015). *Aeromonas*, un microorganismo ambiental de importancia en salud humana y animal. Tesis de Doctorado. Universidad Rovira i Virgili. España.
- Quiñonez Landazuri, L. V., & Quinancela Alvarado, G. E. (2014). Causas de la

- 
- automedicación en niños menores de 5 años por los cuidadores atendidos en el área de emergencia del Hospital Dr. Francisco de Icaza Bustamante de la Ciudad de Guayaquil año 2013 (Doctoral dissertation, Universidad de Guayaquil. Facultad de Ciencias Médicas. Escuela de Enfermería).

## Manuales

- BiofireDiagnostics. (2014) FilmArray™ Gastrointestinal (GI) panel. Manual de instrucciones
- DGE / Salud. (2012) Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de la Enfermedad Diarreica Aguda mediante la Estrategia de Núcleos Trazadores (NuTraVE).
- Diaz-Quiñonez, J.A. (2015). Lineamientos para la vigilancia epidemiológica del Rotavirus por laboratorio. DGE-INDRE-RNLSP. Versión No. 01.
- Moreno-Pérez, M., Villanueva-Zamudio, A., Galicia-Nicolás, G. (2014) “Lineamientos para la vigilancia de enfermedad diarreica aguda bacteriana por laboratorio”. Versión No. 01. INDRE.
- Ruiz de Adana – Pérez, R. (2001) Manual de diagnóstico y terapéutica médica en atención primaria. Ed. Días de Santos, S. A. pp. 363 – 365.
- Velasco, J., Araque, M.C., Araujo, E., Longa, A., Nieve, B., Ramírez, A.C., Sánchez, K., Velasco, E. (2008). Diagnóstico microbiológico de la Enfermedad Diarreica Aguda (EDA). Coprocultivo. Manual prácticas de bacteriología clínica. Editores Flores, R., Fontal, B., Lobo, H., Peña, J., Peñaloza, M., Perdomo, I., Villalobos, J. pp 103 – 117

## URL´s

- 1 [http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/publicaciones/2012/ver\\_ejecutiva\\_2011.pdf](http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/publicaciones/2012/ver_ejecutiva_2011.pdf)
- 2 [http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/156\\_GPC\\_ENFERMEDAD\\_DIARREICA\\_AGUDA\\_EN\\_NINOS/RER\\_Diarrea\\_Aguda.pdf](http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/156_GPC_ENFERMEDAD_DIARREICA_AGUDA_EN_NINOS/RER_Diarrea_Aguda.pdf)
- 3 [http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/dgae/boletin/intd\\_boletin.html](http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/dgae/boletin/intd_boletin.html)
- 4 [www.cenacepre.salud.gob.mx/descargas/pdf/PAE\\_PrevencciónEnfermedades](http://www.cenacepre.salud.gob.mx/descargas/pdf/PAE_PrevencciónEnfermedades)

---

DiarreicasAgudasColera2013\_2018.pdf

- 5 <http://www.freece.com/Files/Classroom/ProgramSlides/74e8eb83-3951-476c-87c9-ce00afb7e3b6/Diarrhea%20Homestudy.pdf>
- 6 [http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/gastro/vol\\_17s1/diarrea\\_inmunocomprido.htm](http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/gastro/vol_17s1/diarrea_inmunocomprido.htm)
- 7 <http://www.food-info.net/es/bact/yeent.htm>
- 8 [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S1017-5462000000100012&script=sci\\_arttext&tlng=pt](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S1017-5462000000100012&script=sci_arttext&tlng=pt)
- 9 [http://www.unileon.es/personal/wwdhtmpm/34yersinia\\_archivos/frame.htm#slide0200.htm](http://www.unileon.es/personal/wwdhtmpm/34yersinia_archivos/frame.htm#slide0200.htm)
- 10 [www.elika.net/datos/otros\\_docs\\_nan/ArchivoEU242/detección%20patógenos2.pdf](http://www.elika.net/datos/otros_docs_nan/ArchivoEU242/detección%20patógenos2.pdf)
- 11 [Ecaths1.s3.amazonaws.com/catmicromed/APUNTE%20Enterobacterias.pdf](http://ecaths1.s3.amazonaws.com/catmicromed/APUNTE%20Enterobacterias.pdf)
- 12 [www.infecto.edu.uy/terapeutica/guiaatb/diarrea.html](http://www.infecto.edu.uy/terapeutica/guiaatb/diarrea.html)
- 13 [http://www.ucu.ve/fileadmin/user\\_upload/facultad\\_farmacia/catedraMicro/08\\_Tema12\\_identificación%C3%B3n.pdf](http://www.ucu.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/08_Tema12_identificación%C3%B3n.pdf)
- 14 [http://www.stambouliau.com.ar/pdf/tecnicas\\_moleculares.pdf](http://www.stambouliau.com.ar/pdf/tecnicas_moleculares.pdf)
- 15 [http://www.biomerieux.com.ar/servlet/srt/bio/argentina/dynPage?open=ARG\\_CLN\\_PRD&doc=ARG\\_CLN\\_PRD\\_G\\_PRD\\_CLN\\_77&pubparams.sform=3&lang=es\\_ar](http://www.biomerieux.com.ar/servlet/srt/bio/argentina/dynPage?open=ARG_CLN_PRD&doc=ARG_CLN_PRD_G_PRD_CLN_77&pubparams.sform=3&lang=es_ar)
- 16 [http://web.oie.int/esp/normes/fmanual/pdf\\_es/1.1.3\\_Validacion\\_y\\_control\\_de\\_calidad.pdf](http://web.oie.int/esp/normes/fmanual/pdf_es/1.1.3_Validacion_y_control_de_calidad.pdf)
- 17 [Web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf\\_es/1.1.02\\_Gestion\\_de\\_calidad.pdf](http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es/1.1.02_Gestion_de_calidad.pdf)
- 18 [Web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf\\_es\\_2008/1.01.05.%20Validación%20y%20control%20de%20calidad.pdf](http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/1.01.05.%20Validación%20y%20control%20de%20calidad.pdf)
- 19 <http://prezi.com/8z0er95zkbr0/las-cepas-atcc-herramienta-indispensable-en-el-control-de-calidad-interno-en-microbiologia/>
- 20 [www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/710/extracción.pdf](http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/710/extracción.pdf)
- 21 <http://www.ibt.unam.mx/sintesis/cuantificacion.html>
- 22 [www.jove.com/video/2565/nanodrop-microvolumen-cuantificación-de-cidos-nucleicos?lenguaje=spanish](http://www.jove.com/video/2565/nanodrop-microvolumen-cuantificación-de-cidos-nucleicos?lenguaje=spanish)

- 
- 23 (<http://www.ugr.es/~eianez/Biotecnologia/forensetec.htm>)
  - 24 <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/530/cap17.pdf>
  - 25 <http://www.microbial-systems.com>
  - 26 <https://www.ebi.ac.uk/metagenomics/>
  - 27 [www.dges.unam.mx/boletin/bdboletin/2016\\_031.html](http://www.dges.unam.mx/boletin/bdboletin/2016_031.html)

Nota: La revisión de las URL`s fue realizada durante el periodo 2015-2016

---

## 13. Anexo

### 13.1. Consentimiento informado

#### *CONSENTIMIENTO INFORMADO*



**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
CENTRO MEDICO NACIONAL LA RAZA  
HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO**

Título del protocolo:

“Vigilancia epidemiológica y frecuencia de enteropatógenos de la diarrea nosocomial infecciosa en el servicio de hematología del Hospital de Especialidades del CMN La Raza con una técnica de biología molecular por reacción en cadena de polimerasa múltiple en tiempo real cualitativa”

Instituciones participantes:

Instituto Mexicano del Seguro Social

Sitio de Investigación: Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional “La Raza”

Investigadores:

Gustavo Barriga Angulo MD

Jefe de Laboratorio de microbiología del Hospital de Infectología del CMN La Raza

*Jose Juan Terrazas Estrada MD*

*Médico infectólogo adscrito al HECMN La Raza*

---

Estimado (a) paciente:

*Esta forma de consentimiento puede contener palabras que usted no entiende. Por favor pregúntele al médico del estudio o al personal del estudio que le explique cualquier palabra o información que no entienda claramente.*

*Usted debe recibir una fotocopia de este documento o carta de consentimiento para que lo lea en el momento, antes de tomar la decisión de participar en este estudio.*

*Usted ha sido invitado para participar en este estudio de investigación, por ser un paciente del servicio de hematología del Hospital de Especialidades del CMNR y que ha presentado un evento de sospecha de diarrea durante su estancia en el hospital, donde se iniciado una estrategia para detectar y tratar oportunamente las probables causas infecciosas de su problema y asimismo, poder detectar dichos gérmenes y prevenir dichas infecciones en el futuro.*

### **EXPLICACION:**

*La diarrea es un padecimiento frecuente durante la hospitalización y esta asociada al uso de antibióticos, medicamentos, estrés y alimentos. Esto se puede presentar hasta en 3 de cada 10 pacientes hospitalizados, y esto varía dependiendo del tipo de antibiótico que sea utilizado. Entre los factores predisponentes del paciente y las circunstancias que afectan a la frecuencia y la gravedad de la afección se encuentran la edad avanzada, la enfermedad de base como diabetes, enfermedad renal o cirugías recientes, la administración hace poco tiempo de fármacos que alteren la motilidad intestinal, y la quimioterapia.*

*Las causas infecciosas de diarrea durante la hospitalización representan hasta el 30% del total de los casos (3/10), y este porcentaje va de la mano con el estudio y búsqueda intencionada de los diversos gérmenes enteropatógenos que ocasionan diarrea.*

*Entre los patógenos intestinales más frecuentes se encuentran los virus (como Norovirus, Rotavirus) , Salmonella sp., y Clostridium sp.*

*La implementación de técnicas diagnósticas se hace cada vez más necesaria a medida que los patógenos adquieren una importancia mundial en el contexto de las infecciones hospitalarias.*

### **OBJETIVOS DEL ESTUDIO**

- 1. Obtener información de la frecuencia de gérmenes enteropatógenos causantes de diarrea nosocomial dentro de nuestra población de pacientes pertenecientes al servicio de hematología / unidad de trasplante de médula ósea, con fines epidemiológicos locales.*
- 2. Implementar la logística para la detección de agentes infecciosos que ocasionan diarrea nosocomial infecciosa de los pacientes hospitalizados en el servicio de hematología del HECMNR*
- 3. Realizar diagnóstico rápido para poder tratar oportunamente las infecciones adquiridas en el hospital*

---

## **PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO**

*A todo paciente adulto que se encuentre hospitalizado en el servicio de hematología y/o unidad de trasplante de médula ósea se vigilará su estancia intrahospitalaria durante las primeras 48 hrs, si en este lapso desarrolla diarrea se intentará buscar causas no infecciosas (dieta, medicamentos, estrés, quimioterapia). Si posterior a las 48 hrs continúa con diarrea durante 12 hrs se procederá a tomar una muestra de heces de consistencia diarreica (líquida) obtenida durante la mañana entre las 9 am y las 11 am para su rápido procesamiento mediante la tecnología Biofire® Film-array (panel gastrointestinal) que es una prueba de biología molecular que utiliza la metodología de PCR multiplex para patógenos bacterianos: Campylobacter (C jejuni, C coli & C upsaliensis), Clostridium difficile (toxin A/B); Plesiomonas shigelloides, Salmonella, Vibrio (V. parahemaemolyticus & V. vulnificus), Vibrio cholerae; Yersinia enterocolitica, E. coli/ Shigella; Enterogregative E. coli (EAEC), Enteropathogenic E. coli (EPEC), Enterotoxigenic E coli. (ETEC), Shiga-like toxin-producing E coli (STEC); E coli O157; Shigella/Enteroinvasive E. coli (EIEC). También detecta parásitos: Cryptosporidium, Cyclospora cayetanensis, Entamoeba histolytica, Giardia lamblia. Virus: Adenovirus F40/41, Astrovirus, Norovirus GI/GII, Rotavirus A, Sapovirus.*

*También se tomarán muestras adicionales para coprocultivo, coproparasitológico que son metodologías de rutina con las que cuenta nuestra unidad.*

### **BENEFICIOS.**

*El beneficio de este estudio es el acceso a un método de diagnóstico rápido que podría arrojar información sobre la causa infecciosa de la diarrea que se adquirió durante la hospitalización, y de ser positiva la prueba, se establecerá el tratamiento dirigido al microorganismo causante de enfermedad. Sin embargo, no hay ninguna garantía de que usted se beneficie directamente de este estudio.*

*El acceder a realizarse dicha prueba ayudará a tener un reporte epidemiológico local que ayude en la toma de decisiones ante eventos de diarrea en otros pacientes hospitalizados en un futuro.*

### **RIESGOS.**

*No se esperan riesgos de ningún tipo a la salud por la toma de muestras diarreicas para su análisis dentro del estudio.*

### **COSTOS.**

*La prueba de detección de enteropatógenos por PCR múltiple cualitativa en muestra diarreica no tendrá ningún costo para el paciente. Los estudios de laboratorio, imagen y la atención del personal de salud estará determinada por el juicio clínico del servicio clínico al cual usted pertenece, y no es decisión directa de los investigadores.*



---

## **PAGO POR PARTICIPACION.**

*Usted no recibirá ningún pago (monetario o en especie) por su participación en este estudio.*

## **NUEVOS HALLAZGOS.**

*Usted será notificado de manera oportuna sobre cualquier nueva información significativa relativa al resultado de la prueba, asimismo, sus médicos estarán informados y se dejará una copia del resultado impreso en el expediente clínico.*

## **CONFIDENCIALIDAD Y REVISION DE DOCUMENTOS FUENTE.**

*Los archivos del estudio que lo identifican se conservarán de manera confidencial como lo requiere la ley. Las Regulaciones Federales de Privacidad proporcionan protección en cuanto a privacidad, seguridad y acceso autorizado. Excepto cuando lo requiera la ley, usted no será identificado/a por nombre, domicilio, número de teléfono, o cualquier otro identificador personal directo en registros del estudio, se le asignará un número de clave para proteger la confidencialidad de los participantes del estudio.*

*No será identificado(a) en ningún caso si los resultados de este estudio de investigación se presentan en reuniones científicas o en publicaciones.*

## **PREGUNTAS.**

*Usted tiene derecho a hacer cualquier pregunta, en cualquier momento, acerca de los riesgos potenciales y/o conocidos de este estudio.*

*Si en cualquier momento usted tiene alguna pregunta de este estudio o si experimenta una lesión relacionada con la investigación, algún efecto adverso, o su representante está disponible para contestar las preguntas al número de teléfono 57245900 (conmutador), solicitar se les comunique a la oficina de infectología del 7 piso del Hospital de Especialidades del CMNR con el Dr. Jose Juan Terrazas Estrada.*

*No firme esta forma a menos que haya tenido la oportunidad de hacer preguntas y haya recibido respuestas satisfactorias a todas sus preguntas.*

## **PARTICIPACION/RETIRO VOLUNTARIO.**

*Usted puede elegir no estar en el estudio, o si está de acuerdo participar en él, puede retirarse del estudio en el momento que usted lo desee. También puede retirarnos su autorización para usar sus datos aunque esto debe hacerlo por escrito.*

*Su decisión de no participar o retirarse del estudio no ocasionará ninguna penalización o pérdida de beneficios a los que tiene derecho, y no afectará su acceso al cuidado de la salud. Si decide retirarse, le solicitamos que avise al Dr. Jose Juan Terrazas Estrada del servicio de infectología del HECMNR por escrito y déjele saber que se está retirando del estudio.*

---

**COMPENSACION POR LESION.**

*No se le proporcionará ninguna otra compensación. Debido a que la toma de muestra de heces no representa ningún riesgo potencial a su salud.*

**CONSENTIMIENTO**

*He leído y entiendo toda la información precedente que describe este estudio de investigación. Esta investigación me ha sido explicada por el Dr.*

*(a).\_\_\_\_\_*

*y/o el coordinador del estudio y se han contestado todas mis preguntas a mi satisfacción.*

*Consiento participar en este estudio voluntariamente.*

*Autorizo la liberación de mis archivos médicos al Patrocinador, la FDA, SSA Comité de Ética y/o Comité de Revisión Institucional y otras autoridades de salud.*

*Entiendo que recibiré una copia firmada de esta forma de consentimiento.*

*Al firmar esta forma no he renunciado a ninguno de los derechos legales a que tendría de otra forma derecho como un participante en un estudio de investigación.*

*Yo autorizo la liberación de mis archivos médicos relacionados con la investigación a los dirigentes de la misma, otras Autoridades Regulatorias de Salud y al Comité de Ética y/o Comité de Revisión Institucional. También estoy de acuerdo que la información derivada de mi caso puede usarse en publicaciones resultantes de este estudio, sin revelar mi identidad personal de forma alguna.*

---

Firma del paciente Fecha

---

Nombre impreso del paciente

---

Nombre y Firma del presentador del consentimiento Fecha

---

Nombre del Testigo 1 Firma del testigo 1

---

Relación con el paciente

---

Dirección del testigo 1

---

Nombre del testigo 2

Firma del testigo 2

---

Relación con el paciente

---

Dirección del testigo 2

Iniciales del Paciente \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_