

Uso Combinado del Método Cualitativo y del Metanálisis en el Enfoque Diagnóstico de la Diarrea Infecciosa

LUIS HUICHO^{1,2}, JUAN RIVERA^{1,2}, MIGUEL CAMPOS³, RICHARD L. GUERRANT⁴

¹Universidad Nacional Mayor de San Marcos, ²Instituto de Salud del Niño, ³Universidad Peruana Cayetano Heredia,

⁴Division of Geographic and International Medicine-University of Virginia School of Medicine

RESUMEN

Objetivo: Comparar la utilidad diagnóstica de pruebas índice en la identificación de la diarrea invasiva. **Métodos:** Combinación de análisis cualitativo y cuantitativo (metanálisis). **Identificación de datos y selección de los estudios:** De 2603 referencias identificadas vía MEDLINE (1970 -1994), listas de referencia y por correspondencia con expertos en el campo, 81 cumplieron los requerimientos de selección preestablecidos. De éstas, 25 contenían datos suficientes para un metanálisis adicional. **Extracción de datos:** En la revisión cualitativa, un autor extrajo información amplia sobre la utilidad diagnóstica de las pruebas índice y sobre las características metodológicas de los estudios. En el metanálisis, todos los datos de los artículos seleccionados fueron extraídos por un investigador, en tanto otro verificó su exactitud. Se calculó la tasa de verdaderos positivos (TPR) y de falsos positivos (FPR), a partir de cada tabla de contingencia de 2 x 2. Utilizando el método de transformación logística y regresión lineal ponderada de cuadrados mínimos, se elaboró curvas resumen de las características operativas del receptor (SROC), para determinar la utilidad diagnóstica comparativa de las pruebas. **Resultados del análisis de datos:** El enfoque cualitativo no restrictivo identificó problemas metodológicos que fueron evaluados adicionalmente en el estudio cuantitativo. En el metanálisis, la graficación de TPR contra FPR, como curvas SROC, demostró puntos dispersos, indicando heterogeneidad. La curva de lactoferrina fecal mostró el mayor rendimiento y la de leucocitos fecales el menor rendimiento. **Conclusiones:** La lactoferrina fecal es la prueba con mayor utilidad diagnóstica en la identificación de la diarrea invasiva. Se propone la utilización del enfoque combinado cualitativo y metanalítico como un método adecuado de evaluación de la utilidad de pruebas diagnósticas, tanto en la práctica clínica como en el proceso general de análisis de decisiones.

Palabras clave: Diarrea, Métodos epidemiológicos, Lactoferrina, Meta-análisis.

COMBINED USE OF QUALITATIVE METHOD AND METANALYSIS ON THE DIAGNOSTIC APPROACH OF INFECTIOUS DIARRHEA

SUMMARY

Objective: To compare the diagnostic usefulness of index tests in the identification of invasive diarrhea. **Methods:** Combination of qualitative and metanalytic methods. **Data identification and study selection:** Of 2603 MEDLINE references (1970-1994) and correspondence with field experts, 81 fulfilled preestablished selection criteria and 25 of them had sufficient data for additional metaanalysis. **Extraction of data:** During the qualitative review, one author extracted extended information on the diagnostic value of index tests and on methodologic characteristics of primary studies. During the metanalytical phase, all data from the selected articles were extracted by one observer whereas the second reviewer checked them for accuracy. True positive (TPR) and false positive rates (FPR) were calculated with the 2 x 2 contingency table. To compare the diagnostic usefulness of index tests, a summary receiver operating characteristic curve (SROC) was fitted to the data with the use of logistic transformation and weighted minimal squares linear regression. **Results of data analysis:** The non restrictive qualitative approach identified methodologic problems that were additionally assessed with the quantitative approach. In metanalysis, plots of TPR against FPR demonstrated widely scattered points, indicating heterogeneity. Fecal lactoferrin SROC curve showed the highest performance and fecal leukocytes showed the lowest performance. **Conclusions:** Fecal lactoferrin appears to be the most useful test in the identification of invasive diarrhea. The use of a combined qualitative and metanalytic method is proposed as an adequate approach to the assessment of diagnostic tests, in both clinical practice and medical decision analysis.

Key words: Diarrhea, Epidemiologic Methods, Lactoferrin, Meta-analysis.

Correspondencia:

Luis Huicho
Vesalio 632, Dpto. 401, San Borja
Lima - Perú

INTRODUCCION

La diarrea continúa siendo un problema de salud mundial, y afecta principalmente a habitantes de países en desarrollo, y particularmente a la población pediátrica (1,2). Según estudios publicados por la OMS, de un total anual de 12,9 millones de defunciones de niños menores de 5 años, 3,2 millones fueron debidas a enfermedades diarreicas (1).

En los últimos años se ha asistido al desarrollo cada vez mayor de pruebas rápidas dirigidas a identificar los agentes etiológicos de la diarrea infecciosa. Esto ha despertado grandes expectativas entre microbiólogos y clínicos (3-6). La mayor parte de estas pruebas se basa en la aplicación de los mecanismos patogénicos implicados y de su correspondiente base genética, y representa una promesa excitante de la biología molecular (7-12). Sin embargo, muchas presentan todavía limitaciones en su exactitud diagnóstica y creemos que seguirán siendo pruebas relativamente inaccesibles e inaceptablemente costosas en los países en desarrollo e incluso en los desarrollados. Tal vez estas nuevas herramientas que ofrece la genética molecular sean más gratificantes si se aplican en el estudio de los mecanismos patogénicos de la diarrea. Por ejemplo, las toxinas de los agentes enteropatógenos constituyen instrumentos poderosos para «disecar» en detalle los mediadores químicos implicados en la diarrea infecciosa y para mejorar nuestra comprensión de nuevas formas de transducción de señales en las células del hospedero (13).

La diarrea puede ser causada a través de la producción de enterotoxinas, de citotoxinas, mediante interferencia con la absorción intestinal, o a través de la invasión de la mucosa intestinal. Desde el punto de vista patogénico y práctico es útil clasificar a las diarreas como inflamatorias (producidas por agentes invasivos y/o citotóxicos tales como cepas invasivas de *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter*) y no inflamatorias (producidas por virus, parásitos tales como *Giardia* y bacterias enterotóxicas como *V. Cholerae* (14-16)). Una diarrea inflamatoria se origina en el intestino delgado distal o el colon para causar disentería, con sangre oculta, pus y moco. Las causas clásicas de disentería incluyen shigellosis y amebiasis, así como a *Escherichia coli* invasiva, enteritis por *Salmonella*, y actualmente enfermedad por *Campylobacter jejuni* y *Clostridium difficile* productor de citotoxina (15). Cuando la intensidad de la respuesta inflamatoria es leve estas manifestaciones pueden estar ausentes, y en estas situaciones se necesita de marcadores confiables de inflamación de la mucosa. Por otra parte, se ha demostrado que las amebas virulentas son capaces de matar y fagocitar a los neutrófilos del huésped, por lo que se ven solamente remanentes picnóticos de los leucocitos en las heces de estos pacientes con amebiasis intestinal virulenta (17).

A principios de este siglo, en el intento de contar con instrumentos rápidos, confiables y simples para discriminar disentería bacilar y disentería amebiana, se desarrolló la búsqueda de leucocitos fecales (18-20). Se encontró a estas células en los casos de disentería bacilar y por el contrario estuvieron ausentes en la mayoría de casos de disentería amebiana. En estos estudios pioneros

se evaluó solamente la presencia de *Shigella* y *E. histolytica*. Actualmente conocemos de muchos agentes etiológicos más que causan diarrea inflamatoria.

Se ha considerado por mucho tiempo que la presencia de leucocitos fecales es un instrumento de tamizaje rápido, simple y confiable para identificar a los pacientes con diarrea inflamatoria causada por agentes invasivos o citotóxicos. Una identificación certera de los leucocitos fecales requiere la disponibilidad de un técnico experimentado y de heces frescas. Si la muestra fecal no es procesada inmediatamente, los leucocitos son destruidos y no son detectados. Utilizando una muestra relativamente pequeña, un estudio previo ha sugerido que la presencia de sangre oculta fecal detectada por una prueba de guaiaco puede ser una alternativa adecuada para la prueba de leucocitos fecales (21). Por otra parte, en niños pequeños de un país en desarrollo, se ha encontrado que ninguno de ellos es una prueba de tamizaje confiable (22).

Guerrant y col. (23) han desarrollado un marcador de leucocitos fecales, la lactoferrina fecal, que demostró *in vitro* ser un marcador útil, incluso cuando los leucocitos habían sido morfológicamente alterados o habían sido destruidos en las muestras fecales. Más recientemente, se ha estudiado muestras fecales de voluntarios infectados con diferentes patógenos entéricos y muestras fecales de pacientes con diarrea nosocomial por *Clostridium difficile* evaluando la presencia de lactoferrina (24). Esta prueba distinguió diarrea inflamatoria de diarrea no inflamatoria.

Se han conducido numerosos estudios sobre las manifestaciones clínicas y epidemiológicas y sobre diferentes pruebas de tamizaje en el enfoque diagnóstico de la diarrea aguda. Sin embargo, no se ha realizado ningún estudio dirigido específicamente a evaluar cualitativa y cuantitativamente la exactitud de estos instrumentos en relación a la correcta predicción de la naturaleza de la diarrea, vale decir, si se trata de una infección inflamatoria o no inflamatoria.

La decisión de solicitar o no investigaciones microbiológicas y de iniciar o no tratamiento antimicrobiano en pacientes con diarrea aguda infecciosa es un desafío frecuente para los médicos, independientemente de su contexto particular de trabajo. La toma de decisiones rápida y directa no es tarea fácil debido a que los datos clínicos y epidemiológicos con los que cuentan los médicos tienen limitaciones. Sería deseable entonces contar con ayudas diagnósticas simples, no costosas y, altamente confiables.

En este artículo presentamos un enfoque combinado de análisis cualitativo y de análisis cuantitativo (metanálisis) sobre el tema. En el enfoque cuantitativo, hemos seguido las pautas recientemente recomendadas para la realización y el reporte de múltiples estudios primarios en forma de metanálisis (24-27). La principal pregunta que se intenta responder con este enfoque combinado es: ¿Puede usarse el examen de leucocitos fecales, sangre oculta, o lactoferrina fecal, ya sea como una evidencia presuntiva de diarrea bacteriana tratable o como un instrumento de tamizaje para determinar qué pacientes ameritan coprocultivos?

El contar con una prueba diagnóstica simple y confiable podría permitir una reducción sustancial en el número de coprocultivos, innecesarios y costosos, y una pronta consideración de terapia antimicrobiana para aquellos pacientes afectados de diarreas inflamatorias potencialmente tratables.

MÉTODOS

Objetivo y alcances del análisis

Evaluar la utilidad de las pruebas de leucocitos fecales, lactoferrina fecal y sangre oculta en la identificación de pacientes con diarrea inflamatoria bacteriana. El estándar de referencia con el cual se midió la enfermedad de interés fue el coprocultivo. Una diarrea fue considerada como inflamatoria cuando el coprocultivo fue positivo para *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli* enteroinvasiva, *Escherichia coli* enteropatógena o *Clostridium difficile* citotoxigénico. Otros agentes considerados como invasivos en los estudios primarios incluyeron a *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila*, y *Plesiomonas shigelloides*.

Recuperación de la literatura relevante

Se hizo una búsqueda de la literatura relacionada con enfermedad diarreica utilizando la base de datos bibliográfica de la National Library of Medicine (Medline) de 1970 a Setiembre de 1994. Especificamos todas las palabras claves y frases claves que empezaran con las palabras descriptoras «diarrhea» con calificadores (subencabezados) «diagnosis», «fecal leukocytes», «occult blood», o «fecal lactoferrin». Se identificó artículos adicionales consultando con expertos en el campo, examinando las relaciones de referencias de los artículos primarios, y examinando artículos de revisión.

Los términos índice usados en MEDLINE fueron examinados para todos los artículos relevantes obtenidos por cualquiera de los medios indicados y se diseñó una estrategia de búsqueda final, que fue la siguiente:

Explode DIARRHEA/diagnosis, epidemiology, etiology, therapy; explode LEUKOCYTES/all subheadings; OCCULT BLOOD (término no permite calificadores); LACTOFERRIN (texto libre); LACTOFERRIN and DIARRHEA (texto libre).

En la fase cualitativa, uno de los autores (LH) revisó los resúmenes y seleccionó sin criterios restrictivos aquellos artículos que contenían información sobre mecanismos patogénicos de diarrea, agentes etiológicos de diarrea, y pruebas diagnósticas en diarrea. Se incluyó en este enfoque cualitativo artículos de revisión, cartas al editor y trabajos originales, aún cuando no tuvieran información explícita sobre sensibilidad, especificidad, y valores predictivos. En la fase de metanálisis, los resúmenes fueron revisados por dos observadores independientes (que no fuesen co-autores de ninguno de los estudios revisados) para determinar si los artículos contenían información diagnóstica clínica o de laboratorio. Los artículos completos de aquellos que contenían informa-

ción relevante fueron independientemente analizados por los mismos dos observadores. Solamente se incluyeron en la revisión los artículos que cumplieron los criterios de inclusión indicados en la Tabla 1. Las discrepancias fueron resueltas por consenso (otra vez, independientemente de los co-autores de los estudios revisados).

Además, en la fase de metanálisis los estudios fueron incluidos solamente si presentaban información suficiente para hacer posible la construcción de una tabla de contingencia de 2 X 2, para calcular sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivos y negativos.

Criterios de selección

Se presentan en la Tabla N° 1 los criterios de inclusión señalados en el estudio de los resúmenes en MEDLINE

Tabla 1. - Criterios de selección para los artículos recuperados preliminarmente en forma de resúmenes de MEDLINE

1. Sólo artículos relacionados a diarrea aguda infecciosa.
2. Artículos originales. No se consideró revisiones ni cartas al editor (excepto cuando contenían información suficiente sobre métodos y datos necesarios para evaluar las pruebas de interés).
3. Sólo estudios realizados en humanos (adultos o niños, varones o mujeres, prospectivos o retrospectivos, hospitalizados o ambulatorios).
4. Los artículos técnicos debían tener necesariamente información clínica o resultados de pruebas de tamizaje aplicados en humanos. De lo contrario no fueron considerados.
5. Los artículos debían haber incluido datos sobre aspectos clínicos y/o pruebas de tamizaje (leucocitos fecales, sangre oculta, lactoferrina fecal), evaluadas individualmente o en combinación.
6. Coprocultivo realizado en todos los pacientes como el estándar de referencia.
7. Los artículos debían haber incluido sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo para la(s) prueba(s) de interés, explícitamente señaladas o presentadas de modo que se pudiera construir una tabla de 2 x 2.
8. Las pruebas diagnósticas debían haber sido realizadas en un hospital o en un centro de atención de salud. Estudios realizados en casa o sin supervisión médica no fueron considerados.

Evaluación de la calidad metodológica de los estudios primarios

En la revisión cualitativa, uno de los autores (LH) realizó un juicio crítico de los artículos, sin incluirse en esta etapa una escala cuantitativa de calidad metodológica de los estudios primarios. En la fase de metanálisis, todos los estudios fueron revisados por los mismos dos revisores independientes. La calidad científica to-

tal de cada estudio se determinó en base a una escala de 16 puntos, de acuerdo a los criterios descritos en la Tabla 2, representando una puntuación de 16 un estudio con limitaciones mínimas y un estudio con puntuación de 1 un estudio con limitaciones extensas. Se usó una escala modificada propuesta por Mulrow y col⁽²⁸⁾ para evaluar la calidad de una prueba diagnóstica. El puntaje final fue determinado por consenso.

Recolección de datos

En la revisión cualitativa, un solo autor extrajo información sobre medidas de utilidad diagnóstica de las pruebas índice y sobre características metodológicas de los estudios. En la fase metanalítica, los dos revisores extrajeron independientemente los datos de los artículos. Las discrepancias en relación a la recolección de los datos fueron resueltas por consenso.

Análisis

Se determinó cualitativamente la utilidad diagnóstica de las diferentes pruebas, sin recurrir necesariamente a la evaluación de las características de las pruebas. En la fase de metanálisis se calculó las características de las pruebas (sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo) para cada estudio, utilizando el método de Sackett y col⁽²⁹⁾.

Generación de las Funciones SROC

Con el objetivo de identificar la prueba diagnóstica de mejor rendimiento global, se construyó una curva resumen de las características operativas del receptor (SROC), siguiendo pautas actualmente recomendadas para la realización y el reporte de metanálisis de evaluación de pruebas diagnósticas⁽²⁵⁻²⁷⁾. Se utilizó este método debido a que la sensibilidad y la especificidad son medidas de exactitud diagnóstica que tienen como base un umbral de positividad único (punto de corte o criterio de positividad) para clasificar una prueba índice como positiva o negativa. Al cambiar el umbral para incrementar la sensibilidad disminuye la especificidad y recíprocamente. Este conflicto entre la sensibilidad y la especificidad hace imperativo que sean consideradas conjuntamente⁽²⁷⁾. Esta dependencia conjunta subyacente, puede ser replanteada adecuadamente como un «trade-off» (relación inversa) entre la sensibilidad de la prueba (tasa de verdaderos positivos) y la prueba de especificidad (1-tasa de falsos positivos), y es representada plenamente en la curva ROC⁽²⁵⁾.

A partir de cada estudio individual, se extrajo una tabla de contingencia de 2 x 2, incluyendo los resultados verdaderos positivos (TP), los falsos positivos (FP), los falsos negativos (FN), y los verdaderos negativos (TN). De estas tablas, calculamos TPR y FPR como sigue:

$$TPR = \frac{TP}{(TP + FN)} \quad FPR = \frac{FP}{(TP + FN)}$$

Siguiendo métodos utilizados en el análisis de datos binarios, convertimos las tasas de verdaderos positivos (TPR) y las tasas de falsos positivos (FPR) de cada estudio primario a sus transformaciones logit. El logit de TPR es el logaritmo natural de TPR dividido entre 1 - TPR:

$$\text{logit (TPR)} = \ln [TPR/(1-TPR)]$$

Del mismo modo, para FPR:

$$\text{logit (FPR)} = \ln [FPR/(1-FPR)]$$

Si TPR o FPR tienen valor de cero o uno (como sucede cuando la tabla de contingencia contiene una celda cero), las ecuaciones previas son indefinidas. Por lo tanto, agregamos un medio a todas las cuentas en todas las tablas utilizadas para calcular TPR y FPR. A continuación definimos la diferencia D y la suma S de los dos logits, de este modo:

$$S = \text{logit (TPR)} + \text{logit (FPR)} \\ D = \text{logit (TPR)} - \text{logit (FPR)}$$

Seguidamente modelamos logit TPR - logit FPR como una función lineal de logit TPR + logit FPR, esto es, realizamos una regresión lineal ponderada de cuadrados mínimos en las tablas de 2 X 2, usando D como la variable dependiente y S como la variable independiente. Así, para estimar las curvas SROC, utilizamos la siguiente ecuación lineal:

$$D = bS + i$$

donde D = logit TPR - logit FPR, S = logit TPR + logit FPR, b = coeficiente de regresión para S (pendiente), e i = intercepto.

Una vez que obtuvimos la pendiente y el intercepto de la línea transformada, utilizamos la siguiente ecuación para retrotransformarla de modo que obtuviéramos TPR como una función de FPR, como:

$$TPR = 1/[1 + e^{-i/(1-b)} \cdot (FPR/1-FPR)^{-i/b(1-b)}]$$

Esta ecuación describe una curva que asume la forma de la función ROC. Extendimos las líneas de regresión solamente dentro del rango de los datos.

RESULTADOS

A. Análisis Cualitativo.

En el análisis cualitativo se hizo una revisión detallada del papel de los leucocitos fecales, de la sangre oculta fecal, de la lactoferrina fecal y de combinaciones de las pruebas con indicadores clínicos, separándolos arbitrariamente en estudios preliminares y recientes, sobre la base del tipo de agentes buscados. Esta fase de análisis mostró que la lactoferrina fecal como una prueba diagnóstica más útil que la sangre

oculta fecal y los leucocitos. Igualmente, la combinación de pruebas de tamizaje fecales con datos clínicos se mostró como una alternativa potencialmente importante. Este análisis cualitativo reveló la necesidad de llevar a cabo la cuantificación por metanálisis de los indicadores de exactitud diagnóstica para poder llegar a conclusiones definitivas sobre la utilidad diagnóstica comparativa de cada prueba. Se identificó además diversos problemas metodológicos en los estudios primarios, particularmente relacionados a la prueba de leucocitos fecales. De este análisis cualitativo se desprende que dicha prueba requiere de un técnico experimentado, de muestras obtenidas en copa y no por hisopado o en pañal, y requiere de un procesamiento inmediato para evitar la destrucción y distorsión de los leucocitos. Además la prueba se ve afectada seriamente con el uso previo de antimicrobianos.

Tabla 2.- Preguntas usadas para evaluar la calidad metodológica de los estudios primarios

1. ¿Los autores indicaron explícitamente la técnica usada para evaluar la prueba o pruebas de interés?
2. ¿Se especificó explícitamente el criterio de positividad para la prueba o pruebas de interés?
3. ¿Se aplicó sistemáticamente la prueba de interés a todos los pacientes o a una muestra al azar?
4. ¿Independencia de los datos: Afirman explícitamente los autores que el estándar de referencia y la prueba índice fueron recolectadas independientemente? Describen sus métodos de manejo de datos de modo que se pueda inferir confiablemente que los datos fueron independientes?
5. ¿La población de estudio fue de pacientes consecutivos o no consecutivos?
6. ¿El estudio fue prospectivo o retrospectivo?
7. ¿Los individuos del grupo fueron sintomáticos? De ser así, fueron evaluados?
8. ¿Descripción del grupo: los autores describen la edad, sexo, y sintomatología de sus grupos, o al menos señalan que fueron «no seleccionados»?
9. ¿Ensamblaje de grupos: los investigadores ensamblaron grupos basados en población? o ensamblaron sus grupos de pacientes referidos para un coprocultivo (estudio microbiológico u otra prueba?)
10. ¿Cuál fue la edad del grupo, si se indicó?
11. ¿Qué porcentaje del grupo fue de sexo masculino, si se indicó?
12. ¿Qué otras condiciones co-mórbidas caracterizaron al grupo?
13. ¿Dónde se realizaron los exámenes: hospital, clínica, en campo, o en el laboratorio?
14. ¿Año de estudio? (patógenos recientemente descritos pueden no haber sido investigados en los estudios más antiguos)
15. ¿Se incluyó datos explícitos sobre tratamiento antimicrobiano previo?
16. ¿Los autores reportaron infecciones por agentes mixtos? De ser así, realizaron análisis separados para casos con agente único y con agentes mixtos?

El análisis cualitativo reveló igualmente problemas importantes relacionados con el diseño de los estudios, con los estimados de exactitud diagnóstica, con el efecto de la variación en la validez del estudio sobre los estimados de exactitud diagnóstica, y con la generalizabilidad de los resultados. Se decidió también evaluar cuantitativamente estos problemas en la fase de metanálisis.

B. Metanálisis

Recuperación de la Literatura

Las estrategias de búsqueda inicial y final generaron 2603 títulos. En la revisión cualitativa se incluyeron además de artículos directamente relacionados con la exactitud diagnóstica de las pruebas de lactoferrina fecal, leucocitos fecales y sangre oculta, artículos de revisión y artículos originales sobre patogenia y agentes etiológicos de diarrea. En la fase metanalítica, del total de 2603 se seleccionaron 81 artículos por lo menos por uno de los revisores como trabajos potencialmente relevantes para inclusión en el meta-análisis. En total, se excluyó inicialmente 2522 artículos. Los 81 artículos restantes fueron examinados separadamente por dos observadores.

Los 81 artículos incluidos en el grupo potencialmente relevante fueron revisados como artículos completos por dos revisores. Los desacuerdos entre los revisores de los 81 artículos fueron resueltos por consenso. Solamente fueron incluidos finalmente aquellos que cumplieron con los criterios de inclusión descritos en la Tabla Nº2. Las razones que motivaron el rechazo de las referencias se enumeran en la Tabla Nº3. Finalmente, se consideró que 25 artículos eran relevantes para su inclusión en éste meta-análisis^{21-24,39-51} y fueron evaluados independientemente para considerar su calidad metodológica por los mismos dos revisores.

Tabla 3. - Razones para el rechazo de referencias preliminarmente identificadas de la búsqueda MEDLINE

Categoría de referencias	Número Excluido
Artículo de revisión, no datos originales	18
Estudio no realizado en humanos	1
No relacionado con diarrea aguda	1
Artículo técnico sin datos clínicos	1
No se usó las pruebas de interés (leucocitos fecales, sangre oculta, lactoferrina fecal, y leucocitos fecales con datos clínicos)	21
No se usó prueba de referencia de interés: examen microbiológico de heces	0
No evaluable: No tablas de 2 x 2 de resultados verdaderos positivos, falsos positivos, falsos negativos, y verdaderos negativos, mostrados o derivables de los datos dados	14
Prueba índice realizada en casa y no en un contexto profesional	0
Total rechazados	56
Total elegibles	25

Valor metodológico de los estudios primarios

La revisión cualitativa juzgó la calidad de los artículos revisados en base al juicio personal del revisor (LH). En el metanálisis, se adjudicó una puntuación de calidad científica total, de acuerdo a las limitaciones descritas anteriormente, con base a una escala de 16 puntos. Todos los estudios incluidos fueron revisados independientemente por dos revisores, y se alcanzó por consenso una

escala final de validez (Tabla N° 4).

Análisis de la exactitud diagnóstica en el metanálisis

Los datos extraídos de los estudios primarios en base a los que construimos las curvas SROC se muestran en la Tabla N° 5. Los datos estadísticos obtenidos de la regresión lineal ponderada de cuadrados mínimos para generar las curvas mostradas en la Figura 1 se resumen en la Tabla N° 6.

Tabla 4.- Variables relacionadas con características del grupo de estudio

Referencia	Tipo de Estudio	Tipo de Estudio	Descrip. Grupo	Ensambl. Cohorte	Datos de Tto. Ant.	Técnica indicada	Umbral indicado	Score
Huicho ²²	C	P	No	Si	Si	Si	Si	12
Harris ³⁰	NC	R	No	Si	No	Si	Si	5
Peirce ³¹	C	R	No	Si	Si	Si	Si	8
Guerrant ³²	C	P	Si	Si	No	Si	No	11
Pickering ³³	NC	R	No	No	Si	Si	No	4
Korzeniowski ³⁴	NC	R	No	Si	No	Si	Si	7
Stoll ⁴⁵	NC	R	Si	No	No	Si	Si	9
Alvarado ³⁶	C	P	Si	Si	Si	Si	Si	16
Stoll ³⁷	NC	R	Si	No	No	Si	Si	8
Vögtlin ³⁸	C	P	No	Si	No	Si	No	7
DeWitt ³⁹	C	P	Si	Si	No	Si	Si	12
Thorson ⁴⁰	C	P	Si	Si	No	Si	Si	11
Fontana ⁴¹	C	P	Si	Si	No	Si	Si	14
Paccagnini ⁴²	C	R	No	No	No	Si	Si	8
Speelman ⁴³	NC	R	Si	Si	No	Si	Si	10
Ronsmans ⁴⁴	C	R	Si	Si	No	Si	Si	14
Fendri ⁴⁵	NC	R	Si	Si	No	Si	Si	10
Ascher ⁴⁶	C	P	Si	Si	Si	Si	Si	13
Hossain ⁴⁷	C	R	No	Si	No	Si	Si	8
Jindal ⁴⁸	C	R	Si	Si	Si	Si	Si	9
Guerrant ²³	NC	R	No	No	No	Si	Si	5
Patwari ⁴⁹	C	P	Si	Si	Si	Si	Si	16
Miller ²⁴	C	R	Si	Si	No	Si	Si	9
Scerpella ⁵⁰	NC	R	Si	Si	No	Si	Si	10
Choi ⁵¹	C	P	Si	Si	No	Si	Si	11

C = pacientes consecutivos; NC = pacientes no consecutivos; P = estudio prospectivo; R = estudio retrospectivo. Tto. Ant. = tratamiento antimicrobiano previo. Cuando no hubo datos disponibles, el estudio fue considerado NC or R.

Tabla 5a.- Características de las pruebas índice: leucocitos fecales (FL); sangre oculta («hemocult») o eritrocitos fecales, FRBC); lactoferrina fecal; y leucocitos fecales con datos clínicos

Referencia	N° de pacientes	Prueba	SE (%)	SP (%)	PPV (%)	NPV (%)	DP	Prueba Estándar
Huicho ²²	296	FL, (>5/hpf)	36	84	35	84	0,20	SA, S, C
		Sangre oculta («hemocult»)	43	66	23	83	0,20	
Harris ³⁰	183	FL, umbral no dado	97	98	95	98	0,32	SA, S, EIEC
Peirce ³¹	77	FL, umbral no dado	56	93	71	87	0,23	S
Guerrant ³²	31	FL, umbral no dado	81	80	69	89	0,35	SA, EIEC
Pickering ³³	249	FL, umbral no dado	56	84	47	88	0,20	SA, S
Korzeniowski ³⁴	71	FL (copa, >10/hpf)	95	78	63	98	0,28	S
	71	Sangre oculta (copa, «hemocult»)	85	84	68	93	0,28	
Stoll ³⁵	2496	FL, >10/hpf	21	98	76	81	0,23	S, C
		FRBC, >10/hpf	9	99	88	79	0,23	
Alvarado, ³⁶	41	FL, ≥2hpf en 5 campos mínimo	87	91	85	93	0,36	SA, S, C
Stoll ³⁷	1493	FL, >10/hpf	52	48	31	69	0,31	S, C
		FRBC, >10/hpf	33	95	74	76	0,31	
Vogtlin ³⁸	145	FL, umbral no dado	85	81	65	93	0,28	SA, S, C, CD
		Sangre oculta («hemocult»)	73	77	56	88	0,28	
DeWitt ³⁹	156	FL (>5/hpf)	85	88	59	97	0,17	SA, S, C, Y, A
	180	Datos clínicos y FL (>5/hpf)	74	94	69	95	0,15	
Thorson ⁴⁰	42	FL, >5/hpf (muestra en copa)	96	61	77	92	0,57	SA, S, C

* SE = sensibilidad; SP = especificidad; PPV = valor predictivo positivo; NPV = Valor predictivo negativo; DP = Prevalencia. SA = *Salmonella*; S = *Shigella*; C = *Campylobacter*; EIEC = *Escherichia coli* invasiva; CD = *Clostridium difficile*; Y = *Yersinia enterocolitica*; A = *Aeromonas hydrophila*. PS = *Plesiomonas shigelloides*.

Tabla 5b.- Características de las pruebas índice: leucocitos fecales (FL); sangre oculta («hemocult» o eritrocitos fecales, FRBC); lactoferrina fecal; y leucocitos fecales con datos clínicos

Referencia	N° de Pacientes	Prueba	SE (%)	SP (%)	PPV (%)	NPV (%)	DP	Prueba Estándar
Fontana ⁴¹	157	Score clínico más FL (>5/hpf)	64	86	56	88	0,25	SA, C, Y
Paccagnini ⁴²	322	FL (>5/hpf)	40	90	49	86	0,19	SA, C
		Sangre Oculta («hemocult»)	77	68	36	93	0,19	
Speelman ⁴³	58	FL, >50/hpf)	85	72	80	78	0,57	S
Ronsmans ⁴⁴	300	FL, >10/hpf)	83	55	38	90	0,56	S, C
Fendri ⁴⁵	61	FL, >10/hpf)	74	74	69	78	0,44	SA, S, C
Ascher ⁴⁶	180	FL (>5/hpf)	83	97	80	97	0,13	SA,S,C,A, PS
		DeWitt's cluster y FL (>5/hpf)	63	98	83	94	0,13	
Hossain ⁴⁷	11358	FL >25 y FRBC independ. del número	63	94	85	83	0,34	S
Jindal ⁴⁸	398	FL, >10/hpf)	60	88	36	95	0,10	SA,S, EIEC, EPEC
Guerrant ²³	60	*Lactoferrina fecal	96	100	100	97	0,43	S
Patwari ⁴⁹	533	FL (>10/hpf)	27	90	26	91	0,89	SA,S,EIEC, EPEC
		FRBC, umbral no dado	32	89	27	91	0,89	
Miller ²⁴	78	Lactoferrina fecal						S, EPEC, CD
		≥1:50	96	80	73	98	0,36	
Scerpella ⁵⁰	54	≥1:400	57	98	94	80	0,36	SA, S, C
		FL (umbral no dado)	69	89	93	59	0,67	
		Sangre oculta («hemocult»)	36	36	72	36	0,67	
		Lactoferrina fecal						
Choi ⁵¹	46	≥1:50	94	72	87	87	0,67	SA, S, C
		≥1:200	56	89	91	50	0,67	
		≥1:400	93	83	90	88	0,61	
		≥1:400	61	100	100	62	0,61	

*Positivo ≥1:200, Negativo ≥1:50-1:200; PS = *Plesiomonas shigelloides*; EPEC = *Escherichia coli* enteropatógeno.

Tabla 6.- Resumen de los datos estadísticos obtenidos de regresión lineal ponderada de cuadrados mínimos para generar las curvas SROC mostradas en la Figura N°1.

PRUEBA	n(u)	n(w)	R D(s)	R ²	SE Est	p	i	S.E.(i)	s
Todas	39	579	-0,427	0,103	1,135	0,000	1,839	0,073	-0,343
FL	20	220	-0,446	0,199	1,215	0,000	1,097	0,100	-0,292
OB	8	52	0,292	0,100	1,020	0,022	1,504	0,171	-0,131
CL+FL	3	11	-0,849	0,721	0,464	0,001	1,568	0,356	-0,889
FLF	7	8	0,162	0,026	1,241	0,729	3,645	0,457	0,089

n(u) = tamaño muestral no ponderado i.e. número de sub-estudios; n(w) = tamaño muestral luego de ponderación; R D(s) = coeficiente de correlación de D regresionado en S; p = valor p (prueba t); i = intercepto.

OB = sangre oculta; CL = Datos clínicos; FL = Leucocitos fecales; FLF = lactoferrina fecal.

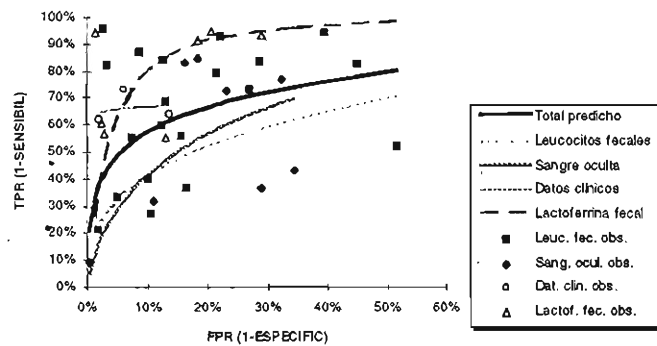


Fig N° 1. Diagrama de tasa de verdaderos positivos (TPR) contra tasa de falsos positivos (FPR) obtenido de cada artículo mencionado en la Tabla 5. Cada una de las curvas dibujadas sobre los puntos es una función resumida de las características operativas del receptor. *Obs.*, observado; *Leuc. fec.*, leucocitos fecales; *Sang. ocul.*, sangre oculta; *Dat. clin.*, datos clínicos; *Lactof. fec.*, lactoferrina fecal.

Como se esperaba, los resultados obtenidos fueron divergentes. Estos resultados pueden explicarse por las características del diseño de estudio y por las características de los pacientes y de las pruebas diagnósticas. Las Tablas N° 4 y N° 5 muestran las características relevantes de los estudios incluidos, y la Tabla N° 2 muestra las preguntas utilizadas para evaluar la calidad metodológica total de cada estudio. Ofrecemos dichos datos para posibilitar que otros investigadores repitan o actualicen nuestro metanálisis. Con el objeto de poder resumir de manera cuantitativa confiable los resultados divergentes, utilizamos una transformación logística y una regresión lineal para generación de una curva SROC (25,26). De los 25 estudios finalmente incluidos consideramos 39 datos puntuales (sub-estudios) para construir la curva SROC total. Para generar curvas SROC individuales para cada curva, se usó 38 datos puntuales. Un estudio no fue incluido en el

análisis (47), porque los autores usaron como prueba índice una combinación de leucocitos fecales con eritrocitos, lo que hizo a los resultados no comparables con los otros estudios que no combinaron leucocitos fecales con sangre oculta. Por tanto, obtuvimos 4 curvas SROC (Fig. 1). Se muestra la diagramación de TPR y FPR para todos los datos puntuales para cada una de las cuatro pruebas índice que analizamos (leucocitos fecales, 20 datos puntuales; sangre oculta, 8 puntos dato; lactoferrina fecal, 7 datos puntuales, y combinación de leucocitos fecales con datos clínicos, 3 datos puntuales). Construimos la curva SROC para sangre oculta incluyendo estudios que usaron eritrocitos fecales detectados microscópicamente y prueba de guaiaco modificado (ver Tabla 5 para referencias específicas). Como era de esperarse del enfoque SROC que utilizamos, TPR aumentó a medida que FPR aumentaba. La mejor función diagnóstica fue la lactoferrina fecal. La peor función diagnóstica fue la de leucocitos fecales. Sangre oculta y combinación de leucocitos fecales con datos clínicos dieron origen a curvas SROC intermedias.

DISCUSION

En este estudio se utilizó tanto el análisis cualitativo como el cuantitativo (metanálisis) de las pruebas de lactoferrina fecal, leucocitos fecales, sangre, sangre oculta y combinaciones de estas pruebas con datos clínicos con la finalidad de evaluar su utilidad diagnóstica en la diarrea aguda infecciosa.

El enfoque cualitativo fue realizado como una fase previa al metanálisis. El hecho de tener pocas restricciones para la selección de la literatura y para la extracción y análisis de datos permitió un ámbito más extenso de aspectos y variables potenciales susceptibles de evaluación en la fase cualitativa.

Utilizando el juicio cualitativo no restrictivo, se juzgó la utilidad diagnóstica de las pruebas con criterio amplio. El lector puede encontrar en otras referencias una versión detallada de los resultados separados tanto del enfoque cualitativo como del cuantitativo utilizados.^{60,61} El análisis cualitativo permitió concluir

que la prueba de lactoferrina fecal impresiona ser la prueba más prometedora en el enfoque diagnóstico de las diarreas infecciosas. Esta prueba parece ofrecer menos dificultades de validez y confiabilidad que la prueba de leucocitos fecales, sangre oculta y la combinación de leucocitos fecales e indicadores clínicos. El enfoque cualitativo no pudo establecer una diferencia jerárquica comparativa de utilidad diagnóstica de las pruebas en cuestión, para lo que se necesitaba la aplicación de un enfoque metanalítico posterior. El análisis cualitativo identificó además problemas metodológicos potenciales en los estudios primarios, los que se utilizaron como bases importantes de partida en el diseño del metanálisis posterior.

La fase metanalítica fue más rigurosa en cuanto a los criterios de selección, inclusión y exclusión, extracción de datos, análisis e interpretación. De este modo se abordó las preguntas que fueron planteadas durante el análisis cualitativo y que no podían ser respondidas sino a través de un enfoque cuantitativo. Este análisis cuantitativo cumplió con los criterios metodológicos recomendados para un meta-análisis de evaluación de pruebas diagnósticas:⁽²⁵⁻²⁷⁾ una búsqueda sistemática de la evidencia; el uso de criterios explícitos para la selección de los estudios y para la determinación de la validez metodológica; una evaluación de la aplicabilidad de los criterios de relevancia y validez; y un análisis cuantitativo confiable.

Existen varias fuentes potenciales de sesgo cuando se evalúa la exactitud de pruebas diagnósticas⁽⁵²⁾. Guías recientemente publicadas para meta-análisis que pretenden evaluar pruebas diagnósticas describen las fuentes más importantes de sesgo⁽²⁷⁾. Primero, debe definirse claramente el estándar de referencia y este estándar debe ser el mejor método disponible para evaluar la presencia o ausencia de la enfermedad de interés. En el presente estudio, identificamos una variación relativamente amplia en los agentes investigados por el coprocultivo, el estándar de referencia usado. Varios estudios evaluaron solamente agentes invasivos clásicos como *Salmonella* y/o *Shigella*. Otros estudiaron selectivamente agentes como *Campylobacter*, *Escherichia coli* invasiva, *E. coli* enteropathogenic o *Clostridium difficile*. Pocos artículos^(16,45,48,49) reportaron la investigación sistemática de todos los agentes de diarrea invasiva que actualmente se consideran importantes. patógenos recientemente descritos pueden no haberse investigado en los estudios más antiguos. No todos los organismos categorizados como causantes de diarrea inflamatoria poseen las características de virulencia asociadas con invasión o producción de citotoxinas. Por ejemplo, muchas cepas de *Campylobacter* son productoras de enterotoxina pero no invasivas. La independencia de las observaciones no fue un problema en los estudios primarios pues los coprocultivos fueron realizados por observadores independientes y sus resultados no fueron conocidos para los que evaluaron las pruebas índice. Es improbable que el sesgo de verificación haya sido un evento importante en el presente metanálisis, pues en la mayoría de estudios primarios la prueba de interés fue realizada en todos los pacientes con el problema clínico de interés y el establecimiento de la causa no requirió de procedimientos

invasivos. Con relación a la generalización de la exactitud diagnóstica de las pruebas índice a la práctica general en diferentes contextos, el espectro de pacientes, definido por el tipo y extensión, no se describió en detalle en la mayoría de los estudios. Además, varios estudios no ofrecieron suficiente información acerca de otras características de los pacientes tales como edad, sexo, síntomas de presentación, y condiciones co-mórbidas. Finalmente, las técnicas y los criterios de positividad usados en las diferentes pruebas índice variaron considerablemente entre los estudios.

La lactoferrina es una glicoproteína de unión al hierro de 77-kDa, facilita la producción de radicales hidroxilo y quela el hierro, previniendo su accesibilidad a los microorganismos e inhibiendo así su crecimiento. Está presente en diferentes concentraciones en varios fluidos corporales incluyendo el calostro, la leche materna propiamente tal, el moco vaginal, el esputo y la saliva⁽⁵¹⁾. Se la encuentra específicamente concentrada en los gránulos secundarios de los neutrófilos polimorfonucleares y no se encuentra en los linfocitos o en los monocitos⁽⁵³⁾. Los enteropatógenos invasivos o citotóxicos pueden desencadenar la liberación de mediadores de células epiteliales que ya sea atraen o activan células secundarias o mediadores secundarios como los leucocitos polimorfonucleares. Guerrant y col.⁽²³⁾ han desarrollado una prueba sencilla de aglutinación para la lactoferrina como un marcador de leucocitos fecales.

En el metanálisis, la lactoferrina fecal tuvo el rendimiento diagnóstico más alto en la discriminación de diarreas inflamatorias con respecto a las no invasivas. Sin embargo, debe señalarse que el limitado número de estudios primarios realizados hasta la actualidad con esta prueba recientemente desarrollada justifica tener prudencia en relación a conclusiones definitivas. A la fecha de realizar este análisis, tuvimos conocimiento de cuatro estudios que evaluaron lactoferrina fecal y contenían suficiente información para realizar el análisis^(23,24,50,51). Los tamaños muestrales fueron pequeños en estos estudios y los pacientes fueron seleccionados. Tres de estos estudios reportaron resultados correspondientes a dos umbrales diferentes,^(24,50,51) y los consideramos como datos puntuales separados al generar la curva SROC para lactoferrina fecal. Tres artículos adicionales presentados como resúmenes^(54,56) demostraron que la lactoferrina fecal era 25-114% mejor que el azul de metileno en la detección de enteropatógenos invasivos. Thornton y col.⁽⁵⁵⁾ notaron que 33% de 21 muestras fecales positivas para lactoferrina pero negativas para cultivo tuvieron *Shigella* detectada por PCR. Existe el problema potencial de reacciones cruzadas de ciertos anticuerpos anti-lactoferrina que se utilizan para la prueba de lactoferrina fecal con la lactoferrina humana de las heces de niños con lactancia materna. Por tanto, la inclusión de niños con lactancia materna podría llevar a lactoferrinas falsamente positivas. Afortunadamente, este problema no es común pues los niños con lactancia materna son los que menos frecuentemente sufren de enfermedades diarreicas⁽⁵⁷⁾ y además, la lactoferrina de los leucocitos humanos difiere de la hallada en la leche humana por el hecho de que carece de residuos de fucosa terminal en las cadenas de glicán que se necesitan para la unión con los macrófagos

(58). Resta por ver si los resultados de lactoferrina son afectados por terapia antimicrobiana previa, un factor que se ha demostrado que disminuye sustancialmente la posibilidad de detectar los leucocitos fecales (41).

La sangre oculta mostró un mejor rendimiento que los leucocitos fecales. Dos estudios usando sangre oculta (35,37) tuvieron una muestra de tamaño grande, pero no parecieron distorsionar la curva SROC. Cuando se reportaron dos o más puntos de corte para leucocitos fecales o sangre oculta, elegimos los mejores valores de sensibilidad y especificidad. Similarmente, para leucocitos fecales y sangre oculta que reportaron resultados para muestras en copa y en hisopo/pañal, elegimos aquellos que usaron muestras en copa, pues arrojaban mejores valores de sensibilidad y especificidad. No creemos que estos factores hayan influenciado en la forma de los respectivos SROCs.

Cuando se combinó los datos clínicos con la prueba de leucocitos fecales pareció aumentar la exactitud diagnóstica, pero solamente tres estudios presentaron tales datos. (39,41,46). Consecuentemente, esta información requiere de estudios adicionales antes de sacar conclusiones definitivas.

En medicina, la práctica clínica se fundamenta en la aplicación de experiencias cotidianas individuales, pero se basa sobre todo en la síntesis de la información disponible sobre cada tema en particular. Cada vez más se exige que las decisiones se basen en los resultados de estudios previos con estándares de calidad mínimos. Tanto en medicina general como en pediatría existen muchos temas diagnósticos y terapéuticos controversiales sobre los cuales no hay unanimidad de criterios. El metanálisis de ensayos clínicos es un método conocido y desarrollado ampliamente. El metanálisis de pruebas diagnósticas está mucho menos difundido y tiene un enorme potencial de aplicación. Proponemos la utilización del enfoque cualitativo y cuantitativo (metanálisis) combinados como un método útil para la revisión sistemática de la utilidad de pruebas diagnósticas. lo que permitirá que los médicos y los encargados de tomar decisiones y elaborar políticas de salud lo hagan en base a una información confiable. Ambos análisis se complementan, no son excluyentes.^{62,63} De hecho, el análisis cualitativo se puede utilizar como base para realizar luego el metanálisis con más rigurosidad. Las aplicaciones de este método combinado son numerosas y su realización requiere solamente de la colaboración entre clínicos especialistas en el tema que se estudia y epidemiólogos con experiencia en el análisis de diseños y en el manejo de métodos estadísticos.

En este trabajo, el análisis cualitativo inicial nos permitió identificar áreas de medición cuantitativa posterior. Este enfoque combinado demuestra que la lactoferrina fecal es la prueba diagnóstica más prometedora para detectar la mayoría de las diarreas inflamatorias. Si bien esta prueba no es específica para un patógeno particular, se muestra como altamente sensible para procesos intestinales inflamatorios. Por supuesto, el clínico requiere todavía toda la información clínica y en muchas instancias, el coprocultivo, para determinar el organismo y la susceptibilidad antimicrobiana. Por consiguiente, puede ser útil hacer un tamizaje de los pacientes que se podrían beneficiar de un coprocultivo. Se necesitan más estudios

clínicos y epidemiológicos para alcanzar una conclusión definitiva sobre el rol final de la lactoferrina fecal como marcador de leucocitos fecales. Similarmente, se requiere de estudios más cuidadosamente diseñados con sangre oculta y con leucocitos fecales antes de descartarlos como indicadores de diarrea inflamatoria.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio se realizó con el financiamiento del Institut Français d'Etudes Andines. La Sra. Paquita Valero brindó su valioso apoyo en la búsqueda y recuperación de la bibliografía.

REFERENCIAS

- 1) Organización Mundial de la Salud. Estimaciones globales de mortalidad. Ginebra: OMS:1992 (Documento WHO/A45:27)
- 2) UNICEF. The unmet needs of children. En: Strategies for children in the 1990s. New York: United Nations Children's Fund:1989.
- 3) Eisenstein BI, Engleberg NC. Applied molecular genetics: new tools for microbiologists and clinicians. J Infect Dis 1986;153:416-30.
- 4) Thorne GM. Diagnosis of infectious diseases. Infect Dis Clin North Am 1988;2:747-74.
- 5) Tenover FC. DNA probes - where are they taking us?. Eur J Clin Microbiol 1988;7:457-59.
- 6) Relman DA. Universal bacterial 16S rDNA amplification and sequencing. En: Diagnostic Molecular Microbiology - Principles and Applications (Pensing DJI, Smith TF, Tenover FC, White TJ eds.): 489-95: American Society for Microbiology. Washington, DC.
- 7) Hinojosa-Ahumada M, Swaminathan B, Hunter SB, Cameron DN, Kiehlbauch JA, Wachsmuth IK, Strockbine NA. Restriction fragment length polymorphisms in rRNA operons for subtyping *Shigella sonnei* J Clin Microbiol 1991;29:2380-84.
- 8) Litwin CM, Stora AL, Chipowsky S, Ryan KJ. Molecular epidemiology of *Shigella* infections: plasmid profiles, serotype correlation, and restriction endonuclease analysis. J Clin Microbiol 1991;29:104-8.
- 9) Yan W, Chang N, Taylor DE. Pulse - field gel electrophoresis of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* genomic DNA and its epidemiologic application. J Infect Dis 1991;163:1068-72.
- 10) Demehy P, Schutzbank TE, Thorne GM. Evaluation of an automated immunodiagnostic assay, VIDAS rotavirus, for detection of rotavirus in fecal specimens. J Clin Microbiol 1994;32:825-27.
- 11) Dinulos MB, Matson DO. Recent developments with human caliciviruses. Pediatr Infect Dis J 1994;13:998-1003.
- 12) Weiss JB. DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infections. Clin Microbiol Rev 1995;8:113-30.
- 13) Guerrant RL. Lessons from diarrheal diseases: demography to molecular pharmacology. J Infect Dis 1994;169:1206-18.
- 14) Guerrant RL, Shields DS, Thorson SM, Schorling JB, Gröschel DHM. Evaluation and diagnosis of acute infectious diarrhea. Am J Med 1985;89:1-8.
- 15) Guerrant RL, Wanke CA, Barret LJ, Schwartzman JD. A cost effective and effective approach to the diagnosis and management of acute infectious diarrhea. Bull N Y Acad Med 1987;63:484-99.
- 16) Guerrant RL, Bohak DA. Bacterial and protozoal gastroenteritis. N Engl J Med 1991;325:327-40.
- 17) Guerrant RL, Brush J, Ravdin JI, Sullivan JA, Mandel JL. Interaction between *Entamoeba histolytica* and human polymorphonuclear neutrophils. J Infect Dis 1981;143:83-93.
- 18) Willmore JG, Shearman CH. On the differential diagnosis of the dysenteries. The diagnostic value of the cell-exudate in the stools of acute amoebic and bacillary dysentery. Lancet 1918;2:200-6.
- 19) Graham D. Some points in the diagnosis and treatment of dysentery occurring in the British Salonika force. Lancet 1918;1:51-5.

- 20) Anderson J. A study of dysentery in the field with special reference to the cytology of bacillary dysentery and its bearing on early and accurate diagnosis. *Lancet* 1921;2:998-1002.
- 21) Vöggtlin J, Stalder H, Hürzeler L, Loosli J, Gyr K, Stalder GA. Modified guaiac test may replace search for faecal leucocytes in acute infectious diarrhoea. *Lancet* 1983;2:1204.
- 22) Huicho L, Sanchez D, Contreras M, Paredes M, Murga H, Chinchay L, Guevara G. Occult blood and fecal leukocytes as screening tests in childhood infectious diarrhea: an old problem revisited. *Pediatr Infect Dis J* 1993;12:474-7.
- 23) Guerrant RL, Araujo V, Soares E, Kotloff K, Lima AAM, Cooper WH, Gail Lee A. Measurement of fecal lactoferrin as a marker of fecal leukocytes. *J Clin Microbiol* 1992;30:1238-42.
- 24) Miller JR, Barrett LJ, Kotloff K, Guerrant RL. A rapid test for infectious and inflammatory enteritis. *Arch Intern Med* 1994;154:2660-4.
- 25) Moses LE, Shapiro D, Littenberg B. Combining independent studies of a diagnostic test into a summary ROC curve: data-analytic approaches and some additional considerations. *Stat Med* 1993;12:1293-1316.
- 26) Littenberg B, Moses LE. Estimating diagnostic accuracy from multiple conflicting reports: a new meta-analytic method. *Med Decis Making* 1993;13:313-21.
- 27) Irwig L, Tosteson ANA, Gatsonis C, Lau J, Colditz G, Chalmers TC, Mosteller F. Guidelines for meta-analyses evaluating diagnostic tests. *Ann Intern Med* 1994;120:667-76.
- 28) Mulrow CD, Linn WD, Gaul MK, Pugh JA. Assessing quality of a diagnostic test evaluation. *J Gen Intern Med* 1989;4:288-95.
- 29) Sackett DL, Haynes RB, Tugwell P. *Clinical epidemiology: a basic science for clinical medicine*. 2nd ed. Boston/Toronto: Little Brown, 1991.
- 30) Harris JC, DuPont HL, Hornick RB. Fecal leukocytes in diarrheal illness. *Ann Intern Med* 1972;76:697-703.
- 31) Peirce JE, DuPont HL, Lewis KR. Acute diarrhea in a residential institution for the retarded. *Am J Dis Child* 1974; 128:772-54.
- 32) Guerrant RL, Roger Moore RA, Kirschenfeld PM, Sande MA. Role of toxigenic and invasive bacteria in acute diarrhea of childhood. *N Engl J Med* 1975;293:567-73.
- 33) Pickering LK, DuPont HL, Olarte J, Conklin R, Ericsson C. Fecal leukocytes in enteric infections. *Am J Clin Pathol* 1977;68:562-5.
- 34) Korzeniowski OM, Barada FA, Rouse JD, Guerrant RL. Value of examination for fecal leukocytes in the early diagnosis of shigellosis. *Am J Trop Med Hyg* 1979;28:1031-35.
- 35) Stoll BJ, Glass RI, Huq MI, Khan MU, Banu H, Holt J. Epidemiologic and clinical features of patients infected with *Shigella* who attended a diarrheal disease hospital in Bangladesh. *J Infect Dis* 1982;146:177-83.
- 36) Alvarado T. Faecal leucocytes in patients with infectious diarrhoea. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1983;77:316-20.
- 37) Stoll BJ, Glass RI, Banu H, Huq MI, Khan MU, Ahmed M. Value of stool examination in patients with diarrhoea. *Br Med J* 1983;286:2037-40.
- 38) Vöggtlin J, Stalder H, Hürzeler L, Vischer W, Loosli J, Gyr K, Stalder GA. Modified guaiac test may replace search for faecal leucocytes in acute infectious diarrhoea. *Lancet* 1983;2:1204.
- 39) DeWitt TG, Humphrey KF, McCarthy P. Clinical predictors of acute bacterial diarrhea in young children. *Pediatrics* 1985;76:551-6.
- 40) Thorson SM, Lohr JA, Dudley S, Guerrant RL. Value of methylene blue examination, dark-field microscopy, and carbol-fuchsin Gram stain in the detection of *Campylobacter* enteritis. *J Pediatr* 1985;106:941-3.
- 41) Fontana M, Zuin G, Paccagnini S, Ceriani R, Quaranta S, Villa M, Principi N. Simple clinical score and laboratory-based method to predict bacterial etiology of acute diarrhea in childhood. *Pediatr Infect Dis J* 1987;6:1088-91.
- 42) Paccagnini S, Ceriani S, Galli L, Principi N, Fontana M, Zuin G, Quaranta M. Occult blood and faecal leucocyte tests in acute infectious diarrhoea in children. *Lancet* 1987;1:442.
- 43) Speelman P, McGlaughlin R, Kabir I, Butler T. Differential clinical features and stool findings in shigellosis and amoebic dysentery. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1987;81:549-51.
- 44) Ronsmans C, Bennis MI, Wierzbza T. Diagnosis and management of dysentery by community health workers. *Lancet* 1988;2:552-5.
- 45) Fendri C, Slim A, Arrouji Z, Moatlab H, Redjeb SB. Fréquence et caractères de la diarrhée a *Campylobacter jejuni-coli* en Tunisie. *Bull Soc Path Ex* 1989;82:645-9.
- 46) Ascher DP, Edusada-Corpus R. Clinical and laboratory predictors of bacterial diarrhea in a tropical environment. *Mij Med* 1991;156:74-6.
- 47) Hossain A, Albert MJ. Effect of duration of diarrhoea and predictive values of stool leucocytes and red blood cells in the isolation of different serogroups or serotypes of *Shigella*. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1991;85:664-6.
- 48) Jindal N, Arora S. Role of faecal leucocytes in the diagnostic evaluation of acute diarrhoea. *Ind J Med Sci* 1991;45:261-4.
- 49) Patwari AK, Deb M, Dudeja M, Jayashela M, Agarwal A, Singh P. J Diarrhoeal Dis Res 1993;11:211-16.
- 50) Scerpella EG, Okhuysen PC, Mathewson JJ, Guerrant RL, Latimer E, Lyerly D, Ericsson CD. Evaluation of a new latex agglutination test for fecal lactoferrin in travelers' diarrhea. *J Travel Med* 1994;1:68-71.
- 51) Choi SW, Park CH, Silva TMJ, Zaenker EI, Guerrant RL. *J Clin Microbiol* 1996;34:928-32.
- 52) Begg CB. Biases in the assessment of diagnostic tests. *Stat Med* 1987;6:411-23.
- 53) Martins CAP, Fonteles MG, Barret LJ, Guerrant RL. Correlation of lactoferrin with neutrophilic inflammation in body fluids. *Clin Diagn Lab Immunol*. In Press.
- 54) Green I, Kirkpatrick CH, Dale DC. Lactoferrin-specific localization in the nuclei of human polymorphonuclear neutrophilic leukocytes. *Proc Soc Exp Biol Med* 1971;137:1311-7.
- 55) Croft S, Newcomb-Gayman P, Carrol K. Comparison of the Leuko-test latex agglutination assay with the methylene blue stain for the detection of fecal leukocytes. Abstr. C-396, p. 560. Abstr. 94th Annu Meet Am Soc Microbiol 1994. American Society for Microbiology. Washington, D.C.
- 56) Thornton S, O'Brien T, Callahan J, Sharp T, Batchelor R, Rozmajzl P, Wallace M, Burans J. Evaluation of a rapid latex test for detection of lactoferrin in stool. Abstr. C-397, p. 560. Abstr. 94th Annu Meet Am Soc Microbiol 1994. American Society for Microbiology. Washington, D.C.
- 57) Anderson DE, Kramp J, Claridge J, Baker MB, Latimer EM, Lyerly DM. Detection and stability of lactoferrin in fecal leukocytes by latex agglutination compared to microscopic evaluation. Abstr. C-398, p. 560. Abstr. 94th Annu Meet Am Soc Microbiol 1994. American Society for Microbiology. Washington, D.C.
- 58) Guerrant RL, Martins C, Silva T. Fecal lactoferrin as a marker of fecal leukocytes. *J Clin Microbiol* 1994;32:2629-30.
- 59) Derisbourg P, Wieruszkeski JM, Montreuil JM, Spik G. Primary structure of glycans isolated from human leukocyte transferrin. *Biochem J* 1990;269:821-5.
- 60) Huicho L. Diagnostic approach to acute infectious diarrhea: the state of the art. *Bull Inst Fr Etudes Andines* 1995;24:317-39.
- 61) Huicho L, Campos M, Rivera J, Guerrant RL. Fecal screening tests in the approach to acute infectious diarrhea: a scientific overview. *Pediatr Infect Dis J* 1996; 15:486-94.
- 62) Light PJ, Pillemer DB. Numbers and narrative: combining their strengths in research reviews. *Harvard Educ Rev* 1982;52:1-26.
- 63) Cooper HM, Rosenthal R. Statistical versus traditional procedures for summarizing research findings. *Psychol Bull* 1980;87:442-9.