



**Universidad Nacional Autónoma de México**

**ESPECIALIDAD EN MEDICINA INTERNA**

**FUNDACIÓN CLÍNICA MÉDICA SUR**

**Epidemiología, Factores de Riesgo y Manifestaciones Clínicas Asociadas al  
Desarrollo de Diarrea Asociada a *Clostridium difficile* un Estudio de Casos y  
Controles en la Fundación Clínica Médica Sur**

**TITULACIÓN POR TESIS**

**QUÉ PARA OPTAR EL GRADO DE:  
ESPECIALISTA EN MEDICINA INTERNA**

**PRESENTA:**

**LUIS ESTEBAN RAMÍREZ GONZÁLEZ**

**TUTOR:**

**NORBERTO CARLOS CHAVEZ TAPIA  
GASTROENTEROLOGIA FUNDACIÓN CLINICA MÉDICA SUR**

**MÉXICO, D.F. NOVIEMBRE 2013**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **Justificación**

Proporcionar información precisa sobre la incidencia de infección de diarrea asociada a *C.difficile* (DACD) en el Hospital Médica Sur, al igual que identificar qué factores riesgo se encuentran asociados a *C.difficile*. Se buscara determinar si la DACD se comporta como un factor independiente de mortalidad

## **Trascendencia**

Complementar la información relacionada con DACD en nuestro país e identificar si está relacionada con una mayor mortalidad e identificar si esta difiere con la existente en otras partes del mundo

## **Introducción general**

La infección por *Clostridium difficile* es una infección de reconocida importancia para el desarrollo de diarrea nosocomial a lo largo del mundo. En Estados Unidos se estima que alrededor de 300,000 pacientes hospitalizados al año presentan DACD en el 2002 se reportó en ese mismo país que el costo anual de DACD se encuentra alrededor de 3,200 millones de dólares al año. Se ha descrito que la colitis asociada a *C.difficile* no solo tiene un costo económico importante para los sistemas de salud a lo largo del mundo sino que también puede ser un factor asociado a mayor mortalidad de los pacientes, en un estudio previo realizado en Canadá muestra que la diarrea asociada a *C.difficile* es un factor independiente de mortalidad encontrando que 1 de cada 10 pacientes que adquiere la infección morirá independientemente de otras comorbilidades.<sup>1</sup>

La incidencia de *C.difficile* ha presentado un aumento desde el año 2001 llegando a tener una mayor incidencia en el año 2003. Este aumento en la incidencia se observó mayormente en personas de más de 65 años, llegando a tener una incidencia de 228 casos por cada 100,000 egresos en este grupo de edad.<sup>2</sup> Los factores asociados a la infección se han asociado en gran medida al uso de antibióticos entre los cuales se han reportado clindamicina, fluoroquinolonas y se ha identificado que la mayor parte de los pacientes tienen antecedente de exposición a antibióticos en las 8 semanas previas al inicio de los síntomas, otros factores del riesgo identificados incluyen a aquellos factores que ocasionan una disrupción en la micro flora colonica, como agentes quimioterapéuticos,

inmunosupresores asociados a trasplante de órgano sólidos o de médula ósea, enfermedad inflamatoria intestinal, hospitalización prolongada, mayor edad y estados de inmunosupresión (VIH y neutropenia)<sup>2</sup>

Se sabe que la enfermedad asociada a *C.difficile* tiene un amplio espectro que incluye desde el portador asintomático, al paciente que presenta diarrea acuosa asociada a dolor abdominal al paciente que presenta evacuaciones con sangre y que puede asociarse a fiebre de alto grado, náusea, malestar general, deshidratación, leucocitosis y llegar a presentar un cuadro de megacolon tóxico, perforación y muerte. Las manifestaciones extraintestinales de *C.difficile* se han descrito raramente entre las cuales se reportan infecciones intraperitoneales, bacteremia, infecciones protésicas.<sup>1</sup>

### **Perspectiva histórica**

*C. difficile* fue descrito inicialmente por Hall y O'Toole en 1935<sup>3</sup> como componente normal de la flora intestinal del recién nacido e inicialmente recibiendo el nombre de *Bacillus difficilie*. Estos investigadores notaron que esta bacteria producía una toxina altamente letal para los ratones, apenas 10-100 veces menos tóxica que la toxina botulínica. Mostró que no tenía características únicas que favorecieran un síndrome tóxico.

Los primeros estudios en donde se describen las características clínicas de la infección por *C.difficile* fueron en modelos animales fue durante la segunda guerra mundial cuando Rake y Hambre<sup>4</sup> al investigar el papel de la penicilina en la gangrena gaseosa en ratones se dieron cuenta que en estos pacientes ocurría una tiflitis que tenía incluso una mayor letalidad que la gangrena gaseosa inducida por *C. perfringens*. Estudios realizados posteriormente describieron la susceptibilidad de los roedores para desarrollar tiflitis relacionada al uso de antibióticos sin embargo la etiología de este cuadro clínico permaneció desconocida<sup>5</sup>.

El primer caso de colitis pseudomembranosa fue descrito en 1893 por Finney quien describió el estudio anatomopatológico de un paciente de 22 años que había sido sometido a cirugía por una úlcera pilórica<sup>6</sup>. Sin embargo esta patología permaneció poco estudiada hasta que empezó a reportarse de manera frecuente por grupos de cirujanos en la década de 1950 como complicación del uso de antibióticos. Con tasas que ocurrían en los pacientes

postquirúrgicos de entre el 14 y 27%. Se pensó que el patógeno causante era *S.aureus* por lo que se iniciaría el tratamiento con vancomicina por vía oral como el tratamiento estándar.<sup>7</sup> Sin embargo la asociación de esta entidad con *S. aureus* pareció atenuarse con el trabajo de Tedesco<sup>8</sup> quien realizó estudios de colonoscopia a pacientes con colitis pseudomembranosa asociada a clindamicina y en quienes los coprocultivos no se encontró desarrollo de *S.aureus*.

En cuanto a detección de *C.difficile* los primeros trabajos involucran especímenes clínicos y modelos en hámster. El trabajo de Chang en 1978 demostró que los especímenes de evacuaciones de hámster que habían desarrollado tiflitis asociada a antibiótico y de los pacientes que desarrollaron colitis pseudomembranosa, contenía una potente toxina citopática que era neutralizada por la antitoxina de *C. sordellii*.<sup>9</sup> Sin embargo Bartlett demostró que en el cultivo de las evacuaciones de hámster no se había desarrollado *C. sordellii*<sup>10</sup>, posteriormente se realizó un análisis de que otras especies podrían cumplir con las características requeridas y fue *C. difficile* quien cumplía con estos criterios.<sup>5</sup> En los trabajos iniciales realizados en roedores no se describió el papel de esta infección en las infecciones nosocomiales. Si bien la presencia de este patógeno fue descrita en un grupo de pacientes quirúrgicos en un grupo de pacientes quirúrgicos en Birmingham Inglaterra en 1978<sup>9</sup>. La relevancia de *C. difficile* comenzó a reportarse a principios de la década de los 80 en donde se realizó el aislamiento de esta bacteria en contactos de pacientes hospitalizados<sup>11</sup>.

En los siguientes años la diarrea asociada a *C.difficile* se reconoció como un patógeno nosocomial causante de un importante costo para los sistemas de salud reportándose en el año 2000 en Estados Unidos 3.82 casos por cada 1000 egresos hospitalarios. Sin embargo fue a mediados de durante la década pasada que se describió un aumento en la incidencia y la severidad de la infección a nivel global llegando a reportarse en 2008 8.75 casos por 1000 egresos<sup>12</sup>. A partir de la proliferación de una cepa hipervirulenta que fue denominada por sus características biomoleculares como B1/NAP1/027<sup>13</sup>

En la actualidad en algunos países europeos se ha empezado a notar una disminución en prevalencia de esta cepa sin embargo la epidemiología molecular es diversa y dinámica con algunas cepas generando a lo largo del mundo brotes de infección<sup>14</sup>. Por esto se espera que

*C. difficile* siga siendo un patógeno causante de infecciones nosocomiales relacionado con altos costos al sistema de salud y un mayor tiempo de estancia hospitalaria.

## **Microbiología**

*Clostridium difficile* es un bacilo gram positivo anaeróbico formador de esporas que son altamente resistentes a la desecación, a químicos y temperaturas extremas, las esporas frecuentemente contaminan el ambiente alrededor de los pacientes potencialmente persistiendo por meses o por años. Al igual que otras bacterias pertenecientes al género *Clostridium* es productor de histotoxinas, porteadas y a diferencia de la mayoría de las bacterias de su género es productor de enterotoxinas<sup>15</sup> siendo los mayores factores de virulencia toxina A, B y la toxina binaria que son producidas por cepas patogénicas de la bacteria.

## **Toxinas**

Tanto la toxina A y B pertenecen al grupo de toxinas grandes de clostridium que incluye a las toxinas de *C. sordellii*, *C. novyi* y *C. perfringens*.<sup>16</sup> Estas comparten un componente principal de la toxina conocida como toxina grande compuesta de tres dominios principales, el amino terminal cuyas características se repiten, el dominio carboxiterminal que tiene funciones catalíticas y el dominio de translocación putativa.<sup>17</sup> La toxina grande de clostridium, glucosila GTPasas pequeñas de la familia Rho y Ras en las células del huésped lo que lleva a a inactivación y lleva a cambios en el citoesqueleto.<sup>18</sup> Las toxinas A y B causan disrupción de la actina del citoesqueleto lo que resulta en una disminución en la resistencia transepitelial y destrucción del epitelio intestinal. La respuesta inmunitaria innata que es activada por la glucosiltransferasa de las toxina A y B incluyen el factor nuclear kappa B y la MAP quinasa, los monocitos y macrófagos son activados y una gran variedad de citocinas pro inflamatorias incluyendo IL-1B o TNF alfa e IL 8.<sup>19</sup> La respuesta inflamatoria intensa parece ser un factor de riesgo principal para causar daño intestinal, la colitis aguda con pseudomembranas y la infiltración neutrofílica importante del epitelio colonico y submucosa es característico de la DACD severa. Un marcado aumento en los neutrófilos en sangre periférica es una característica de DACD severa y está ligada al pronóstico.<sup>20</sup>

Se han llevado a cabo estudios con el fin de determinar la importancia particular de la toxina A y B en el desarrollo de la enfermedad en ocasiones con resultados contradictorios. En un estudio en roedores se mostró que la toxina B de *C.difficile* mostro ser un factor de virulencia esencial para roedores.<sup>21</sup> Sin embargo otro estudio realizado en modelos animales<sup>22</sup> demostró que ambas toxinas son factores importantes de virulencia. En un estudio publicado en 2013 realizado en cerdos con anticuerpos monoclonales humanizados administrados intraperitonealmente dirigidos contra una de las toxinas de la bacteria mostro que aquellos anticuerpos dirigidos contra la toxina B sola o en combinación con toxina A protegía a los animales del desarrollo de síntomas sistémicos y minimizaba las lesiones GI y a aquellos animales a los que se les administraban anticuerpos dirigidos contra toxina A exclusivamente desarrollaban en un 100% síntomas de la enfermedad.<sup>23</sup> Sin embargo los estudios mostrados siguen siendo en modelos animales y no existe evidencia definitiva para que ninguna toxina puede ser ignorada en términos de importancia en la patogénesis de la enfermedad o en el desarrollo de nuevos tratamientos.

La toxina binaria de *C.difficile* es una toxina perteneciente al grupo de toxinas binarias y no está relacionada al grupo de toxina A y B y está compuesta por dos proteínas CdtA y CdtB . CdtB se une a la célula del huésped trasladando a CdtA en el citosol siendo esta última el componente catalítico donde ribosila las moléculas de actina. Interesantemente la toxina binaria esta usualmente producida por cepas de *C.difficile* productores de toxina A y B variantes pero aun funcionales. El papel de la toxina binaria no está bien definido se ha observado toxicidad in vitro a cultivos celulares y ha mostrado ser enterotóxico en modelos de conejos. Sin embargo se ha visto que cepas que producen toxina binaria en hamsters colonizan pero no son capaces de producir enfermedad en estos animales<sup>20</sup>

### **Respuesta inmunitaria**

El 60% de los niños sanos o adultos tienen anticuerpos IgG o IgA contra las toxinas A y B de este microorganismo incluso en ausencia de colonización o infección activa<sup>24</sup> parece que la producción de anticuerpos se origina en la infancia se perpetua en la edad adulta. O que otras especies de clostridium como *C. sordelli* poseen reactividad antigénica cruzada.<sup>25</sup> Se conoce que aquellos pacientes hospitalizados que recibían antibiótico de amplio espectro aquellos que tenían títulos de IgG contra toxina A y B era menos probable que

desarrollaran enfermedad sin embargo por el pequeño tamaño de la muestra no fue estadísticamente significativo. En este estudio se observó también que los niveles de IgG no variaron entre comorbilidades edad, sin embargo la protección de los anticuerpos pareció ser menso marcada en pacientes críticamente enfermos.<sup>26</sup> En el estudio Sanchez Hurtado se encontró que los títulos séricos de IgG e IgM dirigidos contra toxina A fue similar en pacientes colonizados con aquellos controles con y sin síntomas. Sin embargo se concluye que estos títulos pueden variar a lo largo del tiempo.<sup>27</sup>

En un estudio realizado por Kyne en 2001<sup>28</sup>. Se midieron al tercer día los anticuerpos de tipo IgM contra antígenos no toxigenicos al igual que la toxina A y B y se observó que al tercer día los anticuerpos eran significativamente más altos en quienes presentarían un episodio único que aquellos quien presentaría recurrencias. Lo mismo ocurrió contra anticuerpos IgG al día 12. Las proteínas de membrana de *C. difficile* tienen un papel que tanto *in vitro* como *in vivo* han mostrado tienen propiedades adhesivas que juegan un papel en la adhesión bacteriana y podrían jugar un papel importante en la colonización. Un estudio realizado por Drudy.<sup>29</sup> Se demostró que los anticuerpos contra las proteínas de membrana de clostridium eran similares en pacientes con DACD, portadores asintomáticos y controles. Pero se observó que aquellos con enfermedad recurrente tenían un nivel menor de IgM que los que presentaban un episodio único.

Con los estudios antes realizados se reconoció la relevancia de los anticuerpos contra antígenos toxigenicos y no toxigenicos y de aquí la importancia de los estudios inmunológicos que se desarrollan en animales y en humanos con el fin de desarrollar vacunas. Las vacunas contra los antígenos de superficie están siendo desarrolladas en animales y se prevé la reducción en la adhesión. Por el momento se ha demostrado que la administración de anticuerpos antitoxina tanto oral como parenteral han mostrado y se ha mostrado protección en cuanto a la diarrea asociada a *C.difficile*. Estudios realizados en hamsters sugieren que la antitoxina de anticuerpos humanizados dirigidos contra la toxina A reduce la mortalidad y recurrencia<sup>30</sup>

Se ha estudiado en animales la administración de toxoides tanto parenterales como subcutáneos. La administración de antígenos recombinantes dirigidos contra la porción que se une a la célula de la toxina A, mostro proteger parcialmente contra la diarrea y muerte<sup>31</sup>

A pesar de los resultados exitosos en animales el uso de anticuerpos contra toxina A y B no ha mostrado ser efectiva y no se ha desarrollado en humanos. El primer candidato para vacuna en humanos fue un toxoide que contenía toxinas A y B inactivadas que fueron administradas IM en voluntarios sanos y que mostraron ser segura y bien toleradas con formación de títulos de anticuerpos. La vacunación también fue efectiva a al tratar un pequeño número de pacientes enfermedad recurrente.<sup>32</sup> Si bien la vacunación a la población general luce como costosa y poco factible, los estudios farmacoeconomicos muestran que las vacunas podrían ser efectivas en población de alto riesgo.<sup>33</sup>

### **Reservorios de *C.difficile* en naturaleza**

La transmisión a través de los alimentos de *C.difficile* ha sido hipotetizada como una fuente de infecciones adquiridas en la comunidad, posiblemente explicando el aumento en la incidencia de diarrea asociada a clostridium en poblaciones antes consideradas como de bajo riesgo.<sup>34</sup> *C.difficile* ha sido aislado de productos cárnicos en EUA<sup>35</sup>, Canada<sup>36</sup> y Europa<sup>37</sup>. En Holanda se identificó mediante PCR de ribotipos que algunas cepas encontradas en animales coincidían con cepas encontradas en pacientes hospitalizados.<sup>38</sup> La evidencia del impacto de la transmisión a través de los alimentos aun es limitada y se requiere más investigación.

Otro grupo poblacional del que se ha estudiado un posible papel como reservorio de esta bacteria es el grupo de los neonatos son el único grupo poblacional con una gran cantidad de portadores asintomáticos pero los casos en esta edad son excepcionales probablemente por la ausencia de receptores. Es una causa de diarrea infantil. Las tasas de colonización son del 40 a 60% neonatos y tan solo de 2-3% en individuos mayores de 2 años.<sup>39</sup> Aun no se ha aclarado el papel que tienen como reservorios de la infección.

### **Epidemiologia**

Desde que Bartlett describió la relación de *C.difficile* con la colitis pseudomembranosa la patología mundial ha cambiado radicalmente. En el año 2000 se reportaban en EUA 3.82 casos por 1000 en 2000 y 8.75 por 1000 en 2008. El número total de casos reportados Estados Unidos en ese mismo año según el ICD-9 Fueron 348,950 casos de DACD de los cuales 340,401 casos involucraron a pacientes mayores a 18 años. Y el diagnóstico de

DACD fue el diagnóstico principal en 113,956 egresos. La mortalidad ajustada por *C.difficile* incremento de 2.0 muertes por 100,000 en 2007 a 2.3 muertes por 100,000 en 2008. Lo que representanta un incremento del 15%. Se encontró que 93% de las muertes ocurrió en personas mayores de 65 años y fue reportada como la causa número 18 de mortalidad en este grupo de edad. En cuanto a las mujeres periparto se vio que la DACD se mantuvo estable hasta 2004 cuando incremento de .04 a .07 por cada 1000 egresos en 2006. De las 1706 mujeres que recibieron el diagnóstico de DACD, 67% se les realizo cesárea que podría ser una marcador surrogado de exposición antimicrobiana.<sup>40</sup>

El incremento en la incidencia de DACD a mediados de la década pasada así como el aumento en la severidad del cuadro clínico fue atribuida a la emergencia de una cepa denominada análisis de endonucleasa de restricción tipo B1, electroforesis de gel de campo pulsado tipo norteamericana tipo 1, ribotipo 027 por PCR, (B1/NAP1/027). Distintas características encontradas pueden contribuir a su hipervirulencia incluyendo polimorfismo, en una producción a la baja de toxinas, con un incremento en la producción de toxinas, la presencia de un gen que codifica a toxina binaria, una alta resistencia a fluoroquinolonas y uso de polimorfismos en de toxina B que resultan en un aumento en la unión de toxinas a las células intestinales.<sup>41</sup>

En América Latina el interés por la DACD se ha desarrollado de manera más lenta que en otras partes del mundo, este articulo hace énfasis en las características microbiológicas de los pacientes afectados por *C. difficile*. Y se buscaron estudios en distintas décadas. Los primeros estudios de *C. difficile* en Latinoamérica en donde se estudió realizo cultivo, en estos niños se encontró *C.difficile* en 23% de los caso.<sup>42</sup> Sin embargo en niños sin diarrea se encontró *C.difficile* 20%. En esta misma década se examinaron en otro estudia las cepas aisladas de *C.difficile* y se estableció un predominio de cepas no toxigenica<sup>43</sup>

La mayoría de los países de Latinoamérica no se encuentra información epidemiológica de la mayoría de los países, hay información disponible de menos de un tercio de los países de Latinoamérica. La mayor parte de los estudios son estudios epidemiológicos en pacientes hospitalizados, la mayoría de estos estudios tiene una media de edad menor de 60 años y cuantan en su mayoría con población del genero femenino<sup>42</sup>. La cantidad de pacientes estudiados varía entre 16 a 113 pacientes. La mortalidad asociada a DACD no rebaso 4%

en todos los estudios. En estos estudios destaca que el número de pacientes que recibieron antibióticos antibiótico previo al diagnóstico variaba entre 79 a 100% de los casos, los antibióticos más frecuentemente asociados fueron ciprofloxacino, clindamicina y cefalosporinas. En el estudio mexicano destaca que la clindamicina y cefepime fueron los antibióticos más frecuentemente asociados.<sup>42</sup>

Epidemiología molecular en Latinoamérica es escasa, un estudio realizado en Brasil, se encontró que en 35 aislamientos clínicos provenientes de niños de Sao Paulo y cuatro muestras ambientales se encontraron 12 ribotipos distintos de los cuales 7 fueron considerados nuevos.<sup>44</sup>

Actualmente la DACD tiene un costo económico muy importante a nivel mundial, sin embargo la mayor parte de la información proviene de Estados Unidos. En el 2008 Dubberke estimó que los pacientes que presentaban infección intrahospitalaria incrementaba los costos en 41% y el costo atribuible por caso era 3006 USD<sup>45</sup> y que el costo anual que traía al sistema de salud americano era de 1 billon de dólares. El estudio de Kyne<sup>46</sup> y colaboradores mostro un costo aun mayor estimando que los pacientes con DACD presentaban una hospitalización en promedio 3.6 días más prolongada con un incremento en 54% de los costos, con un costo atribuible por caso de 7,000 USD, estimando el costo total al sistema de salud de 2.4 billones de dólares. La mayoría de los estudios realizados ha estado limitado por un pequeño tamaño de la muestra y por la dificultad de controlar adecuadamente los confusores. Es probable que la carga total del sistema de salud este subestimada debido a que la mayoría de los estudios están basados en DACD diagnosticada y tratada en el hospital.<sup>46</sup>

En hogares de cuidados prolongados: En EUA 32% de los pacientes con DACD son egresados a hogares de cuidados prolongados comparados con 23% de los pacientes que no tienen DACD. Esto incremento el costo de sistema de salud. En base al número de egresos con DACD en 2008 esto se traduce como en más de 30,600 egresos a unidades de cuidados prolongados con un costo diario de 192 USD por habitante.<sup>47</sup> con una estancia promedio de 24 días lo que se traduce en un costo adicional de 141 millones de dólares anuales.<sup>48</sup> En base al número de egresos con DACD en 2008 esto se traduce como en más de 30,600 egresos a unidades de cuidados prolongados con un costo diario de 192 USD por habitante,

con una estancia promedio de 24 días lo que se traduce en un costo adicional de 141 millones de dólares anuales.<sup>49</sup>

Costo de la enfermedad recurrente: En EUA se realizó un estudio que trato de valorar el costo por recurrencia y se estimó un costo promedio de 17,493 USD por recurrencia. El tiempo medio de estancia hospitalaria fue 8.8 días +/- 8.6 días.<sup>50</sup>

### **Epidemiología en México y América Latina**

En México se realizó un estudio que aborda el problema, en 2008 Camacho y Cols.<sup>51</sup> Realizaron un estudio de casos y controles con 113 pacientes adultos hospitalizados positivos para toxina A de *C.difficile* en los que se encontró que la mediana de edad de los pacientes afectados era de 52 años siendo el 39% de los afectados mayores a 60 años, el 90.2% habían recibido antibioticoterapia previo al diagnóstico siendo los antibióticos más frecuentemente asociados clindamicina y cefepime, se reportó y teniendo una mortalidad asociada al padecimiento de 0%. En este estudio se realizó un análisis multivariado encontrado como los factores asociados fue el uso de bloqueadores H2 (OR: 21.7), edad menor de 65 años(10.2), hospitalización durante más de 12 semanas (4.4) , uso previo de cefalosporinas (3.4) y fluoroquinolonas (3.1), estancia en UTI (2.7). Este estudio reporta una mayor prevalencia de la enfermedad en población menor de 65 años contrario a lo que se ha reportado en otros estudios a nivel mundial, esto posiblemente por la alta prevalencia de pacientes con VIH y enfermedades autoinmunes en la población incluida en este estudio<sup>51</sup>.

### **Factores de riesgo asociados a *C. difficile***

Los factores de riesgo descritos en muchos estudios son uso de antibióticos, tiempo de admisión, uso prolongado y múltiple de antibiótico, edad avanzada, comorbilidades, cirugía gastrointestinal colocación de SNG. De los factores de riesgo uno que ha estado ampliamente relacionado con la enfermedad desde sus primeras descripciones ha sido el uso de, el trabajo de Tedesco<sup>8</sup> identificó a la clindamicina como el antibiótico principalmente relacionado, sin embargo la mayoría de los estudios realizados a partir de 1980 mostro que las cefalosporinas eran los agentes más frecuentemente implicados, seguidos de penicilinas de betalactamicos de amplio espectro.<sup>1</sup> Otros antibióticos como

macrolidos, trimetoprim/sulfametoxazol, metronidazol tetraciclinas y rifampicina fueron asociadas en mucho menor medida. Las fluoroquinolonas no figuraron en los medicamentos más asociados hasta recientemente. Otros medicamentos conocidos por inducir DACD incluyen inmunosupresores como el metorexato.<sup>15</sup>

La presencia de enfermedad inflamatoria intestinal también se ha catalogado como un factor de riesgo para el desarrollo de diarrea asociada a clostridium sobre todo aquellos pacientes con uso de corticosteroides y puede llegar a ser complicado la distinción entre una exacerbación de enfermedad inflamatoria y diarrea asociada a clostridium.<sup>52</sup> Las guías de tratamiento publicadas en el American Journal of Gastroenterology sugieren que todo paciente con enfermedad inflamatoria que se hospitalice o se le de terapia ambulatoria y tenga factores de riesgo para *C.difficile* como uso reciente de antibióticos u hospitalización reciente o empeoramiento de la sintomatología en el contexto de una enfermedad previamente controlada se le realicen pruebas diagnósticas para *C.difficile*. Estas guías también recomiendan dar tratamiento empírico para *C.difficile* en pacientes con exacerbación grave de enfermedad inflamatoria intestinal en lo que se obtienen pruebas de laboratorio.<sup>53</sup>

### **Factores de riesgo para desarrollo de *C. difficile* en la comunidad**

Actualmente el papel de la enfermedad adquirida en la comunidad tiene un papel importante en la DACD incluso en personas sin factores de riesgo considerados como tradicionales incluyendo personas sin exposición reciente a antibióticos.<sup>54</sup> Estos reportes sugieren que los casos de DACD adquirida en la comunidad ocurren en personas más jóvenes y con menos comorbilidades que las personas con enfermedad adquirida o relacionada a hospitalizaciones previas<sup>55</sup> Un estudio realizado por Kuntz en 2011.<sup>56</sup> En este estudio se determinó que los pacientes que desarrollaban DACD adquirida en la comunidad tiene una mayor probabilidad de haber recibido antibioticoterapia 180 días previos a su ingreso siendo los medicamentos asociados los beta lactamicos, cefalosporinas, clindamicina, fluoroquinolonas y macrolidos. Sin embargo 27% de los pacientes no tuvieron antecedente de haber recibido antibiótico y 17% no contaban con factores de riesgo tradicionales (uso de antimicrobianos, uso de antiácidos, enfermedades sistémicas o

antecedentes de hospitalización). Sin embargo la identificación de otros factores no identificados que favorezcan la infección permanece desconocido.<sup>56</sup>

### **Manifestaciones clínicas**

El cuadro clínico es altamente variable uno de los hallazgos más frecuentemente encontrados es la diarrea en el cual el número de evacuaciones puede llegar a alcanzar 15-30 evacuaciones por día, evacuaciones. Dolor abdominal que generalmente se encuentra en cuadrantes inferiores. La fiebre está presente aunque es de bajo grado pero puede ser mayor a 40 C, la cuenta leucocitaria usualmente va de 10-20 mil, pero puede estar en rango leucemoide.<sup>1</sup> Hallazgo que también puede verse en infección por *C. sodrelii*. La hipalbuminemia es común al ser esta entidad una causa de enteropatía perdedora de proteínas.<sup>53</sup>

A pesar de que tradicionalmente la infección asociada a *C. difficile* se caracterice por diarrea generalmente inflamatoria. Existen algunos reportes de casos de ileitis en pacientes con antecedente de colectomía<sup>57</sup>, otro tipo de manifestaciones clínicas reportadas en la literatura. Un estudio reciente realizado por Mattila en 2013<sup>58</sup>. Encontró en un periodo de 10 años 31 casos de enfermedad extra intestinal por *C.difficile* lo que representa .17% de los casos de la enfermedad lo que se traslada a una incidencia de .2 a 100,000 años personas. En este estudio 45% de las infecciones extra intestinales estuvieron asociadas a cirugía intestinal y se presentaron como infecciones abdominales, en un pequeño porcentaje se reportaron bacteremias relacionadas con *C.difficile* e infecciones de herida quirúrgica y de úlcera sacra, cabe destacar que una buena proporción de estos pacientes tenían antecedente de abuso de alcohol.<sup>58</sup>

El espectro de la severidad de la enfermedad se cataloga de distinta manera de acuerdo a las distintas guías clínicas.

La IDSA cataloga la severidad de la infección de en leve o moderada, grave y grave complicada. Clasificando la enfermedad en base a dos parámetros de laboratorio la cifra de leucocitos, el valor de creatinina y su relación con el nivel pre mórbido. La enfermedad leve o moderada se define cuando se encuentra una cuenta leucocitaria menor a 15,000 y una elevación de creatinina sérica menos de 1.5 veces el nivel premorbido. Mientras que

enfermedad grave se considera la presencia de alguno de los criterios anteriores. El criterio de enfermedad grave complicado está dado por la presencia de hipotensión o choque y/o la presencia de megacolon o ileo.<sup>59</sup>

Las guías de práctica clínica para el diagnóstico tratamiento y prevención de las infecciones por *C.difficile* publicadas en el Journal Americano de Gastroenterologia son las guías más recientes publicadas hasta la fecha para el manejo de la enfermedad. Al igual que las guías de la IDSA que clasifica la enfermedad en tres grupos leve-moderada, grave y grave y complicada. Sin embargo a diferencia de las guías anteriormente comentadas en estas la creatinina no se toma como un valor de gravedad y se incluyen otras variables. Se define enfermedad como enfermedad leve-moderada a la presencia de diarrea con o sin síntomas que no clasifiquen al paciente como con enfermedad severa, la enfermedad grave se clasifica define por la presencia de hipoalbuminemia (menor a 3 mg/dl) adicionalmente se requieren más de 15,000 leucocitos o la existencia de rigidez abdominal. LA enfermedad grave y complicada se define como la presencia de los síntomas anteriormente descritos asociado a alguno de los siguientes: Ingreso a UTI, hipotensión con requerimiento de vasopresor, fiebre mayor de 38.5, ileo, o distensión abdominal cambio en el estado mental, leucocitos mayor a 35,000 o menos de 2000, lactato mayor a 2.2 mmol/L o evidencia de falla organico.<sup>53</sup>

### **Enfermedad recurrente**

La recurrencia de la DACD se ha estimado en un 20% de los pacientes con un primer episodio desarrollan recurrencias. Sin embargo el desarrollo de cepas hipervirulentas han hecho más común el número de recurrencias llegando a presentar recurrencias hasta del 33% con un 11% de recurrencias siendo severas.<sup>60</sup> La recurrencia después de un segundo episodio llega a ser incluso más alta llegando a presentarse en un 45% de los casos.<sup>61</sup>

Las recurrencias pueden ser atribuibles a la persistencia de una sepa endógena de *C. difficile* o a la reinfección en donde hay adquisición de una sepa nueva por una fuente exógena. El tiempo medio para la recurrencia es de 1-5 días mientras que para la reinfección es de 42.5 días.<sup>62</sup> Estudios han demostrado que la enfermedad recurrente puede ser atribuible a una nueva cepa entre el 33-75% de los casos.<sup>63</sup>

Entre los factores predictores de recurrencia se encuentran la edad avanzada especialmente en aquellos pacientes arriba de 65 años<sup>64</sup>. Otros factores que se han estudiado son el uso de cefalosporina, fluoroquinolonas, clindamicina e inhibidores de bombas de protones.<sup>65</sup> Se ha establecido que los pacientes que con una flora colonica normal tienen diversidad bacteriana entre estos entre los organismos presentes los anaerobios tienen un papel importante sobre todo los microorganismos pertenecientes al filo de de los *Bacteroides* y los *Firmicutes*. Los pacientes con recurrencias tienen una escasa diversidad de estos microorganismos. Debido a que los anaerobios juegan un papel en el colon normal se ha postulado que antibióticos que pueden tener un efecto en estos microorganismos como metronidazol o vancomicina pueden precipitar también la recurrencia de la enfermedad.<sup>66</sup>

### **Marcadores de inflamación**

Incluso con terapia antibiótica de 10 a 15 días hay recurrencias en 22% de los pacientes, y una proporción importante tienen síntomas con 5 a 6 días del tratamiento. Varios scores de severidad han intentado clasificar a los pacientes en base a la severidad, pero pocos han identificado a los pacientes que tienen riesgo de presentar una pobre respuesta al tratamiento.<sup>67</sup>

Este estudio publicado en el hospital Barnes de San Luis Missouri en los pacientes hospitalizados que tenían diarrea y una toxina A/B positiva investigo la presencia de IL-8 y CXCL-5 mRNA como marcadores inflamatorios, en este estudio se encontró el tiempo de resolución de diarrea fue mayor en pacientes con niveles mas altos de cxcl-5 mRNA e IL-8 al inicio del estudio, un subanálisis demostró que solo es aplicable a no inmunocomprometidos y que el valor de CXCL-5 mRNA no se modifica con el tratamiento a diferencia de los niveles IL-8.<sup>68</sup> Este estudio encontró que algunos marcadores los marcadores fecales inflamatorios al momento del diagnóstico se relacionan con sin embargo se requiere una mayor accesibilidad de ellas y la realización de más estudios.

### **Diagnóstico diferencial**

Si bien el cuadro clínico de de diarrea nosocomial esta comúnmente asociado a *C. difficile* se estima que el 12-32% de los pacientes hospitalizados tendrán diarrea y de estos menos del 20% tendrá diarrea asociada a *C. difficile*.<sup>69</sup> A diferencia de la diarrea adquirida en la

nosocomial donde los agentes infecciosos juegan un papel muy importante. En la diarrea nosocomial se tienen una proporción menor de casos atribuibles a infección, se sabe que más de 700 medicamentos causan diarrea como efecto adverso,<sup>70</sup> La nutrición enteral representa la mayor parte de los casos de diarrea en pacientes hospitalizados, especialmente en áreas de cuidados intensivos y áreas de pacientes oncológicos. La diarrea asociada a medicamentos generalmente es no inflamatoria aunque se han descrito casos de diarrea inflamatoria. Especialmente con los inmunosupresores y con la quimioterapia y antibióticos. Se estima que hasta el 25% de la diarrea nosocomial se asocian a antibiótico.<sup>71</sup>

Entre las causas infecciosas de diarrea nosocomial diferentes de *C.difficile* hay otros microorganismos también asociados a uso de antibióticos que pueden originar diarrea

*K. oxytoca* produce una toxina que evita la síntesis de DNA, se estima que esta bacteria origina 50-80% de los casos de colitis hemorrágica posterior a antibióticos negativa para *C. difficile*. Se ha reportado su presencia en 16.7% de los pacientes con diarrea sanguinolenta hospitalizados y ninguna en diarrea no sanguinolenta. Los síntomas desaparecen con suspensión del antibiótico y la terapia dirigida no está recomendada.<sup>72</sup>

*C. perfringens*: Es una causa establecida de intoxicación alimentaria. La información disponible reporta que 1-3% de los pacientes con diarrea nosocomial podrían tener *C.perfringens* como una etiología explicable. La diarrea tiene una mediana de duración de 7 días, un 20% de los pacientes presentaba más de 10 evacuaciones por día. Estos pacientes tienen una buena respuesta a metronidazol.<sup>73</sup>

*C.difficile* es la causa más común pero no es la única causa de colitis pseudomembranosa, otras causas con obstrucción intestinal, cáncer de colon, leucemia, quemaduras severas, estado de choque uremia, enfermedad de Crohn, shigelosis, colitis isquémica. Las lesiones están detectadas de mejor manera por colonoscopia en 20-30% de los casos se limitan al colon proximal.<sup>5</sup>

### **Causas de mortalidad en pacientes con *C.difficile***

La mortalidad relacionada a *C.difficile* es difícil de reportar objetivamente debido a la existencia de comorbilidades que son factores de riesgo para el desarrollo de enfermedad.

Se conoce que la mortalidad puede aumentar en epidemias llegando a cuadruplicarse.<sup>74</sup> En estos periodos en donde la mortalidad relacionada con la enfermedad a 30 días llega a ser de 14 a 19%.<sup>75</sup> Un estudio multicentrico de casos y controles llevado a cabo por Hensgens en Holanda<sup>76</sup> en el que se comparaban pacientes con *C.difficile* confirmado contra pacientes con diarrea esto revelo que la mortalidad global fue de 13% después de 30 días y 37% a 1 año. La mortalidad más alta se vio en pacientes ancianos en particular en aquellos arriba de 80 años y que tenían el ribotipo 027.

En este mismo estudio las comorbilidades asociadas este estudio tuvo una mayor cantidad de neoplasias, enfermedades respiratorias, enfermedades digestivas, enfermedades cardiovasculares 50%. Al compararse la mortalidad a 30 días, la mortalidad fue similar en grupo control 14.8%, y 13.1% en grupo testigo. La mortalidad a 30. Sin embargo la mortalidad de los pacientes con diarrea fue significativamente menor. Se mostro que la mayor mortalidad se presentó a los 30 días de la hospitalización, la mortalidad posterior a los 90 días fue pequeña.<sup>76</sup> Aunque la mortalidad a 1 año fue 50% más alta ya ajustada a los controles. El riesgo de mortalidad a un año fue de 10%. Según el reporte de los certificados de defunción 3.7% murieron a consecuencia de DACD. Esto es mucho menos que el riesgo relativo de mortalidad que es del 10%. La mayoría muriendo a los 30 días. El autor atribuye esta diferencia en mortalidad a los datos poco específicos del certificado de defunción, la mayoría de las muertes fueron atribuidas a causas cardiovasculares o neoplásicas.<sup>77</sup> Algunos estudios han tratado de relacionar la relación entre las distintas cepas de *C.difficile* y mortalidad en un estudio realizado por Walker en el Reino Unido<sup>77</sup> en un periodo de 5 años reporto que los ribotipos el 27 y el 78 mostraron encontrarse asociados a una mayor mortalidad a 14 días, teniendo una mortalidad ajustada del 12%

### **Métodos diagnósticos**

El diagnóstico de DACD es en base del cuadro clínico y los estudios de laboratorio. Solo las cepas toxigenicas de *C.difficile* causan enfermedad por la producción de toxina A y/o B, la detección de estas toxinas en muestras fecales es pieza clave en el diagnóstico de laboratorio. El cultivo celular se ha hecho como el método de referencia para la detección de *C.difficile*.<sup>77</sup> Esta estrategia diagnostica sin embargo consume tiempo y es compleja para utilizarla de manera rutinaria en la práctica clínica. La PCR en tiempo real es una estrategia

que detecta los genes cromosómicos que codifican las toxinas A y B o los genes reguladores de estas toxinas en muestras de excremento reciente ha reportado una sensibilidad media del 90% con una especificidad del 96%.<sup>78</sup> Adicionalmente la detección simultánea del ribotipo 027 es posible, haciendo esta técnica una estrategia útil para estudios de vigilancia epidemiológica.<sup>79</sup>

**Inmunoensayo:** Inicialmente desarrollado hace más de 25 años fue diseñado para detectar toxina A, desde entonces se han desarrollado pruebas que detectan toxina A, toxina B, Deshidrogenasa de glutamato o una combinación de algunos o de todos. Esta ha sido el abordaje de diagnósticos más utilizados en laboratorios de microbiología.<sup>80</sup> Al compararse con cultivos o con cultivos celulares este método diagnóstico es más rápido y menos laborioso y puede ser desarrollado por técnicos que carecen de entrenamiento en cultivos celulares. Sin embargo se ha hecho claro recientemente que este estudio carece de sensibilidad adecuada para que sea considerado como una modalidad de diagnóstico única.<sup>81</sup> El inmunoensayo que detecta deshidrogenasa de glutamato es un poco más sensible pero menos específico debido a que es producida tanto por cepas toxigenicas como no toxigenicas así como de especies relacionadas con *Clostridium*.<sup>82</sup> Las guías existentes especifican que a pesar de la sensibilidad suboptima de la prueba las guías de práctica clínica desaconsejan la toma repetida de una segunda toma. Esto debido a que en menos de 5% de los casos la prueba se va reportar como positiva si ya previamente era negativa y se incrementa la probabilidad de presentar un falso positivo.<sup>83</sup>

**Ensayos moleculares:** Las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos fueron desarrolladas hace más de 15 años, pero el interés en la práctica clínica ha venido incrementando debido a la importancia clínica y epidemiológica que tiene la diarrea asociada a clostridium.<sup>84</sup> Actualmente aprobado por la FDA existen múltiples kits diagnósticos, adicionalmente varios laboratorios han desarrollado pruebas de PCR que están diseñados para detectar el gen de la toxina B. Estos ensayos por lo general toman algunas horas en generar resultados.<sup>85</sup> La mayoría de las pruebas aprobadas por la FDA son mucho más sensibles que el inmunoensayo basado en toxinas teniendo una sensibilidad de alrededor del 90% comparado con métodos de cultivo y demuestran alta especificidad<sup>86</sup>. Algunos estudios también han demostrado que la prueba de amplificación de ácidos

nucleicos tienen mayor sensibilidad que la detección de deshidrogenasa de glutamato por inmunoensayo. Se ha mostrado que los métodos de detección de antígenos fluctúan a razón de los genotipos, mientras que el ensayo de amplificación de ácidos nucleicos no exhibe la misma variabilidad.<sup>87</sup> A pesar de muchas características favorables estos no son métodos perfectos, estas técnicas detectan la presencia de genes relacionados con toxinas en evacuaciones y no la presencia de la toxina, pueden tener una alta tasa de falsos positivos considerando que el 50% de los pacientes institucionalizados pueden estar colonizados asintóticamente para *C. difficile* toxigenico. Debido a que es probable que la colonización asintomática de *C.difficile* toxigenico proteja al organismo de desarrollar diarrea asociada a *C.difficile* el tratamiento podría poner al paciente en mayor riesgo de presentar la enfermedad.<sup>87</sup> Otra desventaja de este método es el costo, estos ensayos pueden ser hasta 10 veces más caros que el inmunoensayo y los métodos de cultivo celular. A pesar de las desventajas las últimas guías de práctica clínica consideran a los estudios de amplificación de ácidos nucleicos como superior al inmunoensayo de toxinas A y B como estándar de diagnóstico, incluso superior al uso de pruebas de tamizaje con deshidrogenasa de glutamato y toxinas.<sup>88</sup>

Cultivo toxigenico: Aunque impráctico para uso clínico, el medio selectivo para el desarrollo de *C.difficile* se encuentra disponible.<sup>89</sup> La mejora en los métodos de cultivo ha incrementado la recuperación de *C.difficile* desde especímenes en evacuaciones, esto incluye técnicas de enriquecimiento de medio y medios líquidos.<sup>90</sup> Debido a que la selectividad del medio es imperfecto y del hecho de que se desarrollen cepas toxigenicas como no toxigenicas, todo desarrollo de *C.difficile* debe ser subcultivado y una prueba confirmatoria debe de ser realizada para detectar la presencia de genes de toxinas o expresión de toxinas. Sin embargo este proceso consume mucho tiempo y el proceso tiene una duración de alrededor de una semana.<sup>91</sup> Por lo que el cultivo de evacuaciones se utiliza principalmente en el área de investigación aunque muestra un mejor desempeño que ensayos más rápidos.<sup>92</sup>

Ensayo de neutralización de citotoxinas: El ensayo de citotoxicidad directa se basa en la neutralización de la toxina B de *C. difficile*. Antes de la identificación de *C. difficile*. Una de las primeras pruebas de laboratorio fue el análisis de citotoxicidad en la neutralización de

la citotoxina de *C.sordellii* evitaba los cambios citopáticos.<sup>93</sup> Este método se fundamenta en que las células no intestinales son 1000 veces más sensibles a las toxinas que las células intestinales, ante todo se requieren 24-48 hrs para observar los cambios citopáticos y confirmar el diagnóstico. Este método detecta toxina a nivel de picogramos en muestras de evacuaciones y puede realizarse al agregar una muestra preparada de heces (diluida o filtrada) a una mono capa de células cultivadas. Si la toxina B de *C. difficile* está presente se desarrollará un efecto citopático caracterizado por desarrollo de células redonda en el cultivo celular.<sup>94</sup> Esta prueba está considerada positiva si estos cambios se desarrollan en 50% o más de las células cultivadas en 48 horas y si el efecto es inhibido por antitoxinas. La interpretación de este ensayo es necesariamente subjetivo y requiere una persona preparada. Esta prueba se ha considerado tradicionalmente el estándar de oro con el que otros ensayos de deben de comparar especialmente las técnicas de inmunoensayo.<sup>94</sup> Sin embargo tiene una sensibilidad tan baja como el 67% al comparar este resultado con otros resultados.<sup>95</sup> Otra limitación importante es el tiempo que tarde en identificar resultados el cual puede llevar hasta 72 hrs para un resultado negativo.

## **Tratamiento guías**

Las dos guías existentes son las guías de la IDSA y la más reciente publicada por la Asociación Americana de Gastroenterología hacen recomendaciones para el manejo de la diarrea asociada a *C.difficile* sin embargo cuentan con algunas diferencias.

La asociación americana de gastroenterología reporta lo siguiente:

En cuanto al manejo de la enfermedad leve o moderada coincide con la IDSA en los puntos de iniciar tratamiento si existe la sospecha e iniciar tratamiento sin importar el resultado (recomendación fuerte, evidencia moderada), se recomienda si es posible retirar antibióticos y dar metronidazol 500 mg vía oral c/8 por 10 días, en los pacientes que presenten un episodio inicial severo recomiendan iniciar con vancomicina a una dosis de 125mg VO c/6. En pacientes en que el medicamento no pueda dar enemas con vancomicina. A diferencia de la IDSA estas guías especifican que la falla en la respuesta al metronidazol 5-7 días debe promover que se cambie a vancomicina, cuando el paciente sea

alérgico a metronidazol iniciar con vancomicina incluyendo el manejo de las pacientes embarazadas.<sup>59</sup>

En cuanto al manejo de la enfermedad manejo enfermedad severa complicada: Coincide con IDSA en el paciente con colon toxico o distensión significativa el tratamiento es vancomicina 500 mg VO c/6 y metronidazol 500 mg IV cada 8 hrs. Se debe de obtener una valoración por cirugía y se debe de considerar cirugía si tiene leucocitosis mayor a 50,000, lactato de más de 5 sin embargo a diferencia de las guías de la IDSA no coincide en cuanto a la reanimación con líquidos, profilaxis para tromboembolismo, al menos que exista íleo o distensión importante, la alimentación oral puede continuarse (recomendación moderada).<sup>53</sup>

Para el manejo enfermedad recurrente coincide con la IDSA en el punto en el que la primera recurrencia puede ser tratada como la primera, al menos que la recurrencia sea catalogada como severa de ser así se inicia con vancomicina, después de la segunda recurrencia ambas guías sugieren iniciar vancomicina sin importar la severidad del cuadro clínico.<sup>53</sup>

No coincide en el aspecto de que si existe una tercera recurrencia después de vancomicina se debe de considerar trasplante fecal. El uso de inmunoglobulina solo no está recomendado, sin embargo puede recomendarse en hipogamaglobulinemia.<sup>53</sup>

A pesar de los avances, el tratamiento óptimo para DACD, se mantiene desconocido. Un estudio sistematico reciente, incluye 11 ensayos clinicos aleatorizados con 1463 pacientes, en este estudio ningún tratamiento fue superior para el tratamiento inicial de la DACD.<sup>96</sup> Una revisión realizada por Cochrane analizando 15 estudios y un total de 1152 pacientes investigando 9 antibióticos diferentes (vancomicina, metronidazol, ácido fúcido, nitazoxanida, teicoplanina, rimampicina, rifaximina, bacitracina y fidaxomicina) utilizados para el tratamiento de DACD.<sup>97</sup> Estos autores concluyeron que la habilidad para realizar recomendaciones de tratamiento es limitada por la pequeña muestra poblacional de algunos grupos terapéuticos, sin embargo no se mostró diferencia entre vancomicina y otros antibióticos incluyendo metronidazol, ácido fúcido, nitazoxanida y rifaximina, solo encontrado a la teicoplanina como superior a la vancomicina. Sin embargo se requieren

estudios adicionales para detectar adecuada las posibles diferencias entre los grupos con el fin de hacer recomendaciones.<sup>97</sup>

### **Alternativas terapéuticas**

Las guías no han incluido dentro de sus recomendaciones el uso de otros agentes terapéuticos incluidos para el manejo de la enfermedad rave.

### **Trasplante fecal**

La patogénesis de la diarrea asociada a *Clostridium* esta principalmente atribuida a una disrupción de la colonización bacteriana intestinal por el tratamiento de antibióticos de amplio espectro, lo que permite a las cepas productoras de toxinas prevalezcan y causen la enfermedad. La restauración de la flora intestinal normal es por lo tanto una pieza clave para la curación. De aquí la importancia de detener el tratamiento antibiótico a medida que sea posible<sup>98</sup>. Un abordaje que permite la rápida sustitución de la flora gastrointestinal es el trasplante de microorganismos de evacuaciones de individuos sanos mediante la infusión de una suspensión líquida de heces. Este tratamiento inicialmente fue descrito en 1958<sup>99</sup>. En una revisión sistemática que incluyo 317 paciente tratados en 27 series de casos y reportes, la bacterioterapia fecal fue altamente efectiva llevando a resolución de la enfermedad en 92% de los casos. La efectividad varia dependiendo de la forma de instilación, relación con el donador, volumen de heces administrado y el tratamiento indicado antes de la transfusión. Los efectos adversos y la muerte fueron poco comunes.<sup>100</sup> Estudios diseñados más recientes han demostrado la efectividad del trasplante para prevenir la enfermedad recurrente. Las guías publicadas por parte del American Journal of Gastroenterology en el 2013 recomiendan en base a evidencia de moderada calidad que a partir de la tercera recurrencia y de la utilización del tratamiento en pulsos de vancomicina se considere trasplante fecal<sup>53</sup>

### **Tratamiento con Fidaxomicina**

La fidaxomicina es un antibiótico bactericida macrocíclico que *in vitro* demostró tener una actividad más alta contra *C.difficile* incluyendo a la cepa hipervirulenta ribotipo 027.<sup>101</sup> Adicionalmente es escasamente absorbida de manera sistémica y tiene altas

concentraciones en heces.<sup>102</sup> En un estudio clínico aleatorizado multyicentrico, las tasas de curación con fidaxomicina fueron no inferiores a las de la vancomicina. Sin embargo se asociaron a menos recurrencias en pacientes infectados con ribotipos no 027.<sup>103</sup> En pacientes que necesitaban la administración concomitante de antibióticos por la persistencia o por nuevas infecciones durante un episodio de DACD, la fidaxomicina mostro ser significativamente más efectiva en cuanto a curación clínica llegando a 90% en comparación con vancomicina siendo el 90%.<sup>104</sup>

El tratamiento con fidaxomicina fue aprobado para tratamiento de DACD por la FDA en mayo 2011. Las recomendaciones emitidas por las Guías de Práctica Clínica en 2013 mencionan que la evidencia aun es limitada y se necesitan ensayos clínicos post-marketing para poder recomendar este tratamiento. El precio de este medicamento continua siendo elevado alcanzando un costo por 10 días de 2,800 USD.<sup>53</sup>

### **Anticuerpos**

La preparación de inmunoglobulinas tienen cantidades significativas de IgG dirigida contra toxina A y B la cual ha demostrado su efecto neutralizante *in vitro*. Se ha utilizado en muchos caso de enfermedad severa o refractaria con resultados variables, sin embargo no se ha realizado ningún ensayo clínico aleatorizado, en un estudio en pacientes críticos con enfermedad severa no se observó beneficio sugiriendo que el papel de la inmunoglobulina podría limitarse a enfermedad colonica.<sup>105</sup>

En cuanto a la inmunoterapia con anticuerpos humanizados, se realizó un estudio aleatorizado doble ciego multicentrico, en donde el desenlace primario era la recurrencia.<sup>106</sup> Los anticuerpos humanizados IV como adyuvante a la terapia antimicrobiana se asociaron a una reducción del 72% en recurrencia comparado con placebo pero no redujeron la severidad de la infección o la duración de la diarrea. Los pacientes que habían tenido múltiples recurrencias presentaron una reducción del riesgo relativo en 82%. Sin embargo hasta el momento no existe evidencia contundente que avale su utilización y se requieren más estudios para corroborar su efectividad<sup>30</sup>.

### **Vacunas**

La respuesta humoral a toxinas A y B de *C. difficile* tiene influencia en el curso clínico de DACD y disminuye el curso de recurrencia, esto promueve el objetivo de prevenir la enfermedad con el uso de vacunas.<sup>107</sup> El toxoide parenteral de *C.difficile* ha mostrado inducir altos niveles de inmunoglobulina G<sup>108</sup> y la vacuna que contiene ambas toxinas ha sido tolerada y ha mostrado ser inmunogenica en voluntarios sanos<sup>109</sup> La vacunación basada en adenovirus ha mostrado tener una protección del 100% en contra al reto letal de toxina A en ratones.<sup>110</sup> Actualmente está en fase 2 un ensayo que busca prevenir la recurrencia de la enfermedad<sup>111</sup>

### **Uso de probióticos**

El uso de probióticos se ha planteado como una estrategia económicamente factible para la prevención de infección por *C.difficile*. Su utilización se basa en la premisa de que bacterias y levaduras pudieran repoblar el tracto gastrointestinal afectado por el uso de antibióticos como flora no patógena y de esta manera limitar el crecimiento de *C.difficile*.<sup>112</sup>

Las guías de la IDSA<sup>59</sup> no recomiendan la administración de probióticos para prevenir la infección primaria por *C. difficile* al haber información limitada para apoyar este abordaje y el potencial riesgo de diseminación hematogena dando un nivel de recomendación (C-III)

Esta recomendación se basa en que los estudios existentes en esa fecha que apoyaban la administración de probióticos eran estudios pequeños y en donde se excluían uso de antibióticos de alto riesgo para DACD

A finales del 2012 fue publicado un metanálisis en el cual se intentaba demostrar la seguridad y la eficacia de probióticos en la prevención de diarrea asociada a *C.difficile*. En este estudio se analizó la incidencia de DACD en 20 estudios los cuales incluían una población total de 3818 participantes y se reportó que el uso de probióticos redujo la incidencia de DACD en un 66% en una población con un 5% de incidencia de DACD, sin presentar un mayor número de eventos adversos. Si bien la evidencia proporcionada es moderada calidad debido a la inconsistencia entre los distintos estudios incluidos.<sup>113</sup> Aun se necesitan realizar estudios de buena calidad para poder tener evidencia suficiente para recomendar esta terapéutica.

A partir del 2013 en la publicación del American Journal of Gastroenterology se establece de que existe evidencia moderada de que los probióticos con *L.rhamnosus* y *S.boulevardii* disminuyen la incidencia de diarrea asociada a antibiótico aún no existe evidencia suficiente para apoyar el uso rutinario de probióticos para prevenir la infección<sup>53</sup>

### **Estrategias para la prevención de enfermedad asociada a *C.difficile***

En vista del incremento en la incidencia de diarrea asociada a *C.difficile* en el sistema de salud la prevención de la infección se convierte en un asunto de gran relevancia. Las guías de práctica clínica de la IDSA recomiendan el uso de guantes, apego al uso de lado de manos así como la reubicación de pacientes en habitaciones privadas con precauciones de contacto el uso de agentes de limpieza clorados y agentes esporicidas, así como programas de limitación de antimicrobianos. Dentro de estas recomendaciones solo el uso de guantes el lavado de manos y el uso programas para la correcta utilización de antibióticos son grado A de recomendación.<sup>59</sup>

Las guías del American Journal of Gastroenterology coinciden con los puntos de las guías de la IDSA dando como recomendaciones fuertes el lavado de manos el uso de equipo desechable, al aislamiento del paciente a la desinfección de superficies con agentes clorados y al uso de programas de administración correcta de antibióticos.<sup>53</sup>

El conocimiento en los modos de transmisión es la base para el control racional de la transmisión establecido por las guías. Algunos estudios han demostrado aislamiento de *C.difficile* se ha podido encontrar en el aire que rodea a los pacientes con la enfermedad o en aire encima de los inodoros que los pacientes ocupan, lo que da cierta evidencia a una potencial aerilización de la bacteria. Estos hallazgos podrían ser de utilidad para las futuras recomendaciones de las guías. El desarrollo de nuevas estrategias de limpieza ambiental incluyendo el peróxido de hidrogeno vaporizado y la radiación ultravioleta han demostrado efectivamente eliminar esporas de *C. difficile* sin embargo estas técnicas aún tienen deficiencias operacionales limitadas.<sup>114, 115</sup>

## **Hipótesis**

Los pacientes con infección por *C. difficile* presentaran un mayor número de días de estancia hospitalaria y será un factor independiente de mortalidad hospitalaria.

## **Objetivo primario**

Comparar los desenlaces clínicos obtenidos en el grupo de pacientes con toxina positiva para *C.difficile*, con población de características epidemiológicas similares que no tuvieran una resultado positivo para toxina *C.difficile* y que estuvieran hospitalizadas en el mismo periodo de tiempo y analizar si la presencia de diarrea asociada a *C.difficile* es un factor independiente de mortalidad y de mayor tiempo de estancia hospitalaria

## **Objetivo secundario**

Describir los factores de riesgo asociados al desarrollo de DACD en los pacientes hospitalizados en el Hospital Médica Sur en el periodo del 01-01-2008 al 31-12-2012 y analizar los desenlaces clínicos relacionados a la infección por *C.difficile* (Mortalidad, días de estancia hospitalaria)

## **Metodología**

Se revisaron todos los resultados de laboratorio que sean reportados como positivos para toxina A o B de *C. difficile* entre el 01/01/2008 y el 31/12/2012 en el Hospital Médica Sur.

## **Criterios de Inclusión**

Todo paciente de edad igual o mayor a 15 años que presente diarrea o megacolon toxico que tenga positiva Toxina A o B de *C.difficile*. Todo paciente con resultado previamente positivo después de 4 semanas de haber presentado un análisis

## **Criterios de exclusión**

Pacientes menores de 15 años, todo paciente con información incompleta en el expediente (motivo de ingreso, diagnósticos de egreso, información sobre medicamentos consumidos previo al ingreso y durante su estancia hospitalaria).

## **Variables a analizar**

Se analizará de todo paciente incluido las siguientes variables

Características del paciente: Motivo de ingreso, diagnósticos de egreso, sexo, edad al ingreso, días de estancia en área crítica

Comorbilidades: Diabetes, Hipertensión, Cirrosis o hepatopatías, IRC, Cáncer (neoplasias sólidas y hematológicas), VIH, enfermedad inflamatoria intestinal

Consumo previo de medicamentos: Uso de antibióticos 8 semanas previas al inicio de la diarrea, uso de quimioterapia citotóxica previa al ingreso, uso previo de c (consumo mayor a 14 días).

Medicamentos e intervenciones administrados durante estancia hospitalaria:

Antibióticos: (Ciprofloxacina, Levofloxacina, Moxifloxacina, Ofloxacina, Clindamicina, Claritromicina, Azitromicina, Eritromicina, Metronidazol, Ertapenem, Imipenem, Meropenem, Cefalosporinas de primera generación, Cefalosporinas Segunda generación, Cefalosporinas tercera generación, Cefalosporinas cuarta generación, Amoxicilina, Amoxicilina Clavulanato, Ampicilina Piperacilina Tazobactam, Amikacina, Gentamicina, TMP/SMX, Tigeciclina, Linezolid, Rifampicina, Nitrofurantoina, Azoles, Equinocandinas)  
Antiácidos: Ranitidina, Omeprazol

Complicaciones de la enfermedad: Muerte hospitalaria, Megacolon tóxico, intervención quirúrgica

VARIABLES DE LABORATORIO: Número de toxina solicitadas y cual toxina resulto positiva, tipo de toxina que resulto positiva, coprocultivo, LMF, Leucocitosis, Creatinina ingreso, depuración de creatinina al ingreso, albumina al ingreso, PCR ingreso

### **Estudio de casos controles**

Se realizó un estudio comparativo de casos y controles asignando una proporción 1:2 para determinar factores asociados al desarrollo de DACD. Se compararon los desenlaces obtenidos en el grupo de pacientes con toxina positiva A o B de *C.difficile* y se compararon con una cohorte de pacientes que presentaran características epidemiológicas similares (Edad al ingreso +/- 5 años y comorbilidades similares que al ingreso).

### **Análisis Estadístico**

Las variables continuas se describieron utilizando medias y desviación estándar. La comparación de medias se realizó mediante la prueba de T de Student. Las variables categóricas se describen con números y porcentajes, se compararon mediante la prueba exacta de Fisher.

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

### **Resultados**

En el periodo de 2008-2012 se reportaron 103 pruebas de inmunoensayo positivas para *C.difficile*. De este número se descartaron para análisis subsecuente 33 pacientes por tratarse de pacientes externos que no contaban con datos clínicos y estudios de laboratorio adicionales que permitirían su análisis. Quedando para el análisis 70 pacientes que incluyeron pacientes hospitalizados y pacientes de valorados en urgencias cuyas características pueden observarse en las siguientes tablas. De los pacientes con la enfermedad 70% eran del genero femenino y tenían una edad media de 55.8 años, con un 48.5% de la población siendo mayor a 60 años.

En el periodo de 2008 se diagnosticaron 4 casos de DACD de los cuales no hubo ningún caso de enfermedad nosocomial. 2 pacientes adquiriendo la enfermedad de manera nosocomial y 2 presentándolo de manera externa pero relacionada con hospitalización

previa. En este año 3 episodios fueron catalogados como leves y 1 como grave. Sin presentar casos de enfermedad complicada o muerte. La incidencia fue de .27 casos por 1000 ingresos hospitalarios

En el año 2009 se presentaron 12 casos de la enfermedad 5 casos de enfermedad adquirida en la comunidad y 5 de enfermedad manifestada en la comunidad pero asociado a hospitalización previa y 2 casos con un origen indeterminado de la adquisición de la enfermedad. En cuanto a la gravedad de la enfermedad 7 se clasificaron como leves 3 como graves y 3 como no catalogables por no contar con estudios de laboratorio para estadificarlo de acuerdo a los criterios de la IDSA. No hubo muertes reportadas y la incidencia anual fue de .78 casos por cada 1000 ingreso

Para el periodo de 2010 se reportaron 12 casos de los cuales 7 casos fueron casos de enfermedad nosocomial y 4 casos de hospitalización previa relacionada con hospitalización previa y 1 caso de origen indeterminado de la infección. Se presentaron 7 casos de enfermedad leve 4 de enfermedad grave y un caso de enfermedad grave complicada. Se presentó una muerte en uno de estos pacientes, pero no atribuible directamente a *C.difficile*. La incidencia anual fue de .79 casos por cada 1000 ingresos.

En el 2011 fue el año con mayor número de ingresos hospitalarios atribuidos a *C.difficile*, en este periodo se presentaron 25 casos y con un numero de 11 fue el año con mayor número de infecciones nosocomiales, también se presentaron 6 casos de enfermedad adquirida en la comunidad y 7 casos de enfermedad manifestada en la comunidad pero relacionada a una hospitalización previa y 1 caso de enfermedad no catalogable. Este año también fue en el que más se presentaron casos graves de la enfermedad. Se ingresaron con criterios de gravedad 8 pacientes y 1 paciente con enfermedad grave complicada, representando el 36% de los casos. Del resto de los pacientes 11 se catalogó la enfermedad como leve y en 2 casos no se contaron con laboratorios necesarios para clasificarlos en alguno de estos grupos. Se presentó 1 muerte en estos pacientes sin tener relación directamente atribuible a la enfermedad. La incidencia anual fue de 1.63 casos por 1000 ingresos

En el año de 2012 se presentaron 17 casos 8 de los cuales fue de enfermedad adquirida en la comunidad, 8 de enfermedad nosocomial y 1 caso de enfermedad relacionada con hospitalizaciones previas pero manifestado en la comunidad. En cuanto a la gravedad de la enfermedad 13 fueron cuadros leves 3 graves y 1 grave complicado. En este grupo de pacientes se presentó 2 muertes y no directamente atribuible a *C.difficile*. Se encontró una incidencia anual de 1.08 casos por cada 1000 ingresos.

En el periodo estudiado de los 70 casos analizados la mayor parte de los casos se pudieron clasificar como enfermedad nosocomial, encontrando 26 (37.2%) casos cabe destacar que en los dos primeros años del estudio no hubo casos que se pudieran clasificar de esta manera. En segundo lugar en cuanto a frecuencia se encontraron 21 casos (30%) de enfermedad adquirida en la comunidad. Los pacientes con enfermedad manifestada en la comunidad pero relacionada con hospitalización previa fueron 19 (27.1%). Los pacientes con una clasificación que fue considerada como indeterminada fueron 4 (5.7%). En cuanto a la gravedad de la enfermedad 44 (62.6%) de los casos se pudieron catalogar como leves, 19 (27.1%) fueron catalogados como graves, 3 (4.3%) pacientes se catalogaron como enfermedad grave complicada. 4 (5.7%) no pudieron catalogarse en un grupo específico en cuanto a la gravedad. La incidencia promedio de .92 casos por cada 1000 ingresos hospitalarios. Tres pacientes en los que se corroboró infección *C.difficile* murieron representando el 5.7% del total de los pacientes, uno de ellos de 56 años y los dos restantes de la octava década de la vida. Aunque ninguna muerte fue asociada directamente a *C.difficile*, la tasa de mortalidad en los 5 años del estudio fue de 5.26 muertes por 100,000 ingresos.

Al ser comparado con el grupo control, se observó que la diarrea asociada a *C.difficile* se encontraba de manera más frecuente en población femenina representando el 70% de los pacientes (Tabla 2). De los pacientes del grupo control también tenían de igual manera un predominio del sexo femenino con porcentaje de 71.4%. Sin diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos.

Al analizar la especialidad médica por la que los pacientes se habían ingresado, la proporción más alta ingreso a cargo de gastroenterología, seguido de cirugía y de oncología. No se encontró diferencia significativa entre las distintas especialidades médicas

de la cual habían ingresado. Los pacientes con infección confirmada por *C.difficile*. Los pacientes con la infección tuvieron mayor cantidad de hospitalizaciones previas siendo esta diferencia estadísticamente significativa. En cuanto al uso de antibioticoterapia 8 semanas previas al ingreso se encontró que 64 (91.4%) pacientes del grupo de pacientes con *C.difficile* y 61 (43.6%) del grupo control la habían recibido siendo esta diferencia estadísticamente significativa. Del grupo de antibióticos recibidos previo al ingreso los pacientes con diagnóstico de DACD recibieron con mayor frecuencia cefalosporinas y carbapenemicos, siendo esto estadísticamente significativo. No se observó diferencia significativa entre el consumo de otros grupos de antibióticos previo al ingreso.

En cuanto a las manifestaciones clínicas se encontró que en cuanto lo reportado en el expediente clínico 67 (95.7%) del grupo de pacientes con DACD presentaron diarrea en alguna ocasión durante su estancia hospitalaria, comparado con 81 (57.9%) del grupo control. Existiendo diferencia estadísticamente significativa. En cuanto a diarrea como diagnóstico principal de ingreso no se encontró diferencia entre ambos grupos. La totalidad de los pacientes del grupo de DACD y ninguno del grupo control conto con toxina A/B positiva por inmunoensayo. Solo a 20 (14.2%) de los pacientes del grupo control se les solicito muestra de toxina en heces. Se encontró que 25 (35.7%) de los pacientes con DACD se confirmó la positividad de la prueba de sangre oculta en heces contra 12 (8.6%) de los pacientes del grupo control, siendo la diferencia estadísticamente significativa. Analizando la presencia de leucocitos en moco fecal en los pacientes que presentaron diarrea en ambos grupos, se solicitaron leucocitos en moco fecal en 41 (42.9%) de los pacientes del grupo con DACD y 45 (17.1%) de los pacientes sin la enfermedad, sin encontrarse diferencia que pudiera considerarse significativa ( $P=0.064$ ), con ausencia de leucocitos en moco fecal en 19 (11.6%) y 11 (15.7%) del grupo con DACD ( $P=.1755$ ). En el área donde sí se observó diferencia estadísticamente significativa fue en la cantidad de leucocitos en moco fecal presentes en las evacuaciones de pacientes con infección de toxina de *C. difficile*. Encontrando que los pacientes con DACD tienen mayor cantidad de leucocitos en moco fecal que los pacientes del grupo control.

En cuanto a la presencia de otros síntomas asociados al cuadro clínico (dolor abdominal, fiebre, anorexia y la presencia de datos de irritación peritoneal) no se encontró diferencia

que se considerara significativa entre ambos grupos, solo se encontró una tendencia a que los pacientes con *C.difficile* presentaran fiebre de manera más frecuente (P=0.054).

En este estudio se analizaron la presencia de distintas comorbilidades analizadas no encontró diferencia entre ambos grupos, a excepción de la presencia de enfermedad metastasica la cual fue más común en los pacientes con *C.difficile* (P= 0.042). También se encontró significancia estadística en la presencia de nutrición enteral 4 de los pacientes con DACD y ninguno del grupo control (P=.0116).

Se compararon las distintas comorbilidades entre los grupos de acuerdo al puntaje de Charlson la mayoría de los pacientes en ambos grupos contaban con un puntaje de Charlson de 0 o 1. Sin embargo no se encontró diferencia significativa entre ambos grupos en cuanto al numero y gravedad de las comorbilidades en ambos grupos.

Las complicaciones más frecuentemente encontrada en ambos grupos en los pacientes con DACD fue el desarrollo de choque séptico se presente en 7 pacientes y 3 en el grupo control siendo esta mas común de DACD (P= 0.0173). Se encontró diferencia significativa en la estancia en UTI durante la estancia hospitalaria siendo más frecuente en el grupo de pacientes a quien se les hizo el diagnóstico de DACD 16 pacientes (22%) comparado con 5 (7%) del grupo control.

La mortalidad analizada fue de 4 (5.7%) pacientes en el grupo de pacientes con DACD y ningún paciente en el grupo control, existiendo una diferencia estadísticamente significativa (P=0.0116) cabe destacar que ninguna muerte pudo atribuirse directamente a *C.difficile*.

El análisis de los días de estancia hospitalaria se observa en la tabla 3 en esta se puede encontrar que los pacientes con DACD cursaron con una estancia media de días de estancia hospitalaria de 11 comparado con 4.74 en el grupo control siendo la diferencia entre ambos grupos significativamente estadístico (P= .0001)

Las variables de laboratorio estudiadas se pueden observar en la tabla 3 analizadas fueron: Leucocitos, albumina, creatinina, PCR y procalcitonina. Se encuentro estadísticamente significativa en la cifra de leucocitos al ingreso siendo mayor en el grupo de DACD con

una media de 11,910 comparado con 9.230 del grupo control ( $P= 0.0001$ ). Se comparó el valor de albumina al ingreso o en el caso de la enfermedad nosocomial la albumina presente al momento del diagnóstico de la enfermedad. Se encontró que los pacientes con DACD presentaron una albumina media de 3.12 (DE: $\pm$ .80) y los de grupo control de 3.47 (DE  $\pm$ .74). Siendo la diferencia entre ambos grupos significativa ( $P=0.0173$ ). En las otras variables analizadas no se encontró significancia estadística.

En la tabla 4 se incluyen los antibióticos y la farmacoterapia administraron antes y durante la estancia hospitalaria sin incluir a aquellos fármacos utilizados como parte del tratamiento de DACD. Los antibióticos que se administraron más frecuentemente a los pacientes con DACD y se mostraron estadísticamente significativos fueron: Metronidazol 13 (18.6%) pacientes del grupo de DACD y 3 (2.1%) del grupo control ( $P= 0.0001$ ), Ertapenem 11 de los pacientes con DACD (15.7%) y 3 de los pacientes del grupo control (2.1%). Las cefalosporinas de tercera generación las cuales fueron recibidas por 30 pacientes del grupo de DACD (21.4%) y 20 (14.3%) de los pacientes del grupo control ( $P=0.0001$ ), específicamente de este grupo de fármacos el que se vio utilizado en su mayoría y por si mismo resulta estadísticamente significativa su administración en los pacientes con DACD ( $P=0.0012$ ). La vancomicina fue otro medicamento administrado con mayor frecuencia en DACD 10 (14.3%) comparado con solo 5 (3.57%) pacientes del grupo control ( $P=.0.0083$ ). Los otros antibióticos asociados fueron la nitrofurantoina 4 (5.7%) en el grupo DACD y 1 (.7%) grupo control ( $P=0.0433$ ) y la caspofungina la cual fue recibida por un paciente del grupo control (.7%) y 5 (7.1%) del grupo de pacientes ( $P= 0.0165$ ). Fuera del grupo de los antibióticos otro medicamento asociado fueron los inhibidores de bomba de protones los cuales se administraron a 49 (70%) del grupo de DACD y a 68 (48.6%) del grupo control encontrando diferencia significativa ( $P= 0.0033$ ).

En la tabla 5 se realiza la comparativa de los pacientes entre los que recibieron metronidazol VO y vancomicina VO. En esta tabla se comparan las diferencias entre ambos grupos encontrando que los pacientes del grupo de vancomicina tuvieron una proporción más alta de sangre oculta en heces positiva con un total de 6 pacientes 75% siendo estadísticamente significativo ( $P= 0.0483$ ), de igual manera se encontró una mayor cantidad de complicaciones (choque séptico) en el grupo de pacientes que recibieron a los pacientes

que recibieron vancomicina 3 (37.5%) a compararse 3 (6%) ( $P= 0.023$ ). En cuanto a la gravedad de la infección no se encontró diferencia estadísticamente significativa, entre estos grupos. Tampoco se encontró diferencia en cuanto a las comorbilidades catalogadas en el score de Charlson.

**Tabla 1 Características epidemiológicas descritas por año**

Año	Número de casos	Enfermedad adquirida en la comunidad	Enfermedad asociada a hospitalización previa	Enfermedad nosocomial	Origen indeterminado	No catalogable	Episodio leve	Episodio grave	Episodio complicado	Hospitalizaciones	Incidencia (por 1000 ingresos)	Muertes
2008	4	2	2	0	0	0	3	1	0	14,808	.27	0
2009	12	5	5	0	2	2	7	3	0	15,208	.78	0
2010	12	0	4	7	1	0	7	4	1	15,013	.79	1
2011	25	6	7	11	1	2	14	8	1	15,272	1.63	1
2012	17	8	1	8	0	0	13	3	1	15,656	1.08	2
<b>Total</b>	70	21 (30%)	19 (27.1%)	26(37.2%)	4 (5.7%)	4 (5.7%)	44 (62.6%)	19 (27.1%)	3(4.3%)	75,957	.92	4 (5.7%)

\* Sitio de presentación del cuadro clínica y gravedad de la enfermedad descrita de acuerdo a la Guía de Practica Clínica Para Manejo de *Clostridium difficile* publicadas por SHEA/IDSA en 2010

**Tabla 2 Características Generales**

Variable	Generalidades		Grupo Control		Casos Clostridium		P:
n	210		140		70	66.7%	
	N	%	N	%	N	%	
<b>Mujer</b>	149	71	100	71.4	49	70	0.8725
<b>Área Médica de origen</b>							
<b>Gastroenterología</b>	77	77	56	40	21	30	0.1738
<b>Medicina Interna</b>	22	22	19	13.6	3	4.3	0.0537
<b>Cirugía</b>	31	31	20	14.3	11	15.7	0.8374
<b>Oncología</b>	15	15	8	5.7	7	10	0.2669
<b>Ortopedia</b>	4	4	2	1.4	2	2.9	0.6021
<b>Hematología</b>	4	4	2	1.4	2	2.9	0.6021
<b>Infectología</b>	11	11	6	4.3	5	7.1	0.5120
<b>Nefrología</b>	7	7	3	2.1	4	5.7	0.2252
<b>Cardiología</b>	3	3	1	0.7	2	3.9	0.2582
<b>Otro</b>	34	34	23	16.4	11	15.7	1.0000
<b>Hospitalizaciones previas</b>	80	38.1%	42	30	38	54.3	0.0009
<b>Uso ab pre hospitalario</b>	125	59.5%	61	43.6	64	91.4	0.0001
<b>No</b>	81	38.6	79	56.4	2	2.9	0.0001
<b>Quinolona</b>	33	25.7	23	16.4	10	14.3	0.8410
<b>Cefalosporina</b>	50	23.8	14	10	36	51.3	0.0001
<b>Carbapenemico</b>	10	4.8	1	0.7	9	12.9	0.0003
<b>TMP + SMTX</b>	2	1	2	1.4	0	0	0.5534
<b>Aminopenicilina</b>	6	2.9	2	1.4	4	5.7	0.0970
<b>Metronidazol</b>	5	2.4	3	2.1	2	2.9	1.0000
<b>Clindamicina</b>	1	0.5	0	0	1	1.4	0.3333
<b>Aminoglucosido</b>	1	0.5	1	0.7	0	0	1.0000
<b>Otro</b>	12	5.7	12	8.6	0	0	0.0095
<b>Desconocido</b>	9	4.3	3	2.1	6	8.6	0.0628
<b>Manifestaciones clínicas</b>							
<b>Diarrea</b>	148	70.5	81	57.9	67	95.7	0.0271
<b>Diarrea como Diagnostico principal ingreso</b>	106	50.5	73	52.1	33	47.1	0.7994
<b>Toxinas</b>							
<b>A/B Positiva</b>	69	32.9	0	0	70	100	0.0001
<b>Negativa</b>	140	66.6%	20	14.2	0	0	0.0003
<b>Sangre oculta en heces +</b>	37	17.6	12	8.6	25	35.7	0.0001
<b>Leucocitos en moco fecal solicitados</b>	54	25.7	45	17.1	41	42.9	0.0647
<b>0 Leucos</b>	30	14.3	19	13.6	11	15.7	0.1755
<b>1-5 leucocitos por campo</b>	24	11.4	17	12.1	7	10	0.0530
<b>5-10 leucocitos por campo</b>	15	7.1	4	2.9	11	15.7	0.0448
<b>Más de 10 leucocitos</b>	17	8.1	5	3.6	12	17.1	0.0561

<b>por campo</b>							
<b>Desconocido</b>	124	59	95	67.9	29	41.4	0.0003
<b>Cultivo Clostridium -</b>	2	1	2	1.4	0	0	0.5534
<b>No se realizó</b>	196	93.3	43	98.6	41	58.6	0.0002
<b>Síntomas Asociados</b>							
<b>Dolor abdominal</b>	112	53.3	73	52.1	39	55.7	0.6616
<b>Anorexia</b>	50	23.8	36	25.7	14	20	0.3947
<b>Fiebre</b>	88	42.9	52	37.1	36	51.4	0.0546
<b>Rebote</b>	10	4.8	8	5.7	2	2.9	0.5015
<b>Comorbilidades</b>							
<b>Colectomía</b>	6	2.9	5	3.6	1	1.4	0.6660
<b>Neoplasia</b>	31	14.8	19	13.6	12	17.1	0.5380
<b>Enfermedad metastásica</b>	7	3.3	2	1.4	5	7.1	0.0425
<b>Antecedente recibir QT (1 año)</b>	22	10.5	13	9.3	9	12.9	0.4760
<b>Radioterapia (1 año)</b>	5	2.4	2	1.4	3	4.3	0.3360
<b>Leucemia</b>	2	1	0	0	2	2.9	0.1100
<b>Linfoma</b>	4	1.9	4	2.9	0	0	0.3037
<b>VIH</b>	1	0.5	1	1.7	0	0	1.0000
<b>Diabetes</b>	30	14.3	23	16.4	7	10	0.5175
<b>DM complicación órgano blanco</b>	9	4.3	6	4.3	3	4.3	1.0000
<b>HAS</b>	65	31	43	30.7	22	31.4	1.0000
<b>IRC</b>	14	6.7	8	5.7	6	8.6	0.5810
<b>Hepatopatía</b>	10	4.8	7	5	3	4.3	1.0000
<b>Úlcera péptica</b>	12	5.7	7	5	5	7.1	0.5395
<b>Falla cardíaca</b>	17	8.1	11	7.9	6	8.6	1.0000
<b>Antecedente IAM</b>	10	4.8	5	3.6	5	7.1	0.3065
<b>Antecedente EVC</b>	10	4.8	7	5	3	4.3	1.0000
<b>Hemiplejía</b>	5	2.4	3	2.1	2	2.9	1.0000
<b>Demencia</b>	1	0.5	0	0	1	1.4	0.1100
<b>Enfermedades tejido conectivo</b>	8	3.8	6	4.3	2	2.9	0.7215
<b>EPOC</b>	7	3.3	4	2.9	3	4.3	0.6883
<b>Enfermedad inflamatoria intestinal</b>	2	1	1	0.7	1	1.4	1.0000
<b>Nutrición enteral</b>	4	1.9	0	0	4	5.7	0.0116
<b>Puntaje Charlson</b>							
<b>0 puntos</b>	101	48.1	66	47.1	35	50	0.7699
<b>1 punto</b>	32	15.2	21	<b>15</b>	11	15.7	1.0000
<b>2 puntos</b>	<b>29</b>	<b>13.8</b>	<b>20</b>	14.3	<b>9</b>	<b>12.9</b>	0.8352
<b>3 puntos</b>	18	8.6	15	10.7	3	4.3	0.1892
<b>4 puntos</b>	5	2.9	4	2.9	2	2.9	1.0000
<b>5 o más puntos</b>	23	10	14	10	9	12.9	0.6398
<b>Mortalidad</b>	4	1.9	0	0	4	5.7	0.0116

**Tabla 3: Días de estancia hospitalaria y análisis de laboratorio**

Variable	General		Grupo Control (n=140)		Grupo pacientes con DACD (n=70)		P=
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	
<b>n</b>			140		70		
<b>Días de estancia Hospitalaria</b>	6.76	9,06	4,74	4.89	11	13.42	0.0001
<b>Lecucocitos</b>	10.110	5.740	9.230	4.880	11.910	6.900	0.0001
<b>Albumina</b>	3.32	0.78	3.47	0.74	3.12	0.80	0.0173
<b>Creatinina</b>	1.15	1.16	1.06	0.78	1.32	1.67	0.2352
<b>PCR</b>	102	88.87	82.06	83.26	123.27	92.51	0.2042
<b>Procalcitonina</b>	3,43	5.75	1.38	1.30	4.69	7.040	0.1102

**Tabla 4. Uso de Antibióticos y medicamentos estratificado por grupo.**

Variable	General		Grupo Control		Casos con Clostridium		P:
	N	%	N	%	N	%	
<b>N</b>	210		70		140		
<b>Ciprofloxacino</b>	28	13	20	14.3	8	11.4	0.6694
<b>Levofloxacino</b>	13	6.2	6	4.3	7	10	0.1307
<b>Moxifloxacino</b>	3	1.4	2	1.4	1	1-4	1.0000
<b>Ofloxacino</b>	0	0	0	0	0	0	1.0000
<b>Clindamicina</b>	10	4.8	5	3.6	5	7.1	0.3065
<b>Claritromicina</b>	6	2.9	3	2.1	3	4.3	0.4027
<b>Azitromicina</b>	1	0.5	1	0.7	0	0	1.0000
<b>Eritromicina</b>	0	0	0	0	0	0	1.0000
<b>Metronidazol</b>	16	7.6	3	2.1	13	18.6	0.0001
<b>Ertapenem</b>	13	6.2	3	2.1	11	15.7	0.0005
<b>Imipenem</b>	4	1.9	2	1.4	2	2.9	0.6021

Meropenem	23	15.2	11	7.9	12	17.1	0.0592
Cefalosporinas 1ra generación	3	1.4	1	0.7	2	2.9	0.2582
Cefalosporinas 2da generación	14	6.7	6	4.3	8	11.4	0.0752
Cefalosporinas 3ra generación	54	25.7	24	17	30	21.4	0.0001
-Ceftriaxona	44	21%	20	14.3	24	34.3	0.0012
Cefixima	8	3.8	3	2.1	5	7.1	0.1202
Ceftibuten	2	1	1	0.7	1	1.4	1.0000
- Dos cefalosporinas 3ra generación	6	2.8	5	3.6	1	1.4	0.6660
Cefalospirinas 4ta generación	6	2.9	5	3.6	1	1.4	0.6660
Amoxicilina	10	4.8	5	3.6	5	7.1	0.3065
Ampicilina	2	1	1	.71	0	0	1.0000
Piperacilina- Tazobactam	6	2.9	2	1.4	4	5.7	0.0970
Amikacina	14	6.7	8	5.7	6	8.6	0.5581
Gentamicina			0		0		1.0000
Vancomicina	15	7.1	5	3.57	10	14.3	0.0083
Tigeciclina	0	0	0	0	0	0	0
TMP/SMX	7	3.3	5	3.6	2	2.9	1.0000
Linezolid	6	3.9	3	2.1	3	4.3	0.4027
Fosfomicina	2	1	1	0.7	1	1.4	1.0000
Rifaximina	2	1	1	.7	1	1.4	1.0000
Dicloxacilina	1	0.5	0	0	1	1.4	0.3333
Nitrofurantoina	4	1.9	1	.7	4	5.7	0.0433
Equinocandina	6	3.9	1	0.7	5	7.1	0.0165
Fluconazol	1	0.5	1	0.7	0	0	1.0000
Inhibidores de la bomba de protones	117	55.7	68	48.6	49	70	0.0033
Ranitidina	4	1.9	2	1.4	2	2.9	0.6021

**Tabla 5. Tratamiento Recibido en Casos de Diarrea por Clostridium**

Variable	Metronidazol VO		Vancomicina VO		P=
	n	%	N	%	
<b>N</b>	50		8		
<b>Mujer</b>	33	66	7	87.5	0.4135
<b>Diarrea al ingreso</b>	49	98	8	100	1.0000
<b>Sangre oculta en heces</b>	17	34	6	75	0.0483
<b>Uso de antibioticos previos</b>	47	94	7	87.5	0.4572
<b>Complicaciones</b>	3	6	3	37.5	0.0293
<b>Muerte hospitalaria</b>	3	6	1	14.2	0.4940
<b>ESCALA DE GRAVEDAD</b>					
<b>Episodio inicial leve</b>	31	62	5	62.5	1.0000
<b>Episodio inicial grave</b>	14	28	2	25	1.0000
<b>Episodio inicial grave complicado</b>	1	2	1	12.5	0.2589
<b>Primera recidiva enfermedad leve</b>	2	4	0	0	1.0000
<b>Puntaje Charlson</b>					
<b>0 puntos</b>	26	52	3	37.5	0.7057
<b>1 puntos</b>	7	14	2	25	0.5967
<b>2 puntos</b>	6	12	2	25	0.3030
<b>3 puntos</b>	2	4	0	0	1.0000
<b>4 puntos</b>	1	2	0	0	1.0000
<b>5 o mas puntos</b>	8	16	1	12.5	1.0000

## **Análisis de resultados**

Cabe destacar que las características epidemiológicas de este estudio son comparables a los estudios Latino Americanos previos en el sentido de que la edad media fue de 55.8 años y cuentan y con predominio del género femenino y en este estudio se compararon similitudes con lo previamente reportado por el estudios latinoamericanos<sup>42</sup> y de Camacho en 2009<sup>52</sup>, encontrado relación entre el uso de cefalosporinas de tercera generación, carbapenemicos y el uso de inhibidor de bomba de protones. Algunas de las condiciones anteriormente asociadas al desarrollo de DACD anteriormente reportadas fueron el antecedente de enfermedad metastasica, el uso de nutrición parenteral y haber presentado hospitalizaciones previas.

La administración previa de Vancomicina y Metronidazol también fue un factor de estadísticamente significativo para el desarrollo de DACD, aunque pueda en cierta manera padecer paradójico esta relación podría explicarse por la alteración en la microflora colonica asociada a estos medicamentos que podría favorecer la colonización por *C.difficile* y el desarrollo de la enfermedad. Sin embargo algunos de los hallazgos encontrados en este estudio difieren de lo encontrado de estudios previos, en estudios.

Algunas asociaciones no reportadas en estudios previos fue la asociación de las equinocandinas y la nitrofurantoina con el desarrollo de DACD. Ambos fármacos no considerados dentro los más comúnmente asociados con esta enfermedad, cabe destacar que al menos en este estudio la asociación de equinocandinas pueda ser un epifenómeno relacionado a que el 80% pacientes que recibieron este medicamento se ingresaron en áreas críticas 60% pacientes tenían un puntaje de Charlson arriba de 5.

En este estudio a pesar del amplio uso de fluoroquinolonas en ambos grupos, no hubo asociación en este estudio con el desarrollo de la enfermedad. De igual manera otros medicamentos como clindamicina y trimpetroprim/sulfametoxazol no presentaron diferencia estadísticamente significativa. La ranitidina no mostro la diferencia

estadísticamente significativa mostrada en un estudio previo, aunque la cantidad de pacientes a los que se les administro fue 4 en total (2 por grupo)

Al comparar los análisis de las características clínicas y de laboratorio, se encontró que la manifestación clínica de la enfermedad después de la diarrea es la presencia de fiebre. En este estudio solo se tomó como positivo a aquellos pacientes que se documentó con un termómetro de manera tanto interna como extramente la presencia de elevación térmica por arriba de 38 C, sin embargo hubo una tendencia a presentarse de manera más frecuente en pacientes con DACD pero no alcanzo a presentar diferencia estadísticamente significativa. De las variables de laboratorio aquellas que mostraron significativamente más altas fueron la cifra de leucocitos y una menos albumina en los pacientes con DACD, sin haber diferencia entre los valores de creatinina basal y creatinina sérica. Estos valores apoyarían el uso de los criterios de gravedad propuestos recientemente en las Guías de Practica Clínica publicadas por el AJG<sup>53</sup>

En este estudio se encontraron una tasa baja de complicaciones y mortalidad. La complicación más común presente hasta en el 10% de los pacientes durante su evolución reportada en todos los pacientes con *C. difficile* fue el desarrollo de choque séptico siendo está desarrollada más comúnmente en el grupo de pacientes con DACD. De las 4 muertes reportadas en pacientes con DACD ninguna pudo ser atribuible directamente a la enfermedad. Sin embargo la mortalidad global en el grupo de *C.difficile* mayor en el grupo de diarrea asociada a *C.difficile*. Mostrando en este estudio ser un factor independiente de mortalidad. Sin embargo la mortalidad directa reportada en este estudio permanece en 0 casos por 100,000 ingresos mientras que la asociada permanece en 5.6 por 100,000 ingresos.

Se comprobó en el estudio que el desarrollo de DACD es un factor estadísticamente significativo que aumenta la estancia hospitalaria, con una media de 6.26 días más que los pacientes del grupo control.

Este estudio tiene como fortalezas tratarse de uno de los pocos estudio que describen la epidemiología de la enfermedad en hospitales América Latina y es uno de los pocos

estudios de casos y controles realizados en continente, adicionalmente es hasta donde tengo conocimiento el primero que se realiza en un hospital general que no limita el ingreso a patología de tercer teniendo un 50% de la población ausencia de comorbilidades asociadas (Charlson 0) y a diferencia de estudios anteriormente publicados<sup>51</sup> el estudio no se limita a estudiar la enfermedad casos de enfermedad exclusivamente nosocomial o relacionados con hospitalización previa, teniendo un 30% de enfermedad catalogada como nosocomial, proporcionando información sobre este grupo poblacional<sup>42</sup>, siendo los hallazgos reportados por este estudio generalizables a la población general y al grupo de pacientes poblacional de pacientes y no se limita a la descripción epidemiológica de pacientes con una alta comorbilidad.

Limitaciones Se reconoce como limitante la presencia del inmunoensayo de toxina A/B como único método diagnóstico utilizado para el diagnóstico de DACD considerando que este método tiene una sensibilidad de 75% comparado con el cultivo o con métodos de amplificación de DNA<sup>85</sup>, lo que deja a un cuarto de los casos que pudieron haber sido diagnosticados sin diagnóstico. También se debe considerar que la DACD es una enfermedad la cual aún parece estar sub diagnosticada lo cual se puede observar en el grupo control en el cual se solicitó a 16% de los pacientes a los cuales podrían tener síntomas relacionados con la infección hasta un los cuales se solicitó solo en lo cual se podría subestimar la incidencia real de la infección. Finalmente Latino América continúa siendo un área del mundo donde existen pocos grupos de investigación en anaerobios lo que hace difícil la detección y el diagnóstico de cepas hipervirulentas como 027/BI/NAP-1.<sup>116</sup> A pesar de que haya países Latino Americanos que hayan reportado la existencia de la cepa<sup>117</sup>. La presencia de esta cepa o de otras cepas hipertoxigenicas o las más comunes de la región se desconoce a diferencia de lo que ocurre en otros países de la región en donde se ha podido detallar con mayor facilidad las características moleculares de la bacteria<sup>118</sup>.

## Conclusiones

Este estudio viene a complementar la escasa información epidemiológica existente en relación a la diarrea asociada a *C.difficile*. En México y países de Latinoamérica y uno de los pocos estudios de casos y controles realizados en América Latina y el hasta donde tengo conocimiento el primero que se realiza fuera de hospitales de referencia. Se encontró que algunos factores de riesgo para el desarrollo de DACD son similares a los reportados por otros estudios, siendo las más importantes el uso de cefalosporinas de tercera generación y carbapenemicos específicamente ertapenem y el uso de inhibidores de bomba de protones. Algunas otros fármacos asociados a *C.difficile* en este estudio han sido reportados como con poca asociación condiciones reportadas en este estudio se consideran se ha encontrado una asociación de menor magnitud como lo fueron el uso de equinocandinas y macrodantina. Mientras que otros fármacos que habían sido como reportados como factores de riesgo de la enfermedad en estudios de México como los son Clindamicina y Quinolonas.<sup>42, 51</sup>

Se pudo complementar que en el Hospital donde se llevó a cabo el estudio, tiene una baja incidencia de la enfermedad siendo en promedio de .92 casos por cada 1000 ingresos hospitalarios muy por debajo de la la incidencia Norte Americana de 8.2 casos por cada 100,000 ingreso<sup>40</sup>. Sin embargo la presencia de DACD en pacientes hospitalizados se asocia de manera estadísticamente significativa a una mayor cantidad de días de estancia hospitalaria permaneciendo en promedio 6.26 días que aquellos pacientes sin la infección. De igual manera la mortalidad asociada directamente a la enfermedad fue de 0% en los 5 años del estudio y la mortalidad en este grupo de pacientes fue de 3.4%

## Bibliografía

1. Hessen, M. T. (2010). In the clinic. *Clostridium difficile* Infection. *Annals of internal medicine*, 153(7), ITC41.
2. Moudgal V, Sobel JD. Clostridium Difficile Colitis. *Hospital Practice*, 20,3810/ho. 2012 02.954
3. Hall IC, O`Toole E. Intestinal flora in newborn infants with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. *Am J Dis Child* 1935; 49:390-402
4. Hambre DM, Rake G, McKee EM, Mac Phillamy HB. The toxicity of penicillin as prepared for clinical use. *Am J. Med Sci* 1943; 206: 642-52.
5. Barlett JG. Historical perspectives on studies of *Clostridium difficile* and *C.difficile* Infection *Clin Infect Dis* 2008;46 S4-S11
6. Finney JMT Gastroenterology for cicatrizing ulcer of the pylorus. *Bull John Hopkins* 1893;4;53-5
7. Hummel RP, Altemeier WA, Hill EO. Iatrogenic staphylococcal enterocolitis. *Ann Surg* 1964; 160; 551-60
8. Tedesco FJ, Barton RW, Alpers DH. Clindamycin-associated colitis: a prospective study. *Ann Intern Med* 1974; 81:429-33
9. Chang T-W, Bartlett JG, Gorbash SL, Onderdonk AB. Clindamycin induced enterocolitis in hamsters as model of pseudomembranous colitis in patients. *Infect Immun* 1978 20:526-9
10. Bartlett JG, Onderdonk AB, Cinceros RL, Kasper DL. Clindamycin associated colitis due to a toxin-producing species of *clostridium* in hamsters. *J Infect Dis* 1977; 136:701-5
11. Keighkey MR, Burdon DW, Alexander-Williams J Et al. Diarrhoea and pseudomembranous colitis after gastrointestinal operations: a prospective study. *Lancet* 1978; 2: 1165-7
12. Kim KH, Fekety R, Batts DH et al. Isolation of *Clostridium difficile* from environment and contacts of patients with antibiotic-associated colitis. *J Infect Dis* 1981; 143:42-50
13. Lessa FC, Gould Cv, McDonald C. Current Status of *Clostridium difficile* Infection epidemiology 2012; 55:S65-S70
14. McDonald LC, Killgore GE, Thompson A, et al. An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. *N Engl J Med* 2005;353:2433-41
15. Mandell, G. L. (Ed.). (2010). Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases.
16. Von Eichel-Streiber, C., Boquet, P., Sauerborn, M., & Thelestam, M. (1996). Large clostridial cytotoxins—a family of glycosyltransferases modifying small GTP-binding proteins. *Trends in microbiology*, 4(10), 375-382
17. Jank, T., Giesemann, T., & Aktories, K. (2007). Rho-glucosylating Clostridium difficile toxins A and B: new insights into structure and function. *Glycobiology*, 17(4), 15R-22R.
18. Just, I., Selzer, J., Wilm, M., von Eichel-Streiber, C., Mann, M., & Aktories, K. (1995). Glucosylation of Rho proteins by Clostridium difficile toxin B
19. Steele, J., Chen, K., Sun, X., Zhang, Y., Wang, H., Tzipori, S., & Feng, H. (2012). Systemic dissemination of Clostridium difficile toxins A and B is associated with severe, fatal disease in animal models. *Journal of Infectious Diseases*, 205(3), 384-391.

20. Rupnik, M., Wilcox, M. H., & Gerding, D. N. (2009). Clostridium difficile infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 7(7), 526-536.
21. Lyras, D., O'Connor, J. R., Howarth, P. M., Sambol, S. P., Carter, G. P., Phumoonna, T., ... & Rood, J. I. (2009). Toxin B is essential for virulence of *Clostridium difficile*. *Nature*, 458(7242), 1176-1179.
22. Kuehne, S. A., Cartman, S. T., Heap, J. T., Kelly, M. L., Cockayne, A., & Minton, N. P. (2010). The role of toxin A and toxin B in Clostridium difficile infection. *Nature*, 467(7316), 711-713.
23. Steele, J., Mukherjee, J., Parry, N., & Tzipori, S. (2013). Antibody against TcdB, but not TcdA, prevents development of gastrointestinal and systemic Clostridium difficile disease. *Journal of Infectious Diseases*, 207(2), 323-330
24. Kelly et al. C.P Pothoulakis C, Orellana J. Human colonic aspirates containing immunoglobulin A Antibody to *C. difficile* toxin A inhibit toxin A- receptor binding. *Gastroenterology*, 1992 102,35-40
25. Viscidi R, Laughon B.E. Yolken R. Bo-Linn P, Moench T. R. Ryder RW, Bartlett JG, Serum antibody response to toxins A and B of *C. difficile*. *J. Infect Dis* 148-93-100
26. Kyne L, Warny M, Qamar A, Kelly CP. Asymptomatic carriage of *C.difficile* and serum levels of IgG antibody against toxin A. *N Engl J Med*, 2000 343, 390-397
27. Sanchez-Hurtado, K. Correthe M, Mchllagger, R, Starr JM. Systematic antibody response to *Clostridium difficile* in colonized patients with and without symptoms and marched controls. *J. Med Microbiol* 57, 2008, 717-724
28. Kyne L, Warny M, Qamar A, Kelly CP Association between antibody response to toxin A and protection against recurren *Clostridium difficile* diarrhoea *Lancet* 2001,357, 189-193
29. Drudy D, Harnedy N, Fanning S, O'Mahony R, Kyne L. Isolation and charactreisation of toxin A-negative, toxin B positive *C.difficile* infecion. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2004,41, 237-242
30. Ciarán PK, Lorraine K The host immune response to *Clostridium difficile*, *J.med microbiol* ,60 1070-1079
31. Kelly C.P., Pouthiulakis C. Castagliuolo I. Bostwick EF, O'Keane JC, Keates S, LaMont JT Anti-*Clostridium difficile* bovine immunoglobulin concéntrate inhibits cytotoxicity and enterotoxicity of *C.difficile* toxins. *Antimicob Agentrs Chemoter* 1996, 40, 373-379
32. Aboudola S, Kotloff K, Kyne L Warny M, Kelly EC, Sougioultzis, Kelly CP, *Clostridium difficile* vaccine and serum immunoglobulin G antibody response to toxin A. *Infect Immun* 2003, 71,1608-1610
33. Sougioultzis S, Kyne L, Drudy D. Keates S, Maroo S. Pothulakis C. Giannasca PJ, Lee CK, Warny M, *Clostridium difficile* toxoid vaccine in recurrent *C.difficile*- associated diarrhea. *Gastroenterlogy* 2005 128, 764-770
34. Gould LH, Limbago B. Clostroidium difficile in food and domestic animals: a new foodborne pathogen? *Clin Infect Dis* 2010;51:577-582
35. Songer JG, Trinh HT, Killgore GE, et al. *Clostrodiium difficile* in retail meat products, USA 2007. *Emerg Infect Dis* 2009; 15: 819 -821
36. Rodriguez-Palacios A, Staempfli GR, Duffierl T, Weese JS. *Clostrodiium difficile* in retail ground meat, Canada. *Emerg Infect Dis* 2007; 13:485-487

37. Bakri MM, Beown DJ, Butcher JP, Sutherland AD. *Clostridium difficile* in ready-to-eat-salads, Scotland. *Emerg Infect Dis* 2009;15:817-818
38. Kowne MG, Mevius D, Wagenaar JA *et al.* *Clostridium difficile* in Dutch animals: their presence, characteristics and similarities with human isolates. *Clin Microbiol Infect* 2011
39. Al-Jumaili, I. J., Shibley, M., Lishman, A. H., & Record, C. O. (1984). Incidence and origin of *Clostridium difficile* in neonates. *Journal of clinical microbiology*,19(1), 77-78.ç
40. Miniño AM, Xu JQ, Kochanek KD, Deatgs: preliminary data for 2008, Natl Vital Stat Rep 2010; 59. Hyattsville, MD: National Center for Health Statistics. [http://www.cdc.gov/nchs/data/nvsr/nvser59/nvser59\\_02.pdf](http://www.cdc.gov/nchs/data/nvsr/nvser59/nvser59_02.pdf)
41. McDonald LC, Killgore GE, Thompson A, et al. An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. *N Engl J Med* 2005;353:2433-41
42. Camacho-Ortiz A., Ponce-de-Leon A., Sifuentes-Osornio J. Enfermedad asociada a *C.difficile* en America Latina *Gac Méd Méx*; 2009,145:223-229
43. Camorlinga-Ponce M, Gamboa M, Barragan JJ, Muños O, Fekety FR, Torres JF. Epidemiological aspects of *Clostridium difficile* in pediatric hospital and its role in diarrheal disease. *Eur J Clin Microbiol* 1987; 6:542-546c
44. Alcides AP, Brazier JS, Pinto LJ, Balassiano IT, Boente RD, de Puala GR. New PCR ribotypes of *Clostridium difficile* detected in children in Brazil: prevalent types of *Clostridium difficile* in Brazil. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2007;92:53
45. Dubberke ER, Reske KA, Olsen MA, McDonald LC, Fraser VJ. Short-and long term attributable costs of *Clostridium difficile* associated disease in nonsurgical inpatientients. *Clin Infect Dis* 2008; 46:497-504
46. Dubberke ER, Olsen MA. Burden of *Clostridium difficile* on the Healthcare System, *Clin Infect Dis* 2012; 55 S88-S92
47. Decker FH. Outcomes and length of Medicare nursing home stays: the role of registered nurses and physical therapists. *Am J Med Qual* 2008; 23:465-74
48. Jones A. The National Nursing Home Survey; 1999 summery. *Vital Health Stat* 2002;13:1-155
49. Decker FH. Outcomes and length of Medicare nursing home stays: the role of registered nurses and physical therapists. *Am J Med Qual* 2008, 23:456-74
50. Mc Farland LV, Suarwicz CM, Rubin MS, Fekety R, Elmer GW, Greenberg RN. Recurrent *Clostridium difficile* disease: epidemiology and clinical characteristics. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2007; 28:1219-27
51. Camacho-Ortiz A., Galindo-Fraga A, Range-Cordero A, Macias AE, Lamothe-Molina PL, Ponce de Leon Garduño AP, Sifuentes-Osornio J. Factors associated with *Clostridium difficile* disease in the tertiary-care medical institution in Mexico: a case control study. *Revista de investigación clínica* 61(5),371-377
52. Ananthakrishnan AN, Issa M, Binion DG. *Clostridium difficile* and inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* 2009; 38: 711-28
53. Surawicz, C. M., Brandt, L. J., Binion, D. G., Ananthakrishnan, A. N., Curry, S. R., Gilligan, P. H., ... & Zuckerbraun, B. S. (2013). Guidelines for diagnosis, treatment, and prevention of *Clostridium difficile* infections. *The American Journal of Gastroenterology*, 108(4), 478-498

54. Centers for Disease Control and Prevention (CDC): Severe *Clostridium difficile*- associated disease in populations previously at low risk-four states, 2005. *MMWR Morb Mortal wkly rep* 2005, 54:1201-1205
55. Naggie, S., Miller, B. A., Zuzak, K. B., Pence, B. W., Mayo, A. J., Nicholson, B. P., ... & Woods, C. W. (2011). A Case-control Study of Community-associated *Clostridium difficile* Infection: No Role for Proton Pump Inhibitors. *The American journal of medicine*, 124(3), 276-e1.
56. Kuntz, J. L., Chrischilles, E. A., Pendergast, J. F., Herwaldt, L. A., & Polgreen, P. M. (2011). Incidence of and risk factors for community-associated *Clostridium difficile* infection: a nested case-control study. *BMC infectious diseases*, 11(1), 194.
57. Malkan, A. D., Pimiento, J. M., Maloney, S. P., Palesty, J. A., & Scholand, S. J. (2010). Unusual manifestations of *Clostridium difficile* infection. *Surgical infections*, 11(3), 333-337
58. Mattila, E., Arkkila, P., Mattila, P. S., Tarkka, E., Tissari, P., & Anttila, V. J. (2013). Extra-intestinal *Clostridium difficile* infections. *Clinical Infectious Diseases*.
59. Cohen, S. H., Gerding, D. N., Johnson, S., Kelly, C. P., Loo, V. G., McDonald, L. C., ... & Wilcox, M. H. (2010). Society for Healthcare Epidemiology of America; Infectious Diseases Society of America. Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults: 2010 update by the society for healthcare epidemiology of America (SHEA) and the infectious diseases society of America (IDSA). *Infect Control Hosp Epidemiol*, 31(5), 431-455.
60. Pepin J, Routhier S, Gagnon S, Brazeau I. Management and outcomes of a first recurrence of *Clostridium difficile*- associated disease in Québec, Canada. *Clin Infect Dis* 2006; 42:758-764
61. McFarland LV, Elmer GW, Surawicz CM. Breaking the cycle: Treatment strategies for 163 cases of recurrent *Clostridium difficile* disease. *Am J Gastroenterol*, 2002; 97: 1769-1775
62. Johnson S, Adelman A, Clabots CR, et al. Recurrences of *Clostridium difficile* diarrhoea not caused by the original infecting organism. *J Infect Dis* 1989;159:340-343
63. Wilcox MH, Fawley WN, Settle CD, Davidson A. Recurrences of *Clostridium difficile* infection: Relapse or Reinfection? *J Hosp Infect* 1998;38:93-100.
64. McDonald LC, Owings M, Jeringan DB. *Clostridium difficile* infection in patients discharged from US short-stay hospitals, 1996-2003. *Emerg Infect Dis* 2006;12:409-415
65. Kim JW, Lee KL, Jeong JB, et al. Proton pump inhibitors as a risk factor for recurrence of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *World J Gastroenterol* 2010; 16:3537-3577.
66. Warny M, Vaerman JP, Avesani V, Delmee M. Human antibody response to *Clostridium difficile* toxin A in relation to clinical course of infection. *Infect Immun* 1994;62:384-389
67. Kelly CP, Kyne L. The host immune response to *Clostridium difficile*. *J. Med Microbiol*; 60 (Pt 8): 1070- 10
68. Feghaly RE, Sauber J, Deych E, Gonzalez C. Markers of Intestinal Inflammation, Not Bacterial Burden, Correlate with clinical outcomes in *Clostridium difficile* infection *Clin Infect Dis* 2013: 1-9
69. McFarland LV. Epidemiology of infectious and iatrogenic nosocomial diarrhea in a cohort of general medicine patients. *Am J Infect Control* 1995;23:295-305
70. Wiesen P, Wan Gossam A, Preiser JC. Diarrhoea in the critically ill. *Curr Opin Crit Care* 2006; 12:149-54), (Abraham B, Sellin JH. Drug induced diarrhea. *Curr Gastroenterol Rep* 2007; 9:365-72.), (Whelan K, Schneider

- SM. Mechanism, prevention, and management of diarrhea in enteral nutrition. *Curr Opin Gastroenterol* 2011; 27: 152-9
71. Sterin A, Voigt W, Jordan K. Chemotherapy-induced diarrhea as a risk factor for nosocomial infection. *J Infect Dis* 1990; 161:948-52
  72. Smith SA, Campbell SJ, Webser D, Curley M, Leddin D, Forward KR. A study of the prevalence of cytotoxic and non-cytotoxic *Klebsiella oxytoca* fecal colonization in two patient populations. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2009; 20:e169 (Zollner-Schwetz I, Hogenauer C, Joainig M, et al. Role of *Klebsiella oxytoca* in antibiotic-associated diarrhea. *Clin Infect Dis* 2008; 47: e74-8
  73. Asha NJ, Tompkins D, Wilcox MH. Comparative analysis of prevalence, risk factors and molecular epidemiology of antibiotic-associated diarrhea due to *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, and *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 2785-91 (Larson HE, Boriello SP. Infectious diarrhea due to *Clostridium perfringens*) *J. Infect Dis* 1988 157:390-1
  74. Redelings MD, Sorvillo F, Cascola L. Increase in *Clostridium difficile* related mortality rates, United States, 1999-2004. *Emerg Infect Dis* 2007; 13:1417-9
  75. Labbe AC, Poirer L, Maccannell D, et al. *Clostridium difficile* infections in a Canadian tertiary care hospital before and during a regional epidemic associated with the b1/NAP1/027 strain. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52:3180-7
  76. Hensgens, M. P., Goorhuis, A., Dekkers, O. M., van Benthem, B. H., & Kuijper, E. J. (2013). All-Cause and disease-specific mortality in hospitalized patients with *Clostridium difficile* infection: a Multicenter Cohort Study. *Clinical infectious diseases*, 56(8), 1108-1116
  77. Crobach MJ, Dekkers IM, Wilcox MH, Kuijper EJ. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): data review and recommendations for diagnosing *Clostridium difficile*-infection (CDI). *Clin Microbiol Infect* 2009; 15:1053-1066
  78. Deshoande A, PAsupuleti V, Rolston DD, et al. Diagnostic accuracy of real time polymerase chain reaction in detection of *Clostridium difficile* in the stool samples of patients with suspected *Clostridium difficile* in the stool samples of patients with suspected *Clostridium difficile* infection: a metaanalysis. *Clin Infect Dis* 2011; 53 e81-e90
  79. Babady JG. Detection of *Clostridium difficile* infection. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2010;31 (Suppl 1): S35-S37.
  80. Lysterly DM, Sullivan NM, Wilkins TD. Enzyme-linked immunosorbent assay for *Clostridium difficile* toxin A. *J Clin Microbiol* 1983; 17:72-78
  81. Swindells J, Brenwald N, Reading N, Oppenheim B. Evaluation of diagnostic test for *Clostridium difficile* infection. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 606-608
  82. Sharp SE, Ruden LO, Pohl JC; et al. Evaluation of the C. Diff Quik Chek Complete Assay, a New Glutamate Dehydrogenase and A/B Toxin Combination Lateral Flow Assay for Use in Rapid, Simple Diagnosis of *Clostridium difficile* Disease. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 2082-2086

83. Surawicz, C. M., Brandt, L. J., Binion, D. G., Ananthkrishnan, A. N., Curry, S. R., Gilligan, P. H., ... & Zuckerbraun, B. S. (2013). Guidelines for diagnosis, treatment, and prevention of *Clostridium difficile* infections. *The American journal of gastroenterology*, 108(4), 478-498
84. Kato, N., Ou, C. Y., Kato, H., Bartley, S. L., Luo, C. C., Killgore, G. E., & Ueno, K. (1993). Detection of toxigenic *Clostridium difficile* in stool specimens by the polymerase chain reaction. *Journal of Infectious Diseases*, 167(2), 455-458.
85. Kufelnicka, A. M., & Kirn, T. J. (2011). Effective utilization of evolving methods for the laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *Clinical infectious diseases*, 52(12), 1451-1457
86. Novak-Weekley, S. M., Marlowe, E. M., Miller, J. M., Cumpio, J., Nomura, J. H., Vance, P. H., & Weissfeld, A. (2010). *Clostridium difficile* testing in the clinical laboratory by use of multiple testing algorithms. *Journal of clinical microbiology*, 48(3), 889-893.
87. Riggs, M. M., Sethi, A. K., Zabarsky, T. F., Eckstein, E. C., Jump, R. L., & Donskey, C. J. (2007). Asymptomatic carriers are a potential source for transmission of epidemic and nonepidemic *Clostridium difficile* strains among long-term care facility residents. *Clinical Infectious Diseases*, 45(8), 992-998.
88. Surawicz, C. M., Brandt, L. J., Binion, D. G., Ananthkrishnan, A. N., Curry, S. R., Gilligan, P. H., ... & Zuckerbraun, B. S. (2013). Guidelines for diagnosis, treatment, and prevention of *Clostridium difficile* infections. *The American Journal of Gastroenterology*, 108(4), 478-498
89. George WL, Slutter VL, Citron D, Fingegold SM. Selective an differential médium for isolation of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol* 1979; 9:214-219
90. Marler LM, Siders JA, Wolters LC, Pettigrew Y SKitt BL, Allen SD. Comparison of fibe cultural procedures for isolation of *Clostridium difficile* from stools. *J Clin Microbiol* 1992; 30:514-516
91. Kufelnicka, A. M., & Kirn, T. J. (2011). Effective utilization of evolving methods for the laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *Clinical infectious diseases*, 52(12), 1451-1457.
92. Stamper PD, Alcabasa R, Aird D, et al. Comparison of a comercial real-time PCR assay for tcdB detection to a cell culture cytotoxicity assay and toxigenic culture for direct detection of toxin producing *Clostridium difficile* in clinical samples. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 373-378
93. Chang T-W, Bartlett JG, Gorbach SL, Onderdonk AB. Clindamycin induced enterocolitis in hamsters as a model of pseudomembranous colitis in patients. *Infect Inmun* 1978; 20:526-9
94. Kufelnicka, A. M., & Kirn, T. J. (2011). Effective utilization of evolving methods for the laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *Clinical infectious diseases*, 52(12), 1451-1457
95. Stamper PD, Alcabasa R, Arid D, et al. Comparison of a comercial real-time PCR assay for tcdB detection to a cell culture cytotoxicity assay and toxigenic culture for diect detection of toxin-producing *Clostridium difficile* in clinical samples. *J Clin Microbiol* 2009; 47:373-378
96. Drekonja DM, Butler M, Macdonald R *et al.* Comprarive effectiveness of clostridium difficile treatments: a systematic review. *Ann Intern Med* 2011 155:839-849
97. Nelson, R. (2007). Antibiotic treatment for *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults. *Cochrane Database Syst Rev*.

98. Tschudin-Sutter, S., Widmer, A. F., & Perl, T. M. (2012). *Clostridium difficile*: novel insights on an incessantly challenging disease. *Current opinion in infectious diseases*, 25(4), 405-411
99. Eiseman B, Silen W, Bascom GS, Kauvar AJ. Fecal Enema as adjunct in the treatment of pseudomembranous enterocolitis. *Surgery* 1958; 44:854-859.
100. Gough E, Shaikh, Manges AR. Systematic review of intestinal microbiota transplantation (fecal bacteriotherapy) for recurrent *Clostridium difficile* infection. *Clin Infect Dis* 2011;53:994-1002
101. Karlowsky JA, Laing NM, Zhanel GG. In vitro activity of OPT-80 tested against clinical isolates of toxin-producing *Clostridium difficile*. *Antimicrob Agents Chemoter* 2008; 52:4163-4165.
102. Shue YK, Sears PS, Sanhle S, *et al.* Safety, tolerance, and pharmacokinetic studies of OPT-80 in health volunteers following single and multiple oral doses. *Antimicrob Agents Chemoter* 2008; 52:1391-1395
103. Louie, T. J., Miller, M. A., Mullane, K. M., Weiss, K., Lentnek, A., Golan, Y. & Shue, Y. K. (2011). Fidaxomicin versus vancomycin for *Clostridium difficile* infection. *New England Journal of Medicine*, 364(5), 422-431.
104. Mullane, K. M., Miller, M. A., Weiss, K., Lentnek, A., Golan, Y., Sears, P. S.,... & Gorbach, S. L. (2011). Efficacy of fidaxomicin versus vancomycin as therapy for *Clostridium difficile* infection in individuals taking concomitant antibiotics for other concurrent infections. *Clinical infectious diseases*, 53(5), 440-447.
105. Salcedo J, Keates S, Pothoulakis C, *et al.* Intravenous immunoglobulin therapy for severe *Clostridium difficile* colitis. *Gut* 1997;41:366-370
106. Juang P, Skledar SJ, Zgheib NK, *et al.* Clinical outcomes of intravenous immune globulin in severe *Clostridium difficile* associated diarrhea. *Am J Ungect Control* 2007; 35: 131-137
107. Warny M, Vaerman JP, Avesani V, Delmee M. Human antibody response to *Clostridium difficile* toxin A in relation to clinical course of infection. *Infect Immun* 1994; 62:384-389
108. Aboudala S, Kotloff KL, Kyne L, *et al.* *Clostridium difficile* vaccine and serum immunoglobulin G antibody response to toxin A. *Infect Immun* 2003; 71: 1608-1610
109. Kotloff KL, Wasserman SS, Losonsky GA *et al.* Safety and immunogenicity of increasing doses of a *Clostridium difficile* toxoid vaccine administered to health adults. *Infect Immun* 2001;69:988-995
110. Seregin SS, Aldhamen YA, Rastall DP, *et al.* Adenovirus-based vaccination against *Clostridium difficile* toxoid vaccine in recurrent *C.difficile*-associated diarrhea. *Gastroenterology* 2005; 128:764-770
111. Gerdin DN, Johnson S. Management of *Clostridium difficile* infection: thinking inside and outside the box. *Clin Infect Dis* 2010;51:1306-1313
112. National *Clostridium difficile* Standards Group. National *Clostridium difficile* Standards Group: report to the Department of Health. *J Hosp Infect.* 2004;56 Suppl: 1-38
113. Johnston, B. C., Goldenberg, J. Z., & Guyatt, G. H. (2013). Probiotics for the Prevention of *Clostridium difficile*-Associated Diarrhea. *Annals of internal medicine*, 158(9), 706-707
114. Galvin S, Boyle M, Russel RJ, *et al.* Evaluation of vaporized hydrogen peroxide, Citrox and pH neutral Ecasol for decontamination of an enclosed area: a pilot study. *J Hosp Infect* 2012; 80: 67-70

115. Nerandzic MM, Cadnum JL, Putz MJ, Donskey CJ. Evaluation on an automated ultraviolet radiation device for decontamination of *Clostridium difficile* and other healthcare-associated pathogens in hospital rooms. *BMC Infect Dis* 2010;10:197
116. Balassiano, I. T., Yates, E. A., Domingues, R. M. C. P., & Ferreira, E. O. (2012). *Clostridium difficile*: a problem of concern in developed countries and still a mystery in Latin America. *Journal of medical microbiology*, 61(2), 169-179.
117. Quesada-Gómez, C., Rodríguez, C., del Mar Gamboa-Coronado, M., Rodríguez-Cavallini, E., Du, T., Mulvey, M. R., ... & Boza-Cordero, R. (2010). Emergence of *Clostridium difficile* NAP1 in Latin America. *Journal of clinical microbiology*, 48(2), 669-670.
118. Alcides, A. P., Brazier, J. S., Pinto, L. J., Balassiano, I. T., Boente, R. F., de Paula, G. R., ... & Domingues, R. M. (2007). New PCR ribotypes of *Clostridium difficile* detected in children in Brazil. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 92(1), 53-59.