



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE MEDICINA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E
INVESTIGACIÓN

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN "SALVADOR ZUBIRÁN"

**RELACION ENTRE ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL Y
ENFERMEDAD POR *CLOSTRIDIUM DIFFICILE*: UNA EVALUACIÓN DEL
ESTADO DE PORTADOR EN PACIENTES DURANTE REMISIÓN CLÍNICA**

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE
ESPECIALISTA EN INFECTOLOGÍA

PRESENTA:

Dra. Ma. Teresa Pérez Gutiérrez

TUTORES:

Dr. José Sifuentes Osornio

Dra. Miriam Bobadilla del Valle

Dra. Ma. de Lourdes Almeida Guerrero

Dr. Alfredo Ponce de León Garduño

Dr. Jesús K. Yamamoto Furusho

Ciudad de México, Julio de 2017.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

INDICE

INTRODUCCIÓN	4
RESUMEN	5
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
JUSTIFICACIÓN	23
HIPÓTESIS DE TRABAJO	24
OBJETIVOS	24
MATERIAL Y MÉTODOS	25
1. Diseño del estudio.	25
2. Lugar de estudio	25
3. Población.	25
4. Criterios de inclusión	25
5. Criterios de exclusión	25
6. Criterios de eliminación	25
7. Definiciones operacionales	26
Procedimientos	26
c. Proceso de la muestra	26
Definición de criterios y variables	30
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	32
CONSIDERACIONES ÉTICAS Y PREVENCIÓN DE RIESGOS	33
RESULTADOS	34

AGRADECIMIENTOS

A Dios por acompañarme y guiarme, por ser mi fortaleza y brindarme una vida llena de retos y aprendizaje.

A mi familia y amigos que han tenido siempre palabras de ánimo desde que comencé la carrera de Medicina, gracias por su amor, representan una bendición en mi vida.

A mis tutores que desde el primer me orientaron y con gran paciencia me dirigieron.

INTRODUCCIÓN

En la última década, la incidencia y severidad de enfermedad por *Clostridium difficile* (ECD) se han incrementado dramáticamente a nivel mundial. En estudios recientes, se ha encontrado un incremento significativo en la incidencia de ECD en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (EII).

Una particularidad de los pacientes con EII es la incidencia de portador asintomático de *C.difficile* más alta comparada con población general. El estado de portador asintomático es la condición donde *C.difficile* se detecta en ausencia de síntomas de infección y pruebas de identificación microbiológicas.

Pocos estudios han evaluado la prevalencia y la importancia de la colonización asintomática por *C.difficile* en la progresión a ECD sintomática, la transmisión de la infección, o los retos para el control de la ECD.

En este proyecto proponemos explorar la cohorte de pacientes con EII que se tiene en el INCMNSZ, con una base poblacional cercana a 800 pacientes de quienes se cuenta con la información de epidemiología clínica, sociodemográfica, presentación clínica de EII y co-morbilidades. Proponemos estudiar a estos pacientes para determinar la prevalencia de colonización por *C. difficile* durante remisión clínica y bioquímica, con el fin de conocer los factores clínicos y demográficos que favorecen este estado ya que hay evidencia creciente de que estos individuos sirven de reservorio para *C. difficile* y podrían tener un papel en la transmisión a individuos susceptibles quienes subsecuentemente pueden desarrollar ECD.

RESUMEN

En la última década, la incidencia y severidad de enfermedad por *Clostridium difficile* (ECD) se han incrementado dramáticamente a nivel mundial. En estudios recientes, se ha encontrado un incremento significativo en la incidencia de ECD en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (EII).

Una particularidad de los pacientes con EII es la incidencia de portador asintomático de *C.difficile* más alta comparada con población general. El estado de portador asintomático es la condición donde *C.difficile* se detecta en ausencia de síntomas de infección y pruebas de identificación microbiológicas.

Pocos estudios han evaluado la prevalencia y la importancia de la colonización asintomática por *C.difficile* en la progresión a ECD sintomática, la transmisión de la infección, o los retos para el control de la ECD.

En este proyecto proponemos explorar la cohorte de pacientes con EII que se tiene en el INCMNSZ, con una base poblacional cercana a 800 pacientes de quienes se cuenta con la información de epidemiología clínica, sociodemográfica, presentación clínica de EII y co-morbilidades. Proponemos estudiar a estos pacientes para determinar la prevalencia de colonización por *C. difficile* durante remisión clínica y bioquímica, con el fin de conocer los factores clínicos y demográficos que favorecen este estado ya que hay evidencia creciente de que estos individuos sirven de reservorio para *C. difficile* y podrían tener un papel en la transmisión a individuos susceptibles quienes subsecuentemente pueden desarrollar ECD.

MARCO TEÓRICO

Enfermedad por *Clostridium difficile*

En la última década, la incidencia y severidad de enfermedad por *Clostridium difficile* (ECD) se han incrementado dramáticamente a nivel mundial. En la ICD se han identificado factores de riesgo potenciales como el tratamiento con antibióticos de amplio espectro, la edad avanzada, hospitalización prolongada, inmunosupresión, múltiples comorbilidades, uso de inhibidores de bomba de protones y el surgimiento de cepas hipervirulentas de *Clostridium difficile*¹.

Clostridium difficile es una bacteria Gram positiva, anaerobia, formadora de esporas, mide aproximadamente de 2 a 17 micras y es de crecimiento rápido. Las esporas son muy resistentes al medio ambiente, más no la forma vegetativa la cual es muy sensible al oxígeno; produce 3 toxinas principales: la toxina A, también llamada enterotoxina, pesa 308 kd, se asocia a secreción intestinal, daño a la mucosa e inflamación. La toxina B pesa de 250-270 kd y es 1000 veces más potente como citotoxina; su papel exacto en la fisiopatología de la enfermedad no es del todo claro, pero se cree que actúa en conjunto con la toxina A para dañar la mucosa colónica. Ambas toxinas son letales en modelos animales si se inyectan por vía intravenosa, por lo que se cree que poseen efecto neurotóxico, además, ambas inducen la liberación de citolisinas. Algunas cepas de *C. difficile* producen una toxina binaria (CDT), tiene función de ADP-ribosiltransferasa, la cual también permite la depolimerización del citoesqueleto de la actina. La despolimerización de la actina inducida por toxinas también produce protrusiones de membrana

basadas en microtúbulos que forman una red sobre células epiteliales y aumentan la ribosilación de adherencia bacteriana.

El medio óptimo para su crecimiento es CCFA (cicloserina-cefoxitima-Fructosa) pero no se encuentra disponible en cualquier laboratorio, el cultivo de *Clostridium difficile* es relativamente lento pero muy sensible. Sin embargo, es poco común que se realice como una prueba de diagnóstico. Es recomendado para subsecuente tipificación y caracterización de las cepas con fines epidemiológicos.

2

La tipificación de *C. difficile* se realiza mediante la caracterización del ribotipo. El ribotipo es el estudio de las regiones inter espaciadoras del RNA ribosomal (16S-23S) de *C. difficile*. El ribotipo asociado con brotes y presentaciones clínicas más graves es 027/BI/NAP1. Actualmente, existen una gran cantidad de ribotipos asociados a patrones de resistencia a antibióticos y a virulencia.

Virtualmente cualquier antibiótico puede estar asociado al desarrollo de diarrea asociada a *C. difficile*. Temporalmente en los años 70 se asoció a ampicilina y clindamicina y posteriormente desde los años 80 y 90 se les asoció fuertemente a las cefalosporinas de tercera generación. Actualmente las fluoroquinolonas cada vez juegan un papel más importante como factor predisponente.

La bacteria se distribuye por ruta fecal-oral y en pacientes hospitalizados puede ser adquirido a través de la ingestión de esporas o bacterias vegetativas a través de las manos del personal de salud o del ambiente. 3

Fisiopatología

El factor desencadenante es una alteración en la flora colónica habitual, esto generalmente es propiciado por el empleo de antibióticos, procedimientos invasivos o algún otro factor. Estas condiciones le permiten a *C. difficile* que, de ser un colonizante, pueda proliferar y sobrepoblar el epitelio colónico. En esta etapa pueden desarrollarse diversas situaciones; si la inmunidad del huésped es adecuada y si los factores agresores se eliminan, el paciente puede controlar la sobrepoblación e inclusive eliminar la colonización y por ende la enfermedad no se manifiesta. Por el contrario, si la inmunidad se ve alterada y los factores agresores persisten, se propiciará la proliferación de *C. difficile* e iniciará la liberación de sus exotoxinas, lo cual provocará daño a la mucosa e inflamación de la misma, lo que da pie a las manifestaciones clínicas. 4

Manifestaciones clínicas

Los síntomas característicamente inician después de 5 a 7 días de haber iniciado el uso de antibióticos, pero este lapso es tan variado que puede presentarse desde el 1er día hasta 10 semanas después de haber suspendido su uso. El espectro de la enfermedad es muy amplio y va desde el portador asintomático hasta la colitis fulminante y muerte. La diarrea asociada a *C. difficile* sin colitis generalmente se presentan como un cuadro con menos de 10 movimientos

intestinales por día, asociados a fiebre, náusea, vómito, malestar generalizado y dolor abdominal leve. Del 15 a 23% de estos pacientes tendrán un curso autolimitado de diarrea si suspende el antibiótico agresor. Los cuadros de colitis pseudomembranosa son más intensos con mayor ataque al estado general, mayor dolor abdominal y distensión así como sangrado colónico y leucocitosis con desviación a la izquierda. Algunos casos no se presentan con cuadros diarreicos, sino con un megacolon toxico, que presenta un deterioro rápido y que puede llevar al paciente a ser sometido a colectomía o hasta la muerte.⁴

Diagnóstico.

Generalmente el cuadro clínico es la herramienta inicial del diagnóstico pero el definitivo se puede hacer por varios métodos de laboratorio o histopatológicos. La toxina detectada mediante cultivo tisular tiene una sensibilidad aproximada del 85%, con un tiempo para obtener resultados de 1 hasta 4 días, detecta cantidades tan pequeñas como de 10 pg, sin embargo, requiere más tiempo y esfuerzo que los ensayos más modernos. Otro método utilizado en la mayoría de los laboratorios es el ELISA, que detecta cantidades de 100 a 1000 pg, tiene una sensibilidad aproximada de 75% y se puede reportar en horas. Actualmente, el método que se recomienda en las Guías (infection control and hospital epidemiology may 2010, vol. 31, no. 5) es la determinación de las toxinas A y B mediante ELISA, es una prueba rápida pero poco sensible. Una estrategia para disminuir este problema es el uso de un método de dos pasos: la detección de glutamato deshidrogenasa (GDH) como prueba de escrutinio y después la prueba

confirmatoria con la detección de ácidos nucleicos de las toxinas A, B, Binaria con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Una de las pruebas de PCR con sensibilidad y especificidad alta es la de Xpert/C.difficile, con resultados en 45 min.

5

Enfermedad infamatoria intestinal

La enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerativa (CU) son dos trastornos inflamatorios idiopáticos con manifestaciones intestinales y extraintestinales. La incidencia y prevalencia depende del área geográfica que se revise; Una revisión sistemática publicada en 2012, incluyó datos de 167 estudios basados en poblaciones en Europa (1930–2008), 52 estudios en Asia y Medio Oriente (1950–2008), y 27 estudios en América del Norte (1920–2004), en el análisis de tendencia en el tiempo, 75% de los estudios de EC y 60% de los estudios sobre CU mostraron un aumento de la incidencia que fue estadísticamente significativo ($P < 0.05$). El estudio no incluyó datos de Sudamérica. Hay pocos datos epidemiológicos de los países en desarrollo, sin embargo, la incidencia y la prevalencia de EII están aumentando con el tiempo y en las diferentes regiones del mundo, indicando su surgimiento como enfermedad a nivel mundial 6.

En un estudio realizado en el INCMNSZ que tuvo como objetivo determinar la frecuencia de nuevos casos de CU durante el periodo 1987-2006, se identificaron 848 nuevos casos, con un promedio anual de 28.8 en el periodo 1987 a 1996 y

76.1 en el segundo periodo 1997 a 2006 ($P < 0.00008$). La incidencia de nuevos casos incrementó 2.6 veces comparando ambos periodos de tiempo. 7

El curso clínico de ambas es impredecible, caracterizado por periodos alternantes de remisión y exacerbación. La colitis ulcerativa se restringe al colon, pero la enfermedad de Crohn puede afectar el tracto gastrointestinal completo, desde la boca hasta el ano y los pacientes frecuentemente presentan dolor abdominal, fiebre y signos clínicos de obstrucción intestinal o diarrea con eliminación de sangre, moco o ambas. 8

El diagnóstico de CU se basa en la presencia de diarrea crónica por más de 4 semanas, evidencia de inflamación activa en la endoscopia y cambios crónicos en la biopsia; la enfermedad de Crohn puede tener una presentación clínica similar a CU, sin embargo algunas características distintivas son la presencia de enfermedad perianal (ej. Fisuras anales, absceso anorectal) y fistulas. Otras características sugestivas son la ausencia de inflamación rectal, la presencia de ileitis, la inflamación focal y granulomas mediante endoscopia y biopsia.

Se han propuesto marcadores bioquímicos de actividad entre los que destaca la calprotectina; fue descrita por primera vez en 1980, es una proteína que se encuentra en el citosol de los neutrófilos y macrófagos compuesta de 2 subunidades. Puede obtenerse a partir de plasma, orina, LCR, heces, saliva y

biopsias colónicas. La detección en muestras fecales de forma homogénea, se puede realizar hasta 7 días después de la toma y conservada a temperatura ambiente.

En EII, la presencia de inflamación activa se encuentra asociada con la migración de leucocitos, incluyendo neutrófilos, hacia la mucosa intestinal. Como resultado las muestras fecales contienen niveles elevados de proteínas inflamatorias incluyendo la calprotectina.

Ha mostrado gran utilidad en la diferenciación de la enfermedad en remisión y activa en pacientes tanto con en EC como en CU. Existe correlación alta entre los niveles de calprotectina y los hallazgos endoscópicos de pacientes con actividad de la enfermedad, no así con las escalas de actividad clínica actuales. Una utilidad adicional de la calprotectina fecal es como un marcador de monitoreo de la respuesta a la terapia biológica, y como predictor de colectomía en pacientes con CU grave. 9

Se ha demostrado que en pacientes con remisión clínica inducida por esteroides los niveles de calprotectina fecal pueden permanecer elevados. Sipponen et al, encontraron un decremento significativo en la calprotectina fecal en los pacientes con EC que respondieron tanto de forma clínica como endoscópica. 9

Aproximadamente 67% de los pacientes tienen al menos una recaída 10 años después del diagnóstico. El riesgo de recaída depende de la edad al momento de diagnóstico. En un estudio de 295 pacientes con CU, aquellos con inicio tardío

(diagnosticados a la edad de 50 años o mayores) tenían una probabilidad más alta de remisión clínica sin necesidad de esteroide (64 vs 49%) a un año, comparado con aquellos con CU de inicio temprano (diagnóstico entre los 18 y 30 años). Los factores que incrementan el riesgo de exacerbaciones son la presencia de fiebre o pérdida de peso al diagnóstico y la actividad de la enfermedad en el año precedente y haber tenido exacerbación en los dos primeros años del diagnóstico.¹⁰

Los pacientes con CU tienen una mortalidad ligeramente más alta comparada con la población general (HR 1.2 IC 95% 1.22-1.28). La mortalidad específica de causa a largo plazo, está incrementada en CU (enfermedades infecciosas HR 1.6 IC 95% 1.2- 2.2); trastornos gastrointestinales distintos a CU (HR 1.3, IC 95% 1.1 -1.5); y cáncer colorrectal (HR 1.5, IC 95% 1.2-1.8).¹¹

Durante la última década, la EII ha emergido como una de las condiciones humanas más vinculadas con la microbiota intestinal; El microbioma de humanos sanos está dominado por 4 filos bacterianos: Firmicutes, Bacteroides y en menor medida Proteobacterias y Actinobacterias.

Muchos locus de susceptibilidad en EII sugieren una respuesta alterada, se han identificado los cambios que se suscitan en el microbioma vinculados a EII:

Composición microbiana: disminución en la α diversidad, disminución en Bacteroides y Firmicutes, incremento en Gammaproteobacteria, presencia de

E.coli específicamente adherente e invasiva, presencia de Fusobacterium, disminución en Bifidobacterium y lactobacilos.

Función microbiana: Disminución en los ácidos grasos de cadena corta como el butirato, disminución en el metabolismo del butanoato y propanoato, disminución en la biosíntesis y transporte de aminoácidos e incremento del estrés oxidativo.¹²

La patogenia de EII puede resultar de la alteración del sistema inmune de la mucosa en contra de la flora intestinal comensal. Algunos estudios muestran que la microbiota intestinal es un factor esencial que dirige la inflamación en EII; de hecho el tratamiento a corto plazo con antibióticos con cobertura entérica reduce de forma dramática la inflamación intestinal y se ha demostrado eficacia particularmente en pouchitis. Además, los pacientes con EII muestran secreción mucosa de anticuerpos IgG y respuesta mucosa de células T en contra de la microbiota comensal.

Un gran número de especies bacterianas, principalmente Bifidobacterium, lactobacilos y el género Faecalibacterium pueden proteger al hospedero de inflamación mucosa mediante varios mecanismos, que incluyen, regulación a la baja de citosinas inflamatorias o estimulación de interleucina 10 (citosina antiinflamatoria).¹²

***Clostridium difficile* y enfermedad inflamatoria intestinal**

En estudios recientes, se ha encontrado un incremento significativo en la incidencia de ICD en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (EII). Rodemann et al evaluaron 350,000 admisiones hospitalarias entre 1998 - 2004 y observaron el doble de incidencia de ICD en pacientes con enfermedad de Crohn (9.5 a 22.3/1000 admisión) y triple en pacientes con colitis ulcerativa (18.4 a 57.6/1000 admisiones). Al parecer los pacientes con colitis ulcerativa tienen un riesgo más alto de ICD que los pacientes con enfermedad de Crohn, lo cual podría ser debido al daño extenso del colon en CUCI. Los pacientes con EII, tienen un riesgo 2-4 veces mayor que los pacientes sin EII. 13,14

La detección de la ICD en estos pacientes se complica, debido a que los síntomas, como dolor abdominal y diarrea, pueden ser debidos a la exacerbación de EII o a otra causa infecciosa, además por endoscopia se identifican con escasa frecuencia pseudomembranas y con frecuencia es poco útil en el diagnóstico diferencial. Por otro lado, la enfermedad por *C. difficile* tiende a afectar a pacientes más jóvenes y ser adquirida en la comunidad, lo cual está acorde con la gran diversidad de ribotipos observados en ICD, como sucede en una gran proporción de pacientes con EII en remisión clínica colonizados por *C. difficile*. Las diferencias tan acentuadas en el enfoque terapéutico, que incluye, terapia antibiótica específica vs. el incremento del grado de inmunosupresión para tratar la ICD y EII activa, enfatiza la importancia de identificar oportunamente esta infección sobrepuesta 13,14,15.

Para la población general se han identificado factores de riesgo para ICD. En contraparte, otros estudios han demostrado que no existe relación clara sobre el desarrollo de ICD en pacientes con EII y exposición previa a antibióticos, ni la influencia de los inhibidores de bomba de protones. 16

En general los pacientes con EII que desarrollan ECD presentan peor pronóstico a corto y largo plazo que aquellos sin EII.

Desenlaces a corto plazo

Duración de la estancia hospitalaria

Se ha informado controversia en los resultados del tiempo de estancia hospitalaria. Jodorkovsky et al., reportaron un promedio similar de estancia para pacientes con EII e ICD sobrepuesta comparada con los que no tuvieron ICD (11.7 vs 11, $P = 0.70$), en contraste, Issa et al., realizaron un estudio observacional retrospectivo en donde se evaluaron pacientes con EII, encontraron un promedio de duración de estancia hospitalaria de 13.5 días en pacientes admitidos con ICD en comparación con 6 días para aquellos sin ICD. 17, 18

Tasa de colectomía

En el Proyecto de Costes y Utilización de la Salud, se realizó un análisis de datos de más de 90% de los hospitales de Estados Unidos, en donde se observó un incremento de 6 veces en la tasa de colectomías en pacientes con EII e ICD en comparación con pacientes con ICD sin EII (OR= 6.6; 95% IC 4.7-9.3). Otro estudio de casos y controles reportó una tasa de 23.4% colectomías emergentes

en pacientes con EII e ICD en comparación a 13.5% (OR 2.09, IC 95% 0.72-6.1; P = 0.17) en aquellos con EII únicamente. 17-19

En comparación con los estudios mencionados anteriormente, otros autores han comunicado tasas bajas de colectomía urgente en pacientes con EII e ICD; dos estudios recientes del instituto de enfermedades digestivas de la clínica Cleveland no encontraron impacto negativo en el riesgo de colectomía dentro de los 3 meses del diagnóstico de ICD. En el primer estudio que incluyó 78 pacientes (39 con CUCI e ICD, 39 con ICD únicamente), 25 se sometieron a colectomía, de los cuales 12 (48%) tenían CUCI e ICD y 13 (50.9%) solo con CUCI (P=0.81). También en el segundo estudio, que incluyeron 146 pacientes (45 con CUCI e ICD y 101 pacientes con CUCI sin ICD, posterior a tres meses de la admisión no tuvieron diferencia significativa en relación a riesgo de colectomía; sin embargo en un seguimiento a un año, los pacientes con CUCI e ICD mostraron una tasa de colectomía, significativamente más alta que aquellos sin ICD. 20, 21

La diferencia entre las tasas de colectomía entre estudios de un único centro y multicéntricos podría ser debido a variaciones de la práctica clínica y umbrales para la cirugía, respuesta a terapia médica para ICD y los métodos usados para la recolección de datos.

Desenlaces a largo plazo

Pocos estudios han evaluado los desenlaces a largo plazo después de un episodio inicial de ICD en pacientes con EII. En un estudio retrospectivo que incluyó 47 pacientes con CUCI mas EII y 52 con CUCI sin EII, se informó que durante el año después del episodio de infección inicial, se registró un incremento significativo en

el número de visitas al departamento de urgencias (8 vs 1, $P= 0.012$), así como un número más alto de hospitalizaciones relacionadas a CUCI (58 vs 27, $P= 0.001$) y un incremento de dos veces la tasa de colectomía (44% vs 25%, OR 2.38, 95% IC 1.01 – 5.6; $P= 0.04$) comparado con pacientes con CUCI sin ICD.17

Murphy et al, en un estudio de cohorte retrospectivo de pacientes con CUCI con y sin ICD, encontraron que la ICD, estuvo asociada con un riesgo de mortalidad ajustado (aHR) a 5 años (aHR 2.40, IC 95% 1.37-4.20, pero no de colectomía (aHR=1.18, IC 95% 0.90-1.54). 22

En otro estudio retrospectivo, se observó que los pacientes con ICD acudieron al departamento de urgencias con mayor frecuencia por causas relacionadas a CUCI (37 vs 4, $P < 0.001$) y una tasa más alta de colectomía (35.6 vs 9% $P < 0.001$) en el año que siguió a la infección inicial que aquellos con CUCI solamente. Además, 55.8% de pacientes con CUCI e ICD necesitaron escalar en terapia médica en el año después del ingreso debido a la infección índice comparados con 12.9% ($P < 0.0001$). Los resultados del análisis multivariado mostraron como factores de riesgo de colectomía, la enfermedad severa por endoscopia (OR 16.7, IC 4.1-67.9, $P > 0.001$) y la ICD (OR 10.0, IC 95% 2.7-36.3, $P < 0.01$), los cuales se encontraron independientemente asociados con colectomía en el primer año. 21

Los costos en salud son más altos en pacientes con EII e ICD, que en aquellos sin esta infección agregada, debido a estancia hospitalaria prolongada, alto número de hospitalizaciones relacionadas a EII y necesidad más alta de colectomía. Nguyen et al encontraron un incremento promedio de costos de 46% y 63% para pacientes con CUCI y enfermedad de Crohn, respectivamente. 20,23

Estado de portador de *Clostridium difficile*

Una particularidad adicional de pacientes con EII es la incidencia más alta comparada con población general de portador asintomático de *C.difficile*. El estado de portador asintomático es la condición donde *C.difficile* se detecta en ausencia de síntomas de infección y pruebas de identificación microbiológicas.²⁴

En un análisis prospectivo de esta condición en pacientes con EII ambulatorios sin actividad clínica, se identificó una prevalencia de 8.2% comparado con 1% de la población general. ²⁵

Pocos estudios han evaluado la prevalencia y la importancia de la colonización asintomática por *C.difficile* en la progresión a ICD sintomática, la transmisión de la infección, o los retos para el control de la ICD.

Existen estudios en individuos colonizados por *C.difficile* en donde se sugieren varios mecanismos mediante los cuales *C.difficile* toxigénico puede habitar el tracto intestinal sin causar enfermedad. Los anticuerpos circulantes a TcdA y TcdB, se inducen potencialmente, mediante exposición al organismo en edad temprana y podrían tener efecto protector en contra de los efectos citopáticos de las toxinas de *C.difficile*. En una investigación de cohorte prospectiva de 271 pacientes se demostró que 37 de ellos estaban colonizados por *C. difficile* con niveles significativamente más altos de IgG contra TcdA aunque no significativos de IgG contra TcdB, comparados con pacientes con ICD, lo cual sugiere que existe protección mediada por anticuerpos. ²⁶

***Clostridium difficile* en México**

Los primeros reportes de ICD en México fueron en población pediátrica, evaluaron la incidencia de *C. difficile* y su actividad citotóxica en las heces de 122 niños menores de un año de edad. Cincuenta y dos niños tuvieron diarrea relacionada a antibióticos y 26 no tenían diarrea ni recibieron antibióticos y 22 con diarrea no relacionada a antibióticos. El aislamiento de *C. difficile* en heces fue similar entre todos los grupos (promedio 23.4%) excepto para el grupo con diarrea no asociada a antibióticos (4.5%). En ambos grupos de niños que recibieron antibióticos, con o sin diarrea, la citotóxina fue detectada en 7.6% de los casos. En el grupo de diarrea no asociada a antibióticos, ninguna de las muestras fue positiva para citotoxicidad. En niños sanos la citotoxina fue positiva en 4.5% de los casos. 27

En el Instituto de Nutrición Salvador Zubirán, durante el 2009 se estimó la prevalencia de ICD, durante el periodo de 2003-2007, así como los factores de riesgo asociados a *C. difficile*. Se obtuvo una tasa de positividad (toxina A) de 5.43% (170/3171), con una tasa anual de infección de 5.04 casos por cada 1000 egresos. Además, se encontraron los siguientes factores de riesgo para adquirir ICD: presencia de VIH, días de estancia hospitalaria, días de empleo de antibiótico antes del diagnóstico, uso de antibióticos previos al diagnóstico, estancia en UTI, albúmina <3, quimioterapia en las últimas seis semanas y bloqueadores H2. En el análisis multivariado, se observó que el uso de bloqueadores H2, edad mayor a 65 años, hospitalización durante las 12 semanas previas, uso previo de cefalosporinas, uso previo de quinolonas, estancia en UTI, días de empleo de

antibióticos y días de estancia hospitalaria, aumentaron el riesgo de presentar ICD ($P < 0.05$). 28

En este proyecto proponemos explorar la cohorte de pacientes con EII que se tiene en el INCMNSZ, con una base poblacional cercana a 800 pacientes de quienes se cuenta con la información de epidemiología clínica, sociodemográfica, presentación clínica de EII y co-morbilidades. Proponemos estudiar a estos pacientes para determinar la prevalencia de colonización por *C. difficile* durante remisión clínica y bioquímica, con el fin de conocer los factores clínicos y demográficos que favorecen este estado ya que hay evidencia creciente de que estos individuos sirven de reservorio para *C. difficile* y podrían tener un papel en la transmisión a individuos susceptibles quienes subsecuentemente pueden desarrollar ICD.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La EII, es una condición inflamatoria crónica y recurrente del tracto gastrointestinal, que está íntimamente vinculada al microbioma del intestino humano. Se han identificado cambios sustanciales en la composición y función del microbioma en EII que favorecen respuestas inflamatorias, estrés oxidativo y la colonización por flora potencialmente patógena.

Se ha mostrado en la literatura que el 8% de los pacientes con EII son portadores de *C. difficile* en comparación con el 1% de pacientes sin EII, además existe un incremento en la incidencia de ICD y mayor morbi-mortalidad, a pesar de la ausencia de otros factores de riesgo como la edad > 65 años, uso de inhibidores de bomba de protones, uso de antibióticos y estancia hospitalaria ampliamente descritos.

La colonización, la enfermedad y la recurrencia de la ECD en los pacientes con EII revelan la compleja interacción entre factores microbiológicos, ambientales y de susceptibilidad del hospedero.

Pocos estudios han evaluado la prevalencia y la importancia de la colonización asintomática por *C. difficile* en pacientes con EII y su posible repercusión patológica.

JUSTIFICACIÓN

Es importante evaluar el estado de portador de *C. difficile* en pacientes con EII en etapa de remisión, debido a que es inconsistente en la literatura actual su papel en la fisiopatogenia de la enfermedad por *C. difficile* y podría ser un factor de riesgo adicional para esta población.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal tienen una frecuencia elevada de colonización asintomática por *C. difficile* durante episodios de remisión clínica - bioquímica.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Determinar la tasa de colonización por *C. difficile* en pacientes de la cohorte del INCMNSZ con enfermedad inflamatoria intestinal durante remisión clínica

Objetivos específicos:

Determinar si los pacientes con EII en remisión clínica –bioquímica son portadores de *C. difficile*

Identificar si los aislados de *C. difficile* recuperados de muestras de pacientes con EII con remisión clínica – bioquímica son toxigénicos

Determinar el ribotipo en los aislados clínicos de *C. difficile* toxigénicos

Identificar los factores de riesgo para colonización

MATERIAL Y MÉTODOS

1. **Diseño del estudio:** observacional, transversal.
2. **Lugar de estudio.** Se realizará en la clínica pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal y el laboratorio de microbiología del INCMNSZ.
3. **Población.** Pacientes de la cohorte de la clínica de enfermedad inflamatoria intestinal que se encuentren en remisión clínica y bioquímica. Todos los pacientes incluidos en el estudio, firmarán consentimiento informado.
4. **Criterios de inclusión**
Pacientes >18 años de edad

Ambos sexos

Diagnóstico de CUCI-enfermedad de Crohn, en etapa de remisión clínica y/o bioquímica
5. **Criterios de exclusión**
Exacerbación clínica de la enfermedad inflamatoria intestinal al momento de la inclusión
6. **Criterios de eliminación**
Enfermedad por *Clostridium difficile* actual

Enfermedad por *Clostridium difficile* en las últimas 6 semanas

7. Definiciones operacionales

Enfermedad inflamatoria intestinal: Diagnóstico establecido basado en cuadro clínico y hallazgos endoscópicos e histopatológicos.

Remisión clínica de enfermedad inflamatoria intestinal: presencia de menos de 3 evacuaciones al día, sin sangre, sin pujo o tenesmo rectal en los últimos 3 meses.

Remisión bioquímica de enfermedad inflamatoria intestinal: Pacientes con ausencia de anemia, Velocidad de Sedimentación Globular (VSG) y Proteína C Reactiva (PCR) con valores normales o en caso de anormalidad atribuidos a una causa distinta a exacerbación, niveles de calprotectina < 165 pg/g.

Procedimientos

a. Se realizará evaluación sociodemográfica, clínica y de laboratorio (VSG-PCR-citometría hemática, calprotectina) a los pacientes reclutados mediante cuestionario.

b. Se solicitará a los pacientes que asistan a su consulta de seguimiento una muestra de materia fecal.

c. Proceso de la muestra.

i) Determinación de GDH. A la muestra de materia fecal se le realizará prueba de GDH (Biomerioux, USA) según las instrucciones del fabricante, para determinar la presencia de *C. difficile*. La prueba consiste en una ELISA cualitativa.

ii) Obtención de DNA de la muestra directa mediante el kit QIAamp (Qiagen GmbH, Hilden, DE). Se realiza de acuerdo con las instrucciones del fabricante

iii) Detección de toxinas A, B y binaria

Toxinas A y B.

El volumen final de la mezcla de reacción es de 25µL, oligonucleótidos tcdA1 5'ATGATAAGGCAACTTCAGTGG 3', tcdA2 5' TAAGTTCCTCCTGCTCCATCAA 3', tcdB1 5' GAGCTGCTTCAATTGCAGAGA3', tcdB2 5' GTAACCTACTTTCATAACACCAG3' a una concentración de 25picomoles/µL de cada uno, buffer de reacción 1×, MgCl₂ 3 mMol, dNTP's 250µMol, 1.5U de Taq polimerasa y 5µL de DNA. Las condiciones de amplificación serán: con 30 ciclos, con los parámetros siguientes: un paso inicial de 94°C 5 min, desnaturalización a 94 °C durante 1min, alineamiento 52°C 1 min y extensión 72°C 1min y extensión final a 72°C 10 min de extensión final. Las muestras se analizaran mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, utilizando un marcador molecular de DNA de 1 kb, a 100V, durante 1h, para después observar en fotodocumetador (gel logic 1500 Kodak, USA).

Toxina binaria

El volumen final de la mezcla de reacción es de 20µL, oligonucleótido cdtAf 5' TGAACCTGGAAAAGGTGATG3', cdtAr 5' AGGATTATTTACTGGACCATTTG3', cdtBf 5' CTTAATGCAAGTAAATACTGAAG3', cdtBr 5' AACGGATCTCTTGCTTCAGTC3', a una concentración de 30 pmoles/µL de cada uno, buffer de reacción 1×, MgCl₂ 2.5 mMol, dNTP's 250µMol, 1.5U de Taq

polimerasa y 5µL de DNA. Las condiciones de amplificación serán: 40 ciclos, con los parámetros siguientes: un paso inicial de 94°C, 5 min; desnaturalización 94°C 45 seg, alineamiento 52°C 1 min, extensión 72°C, 80 seg, extensión final 72°C, 8 min. Las muestras se analizarán mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, utilizando un marcador molecular de DNA de 1 kb, a 100V, durante 1h, para después observar en fotodocumetador (gel logic 1500 Kodak, USA).

Cultivo de *C. difficile*. En un tubo de ensaye con 2ml de etanol se adicionan 2ml de heces del paciente (dilución 1:2) se incuba una hora a temperatura ambiente, posteriormente se centrifuga a 4100 rpm, 10 minutos; se retira el sobrenadante y del sedimento se toma una pequeña muestra para sembrarla en agar CCFA y agar sangre carnero; ambos medios se colocan en la jarra para anaerobiosis colocando un sobre generador de una atmosfera anaeróbica con 5% de CO₂ (AnaeroGen Thermo Scientific, UK). Se incuban a 35°, 48hrs y se revisan las placas; si se observan colonias compatibles con *C. difficile* por su olor, morfología, y fluorescencia bajo la luz UV, se realizará la identificación definitiva con tarjeta VITEK2 (BiMérieux, NC, USA).

Determinación del ribotipo del aislado clínico de *C. difficile* toxigénico

Se realizará amplificación por PCR con oligos que flanquean la región 16S-23S rRNA (16S CTGGGGTGAAGTCGTAACA-FAM, 23S GCGCCCTTTGTAGCTTGACC). Las condiciones de la reacción serán: volumen final de 100µL, oligonucleótidos a concentración de 25picomoles/µL (el oligo 16S rRNA) se encuentra marcado con un fluorocromo), buffer de reacción 1x el cual

tiene MgCl₂ a 2.5mM, dNTP's 300mMol, 0.4μL Hot-star polimerasa 1.5U, 70μL de agua y 5μL de DNA. Las condiciones en el termociclador serán: un paso inicial para la activación de la polimerasa Hot-Star a 94°C 5 min, 35 ciclos, 94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 2 min y extensión final a 72°C 10 min. Las muestras se analizarán mediante electroforesis capilar en un secuenciador serie 3500 (Applied Biosystems, Tokio, Japón) con capilar de 50cm y POP 7 (Applied Biosystems), utilizando un marcador molecular LIZ600. La inyección de la muestra es de 5 KV durante 5 seg, a 15 KV de corrida.

Definición de criterios y variables

VARIABLES Y MEDICIONES.

Desenlaces

- Se determinará la tasa de colonización por *C. difficile* en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal durante remisión clínica - bioquímica.
- Se identificará si los pacientes con EII en remisión clínica –bioquímica son portadores de *C. difficile*
- Se evaluará si existe *C. difficile* toxigénica o no toxigénica en muestras de pacientes con EII con remisión clínica – bioquímica
- Se identificará el ribotipo de cada uno de los aislados clínicos de *C. difficile*
- Se identificarán los factores de riesgo para colonización

Variables

- Datos generales: nombre, lugar y fecha de nacimiento
- Datos socio-demográficos: sexo, edad, estado civil, grado escolar
- Comorbilidades
- Uso de dispositivos invasivos al momento del reclutamiento
- Tipo de enfermedad inflamatoria intestinal
- Extensión solo para pacientes con CUCI 1= proctitis 2= colitis izquierda 3=pancolitis
- Edad al diagnóstico

- Tabaquismo
- Antecedente familiar de EII
- Tratamiento 1=5-ASA 2= sulfasalazina 3=esteroide 4=tiopurinas dosis 5=
Acs monoc 6=otro
- Dosis
- Tiempo con este manejo
- Razón del cambio
- Infección previa por *C. difficile* 1=si, 2=no fecha
- Severidad de la exacerbación
- Tratamiento 1=5-ASA 2= sulfasalazina 3=esteroide 4=tiopurinas dosis 5=
Acs monoc 6=antibiótico
- Días estancia hospitalaria
- Desenlace hospitalario 1= remisión con manejo médico 2= escalar
inmunosupresión 3= colectomía 4=ileo-megacolon 5=estancia hospitalaria
prolongada (>14 d) 6=muerte
- Hospitalización en los últimos 3 meses 1=si, 2=no Duración (días)
- Contacto reciente con el sistema de salud 1=si, 2=no (HD-estancia corta en
urgencias-estancia de cuidados crónicos)
- Antibióticos en los últimos 3 meses 1=si, 2=no Cuál(es)? Motivo de
prescripción

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizará el paquete estadístico STATA versión 12 (college station, Texas) para el análisis.

Descripción de las variables

Se utilizará promedio, mediana así como desviación estándar y rangos para variables de tipo cuantitativo.

Las variables cualitativas se expresarán en número y porcentaje.

El cálculo de la tasa de portador se expresará por 100 pacientes observados y se calculará utilizando el número de pacientes que resulten positivos entre el número de pacientes examinados y se calcularán sus intervalos de confianza al 95%

Para la evaluación de posibles factores de riesgo, se utilizará la prueba t de student o U de Mann whytney para comparar variables de tipo cuantitativo dependiendo de la distribución de los datos.

Para las variables de tipo cualitativo se utilizará la prueba de chi cuadrada o prueba exacta de Fisher según corresponda.

Se utilizará un modelo de regresión logística para el cálculo de la magnitud de asociación entre las variables que resulten con una $p > 0,10$ en los análisis previos.

Se llevará a cabo un análisis multivariado con las variables que resulten estadísticamente significativas para valorar el riesgo independiente de cada una de estas variables.

Se considerará un valor de P de dos colas ≤ 0.05 para considerar una asociación estadísticamente significativa.

CONSIDERACIONES ÉTICAS Y PREVENCIÓN DE RIESGOS

Los pacientes firmarán un consentimiento informado previo al análisis de la muestra de materia fecal.

Dada la naturaleza de la investigación no existe riesgo para los pacientes

RESULTADOS

En el periodo comprendido entre 24 de abril 2017 (fecha en que se obtuvo la aprobación del comité de ética) hasta el 08 de agosto 2017 se reclutaron 77 pacientes de la clínica de Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) estos pacientes firmaron un consentimiento informado.

La distribución por sexo fue 48 (62.5%) mujeres y 29 (33.6%) hombres; El promedio de edad fue de 37.5 años. Un 71.42% de los pacientes tuvieron CUCI y 19.4% con diagnóstico de enfermedad de Crohn. En su mayoría 93.4% de los pacientes estaba en remisión de la enfermedad y solo 6 (7.7%) tenían historia de enfermedad por *Clostridium difficile*. Sin hacer diferencia entre el tipo de EII, el 32.89% de los pacientes había requerido cirugía intestinal durante alguna exacerbación de la enfermedad. La mayoría de los pacientes 57.1% no tuvieron otra comorbilidad.

Únicamente 22.3% de los pacientes tenía historial en los últimos 3 meses de dispositivos invasivos y 63.1% no había recibido antibióticos en el mismo periodo de tiempo. El 42.1% de los pacientes en los 3 últimos meses había usado inhibidor de bomba de protones. Solo el 9% de la cohorte tuvo antecedente de enfermedad por *Clostridium difficile*. Se identificó que 9% de los pacientes estuvieron colonizados por cepas de *Clostridium difficile* no toxigénico.

Se realizará un seguimiento cuatrimestral de estos pacientes, hasta completar 3 evaluaciones.

Tabla 1. Características clínicas de los pacientes incluidos

	Global (n=77)
Edad (años)	37.5%
Género n (%)	
Masculino	33.6%
Femenino	62.5%
Intestinal (%)Tipo de Enfermedad Inflamatoria	
CUCI	71.4%
Enfermedad de Crohn	19.4%
Pacientes sin comorbilidades (%)	77.1%
Cirugía Intestinal previa	32.8%
Uso de dispositivos invasivos en los últimos 3 meses	22.3%
Uso de antibióticos en los últimos 3 meses	34.2%
Uso de inhibidor de protones	42.1%
Antecedente de infección por <i>Clostridium difficile</i>	6%
Colonizados por <i>Clostridium difficile</i>	9%

CITAS BIBLIOGRAFICAS

1. Lessa FC, Mu Y, Bamberg WM, Beldavs ZG et al. Burden of Clostridium difficile infection in the United States. N Engl J Med. 2015 Feb 26; 372(9):825-34
2. Dale N Gerding, Stuart Johnson, Maja Rupnik. Clostridium difficile binary toxin CDT Mechanism, epidemiology, and potential clinical importance. Gut Microbes 5:1, 15–27; January/February 2014
3. Vardakas KZ et al; Clostridium difficile infection following systemic antibiotic administration in randomised controlled trials: a systematic review and meta-analysis. Int J Antimicrob Agents. 2016 Jul; 48(1):1-10
4. Alison L Galdys; Asymptomatic Clostridium difficile colonization as a reservoir for Clostridium difficile infection. Expert Rev. Anti-Infect. Ther. 12(8), 967–980 (2014)
5. Christina M. Surawicz, Lawrence J. Brandt, David G. Binion. Guidelines for Diagnosis, Treatment, and Prevention of Clostridium difficile Infections. Am J Gastroenterol 2013; 108:478–498
6. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. Gastroenterology 2012; 142:46–54
7. Jesús K. Yamamoto-Furusho, Clinical Epidemiology of Ulcerative Colitis in Mexico A Single Hospital-based Study in a 20-year Period (1987-2006). J Clin Gastroenterol. Volume 43, Number 3, March 2009.
8. Park SJ, Kim WH, Cheon JH. Clinical characteristics and treatment of inflammatory bowel disease: a comparison of Eastern and Western perspectives. World J Gastroenterol 2014; 20:11525–37.
9. Smith Lyn A and Daniel R. Gaya. Utility of faecal calprotectin analysis in adult inflammatory bowel disease. World Journal of Gastroenterology. 2012 Dec 14;18 (46): 6782-6789
10. Langholz E, Munkholm P, Davidsen M, et al. Course of ulcerative colitis: analysis of changes in disease activity over years. Gastroenterology. 1994; 107(1):3
11. Jess T, Frisch M, Simonsen J. Trends in overall and cause-specific mortality among patients with inflammatory bowel disease from 1982 to 2010. Clin Gastroenterol Hepatol. 2013; 11(1):43

12. Aleksandar D. Kostic, Ramnik J. Xavier, Dirk Gevers. The Microbiome in Inflammatory Bowel Disease: Current Status and the Future Ahead. *Gastroenterology* 2014;146:1489–1499
13. Trifan A. Impact of Clostridium difficile infection on inflammatory bowel disease outcome: a review. *World J Gastroenterol.* 2014; 20:11736–8
14. Rodemann JF, Dubberke ER, Reske KA, da Seo H, Stone CD. Incidence of Clostridium difficile infection in inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2007; 5(3):339–44
15. Nancy Fu, Titus Wong. Clostridium difficile Infection in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Curr Infect Dis Rep* (2016) 18:19
16. Monaghan TM, Cockayne A, Mahida YR. Pathogenesis of Clostridium difficile infection and its potential role in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2015; 21:1957–66
17. Jodorkovsky D, Young Y, Abreu MT. Clinical outcomes of patients with ulcerative colitis and co-existing Clostridium difficile infection. *Dig Dis Sci* 2010; 55: 415-420
18. Issa M, Vijayapal A, Graham MB, Beaulieu DB, et al. Impact of Clostridium difficile on inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; 5: 345-351
19. Agency for Healthcare Research and Quality. Healthcare Cost and Utilization Project-HCUP. A federal-state-industry partnership in health data. Sponsored by the Agency for Healthcare Research and Quality. Introduction to the HCUP State Inpatient Databases (SID). Available from: URL: [http://www.hcup-us.ahrq.gov/db/state/siddist/Introduction to SID.pdf](http://www.hcup-us.ahrq.gov/db/state/siddist/Introduction%20to%20SID.pdf)
20. Kariv R , Navaneethan U, Venkatesh PG, Lopez R, Shen B. Impact of Clostridium difficile infection in patients with ulcerative colitis. *J Crohns Colitis* 2011; 5: 34-40
21. Navaneethan U, Mukewar S, Venkatesh PG, Lopez R, Shen B. Clostridium difficile infection is associated with worse long term outcome in patients with ulcerative colitis. *J Crohns Colitis* 2012; 6: 330-336
22. Murthy SK, Steinhart AH, Tinmouth J, et al. Impact of Clostridium difficile colitis on 5-year health outcomes in patients with ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2012; 36: 1032-1039

23. Nguyen GC, Kaplan GG, Harris ML, Brant SR. A national survey of the prevalence and impact of *Clostridium difficile* infection among hospitalized inflammatory bowel disease patients. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 1443-1450
24. Alberto Cózar-Llistó, Antonio Ramos-Martinez, Javier Cobo. *Clostridium difficile* Infection in Special High-Risk Populations *Infect Dis Ther.* (2016) 5:253–269
25. Clayton EM, Rea MC, Shanahan F, et al. The vexed relationship between *Clostridium difficile* and inflammatory bowel disease: an assessment of carriage in an outpatient setting among patients in remission. *Am J Gastroenterol.* 2009; 104:1162–9
26. Kyne L, Warny M, Qamar A, et al. Asymptomatic carriage of *Clostridium difficile* and serum levels of IgG antibody against toxin A. *N Engl J Med* 2000; 342(6):390-7
27. Torres JF, et al. Prevalence of *Clostridium difficile* and its cytotoxin in infants in Mexico. *J Clin Microbiol.* 1984 Aug; 20(2):274-5
28. Camacho-Ortiz A, Galindo-Fraga A, Rangel-Cordero A, et al., Factors associated with *Clostridium difficile* disease in a tertiary-care medical institution in Mexico: a case-control study. *Rev Invest Clin.* 2009 Sep-Oct; 61(5):371-7.