



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS Y
NUTRICION SALVADOR ZUBIRAN

**Estudio de las características fenotípicas y moleculares de
Clostridium difficile en un hospital de tercer nivel**

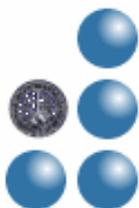
TESIS DE POSGRADO
PARA OBTENER EL DIPLOMA DE
ESPECIALIDAD EN INFECTOLOGIA

P R E S E N T A:

DRA. RAQUEL MENDOZA AGUILAR

Tutor principal de tesis:
Dr. Alfredo Ponce de León Garduño

Asesores:
Dr. José Sifuentes Osornio
Dr. Arturo Galindo Fraga
Dra. Miriam Bobadilla del Valle
Dra. Lourdes Guerrero Almeida



AGOSTO 2010



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.

Dr. Luis Federico Uscanga Domínguez

Director de Enseñanza

Dr. Luis Alfredo Ponce de León Garduño

Tutor principal de Tesis

Dr. Guillermo Ruiz Palacios y Santos

Profesor Titular del Curso

DEDICATORIA

En memoria de mi hermano Juan Mendoza Aguilar, siempre presente en mi mente y mi
corazón

AGRADECIMIENTOS

A DIOS por todas las bendiciones que me ha dado en la vida y por permitirme hoy poder dar un paso adelante en mi vida profesional llena de vida y amor

A Javier, mi compañero de vida, mi apoyo, mi impulso, mi consejero; le agradezco su paciencia, amor y fe que depositó en mí día a día, que me hicieron crecer y ser mejor persona.

A mis padres Juan y Lidia, por su apoyo incondicional, amor y consejos

A mis hermanos Judith, Juan y Jose Luis, personas muy especiales para mí

Al Dr. Sifuentes y al Dr. Ponce de León, que depositaron su confianza en mí, por sus enseñanzas, su paciencia, su tiempo... que sin su ayuda esto no hubiera sido posible, gracias!

A mis asesores Dr. Arturo Galindo, Dra. Miriam Bobadilla, Dra. Lourdes Guerrero, por su tiempo, por su apoyo incondicional

Al personal de Laboratorio de Microbiología, que me han hecho sentir parte de ellos, me han ofrecido su ayuda y amistad; en especial quiero agradecerles Melisa Hernández y Araceli Hernández que me facilitaron todas las herramientas necesarias para mi aprendizaje y elaboración de éste trabajo.

A mis compañeros y amigos en el hospital: Samuel, Javier, Ariel, Rafa, Pedroski, Arturo, Uri, Karina, Robin, Abraham, por compartir este momento conmigo...

En especial quiero agradecerle a Sol y Omar, por su gran ayuda, su paciencia, su esmero, su amistad y su tiempo... ustedes fueron una herramienta importante en este trabajo, gracias!

A mi profesor titular del curso, el Dr. Guillermo Ruiz Palacios, por darme la oportunidad de crecer y seguir aprendiendo como médico, por sus enseñanzas...

A todos los médicos que han contribuido en mi formación profesional y humana... gracias!

ÍNDICE

	Página
Resumen	5
Marco teórico.....	7
1. Microbiología.....	7
2. Toxinas.....	7
3. Fisiopatología.....	9
4. Epidemiología.....	10
5. <i>Clostridium difficile</i> en México.....	15
6. Cepa NAP1/BI/027.....	19
7. Factores de riesgo.....	21
8. Manifestaciones clínicas.....	23
9. Diagnóstico diferencial.....	25
10. Diagnóstico.....	26
11. Tratamiento.....	29
12. Prevención.....	41
Justificación.....	43
Objetivos.....	43
Material y métodos.....	44
Resultados.....	56
Discusión.....	64
Conclusión.....	68
Anexos.....	69
Bibliografía.....	70

RESUMEN

Título: Estudio de las características fenotípicas y moleculares de *Clostridium difficile* en un hospital de tercer nivel

Introducción: *Clostridium difficile* en un bacilogram positivo, anaerobio estricto, formador de esporas y toxinas, descrito por primera vez en 1935. Sin embargo, fue hasta 1978, cuando se reconoció como causa de colitis pseudomembranosa y 3 años más tarde se describió, la producción de toxinas A y B, como factor de virulencia del mismo. En los pacientes hospitalizados, la diarrea asociada a antibióticos ocurre en el 29% de los casos. *C. difficile* es la causa del 20-30% de los pacientes con diarrea asociada a antibióticos, 50-75% de los pacientes con colitis asociada a antibióticos y > 90% con colitis pseudomembranosa asociada a antibióticos. En general, la incidencia de enfermedad asociada a *C. difficile* (EACD) va de 1-10 casos por cada 1000 admisiones, lo que aumenta la morbi mortalidad y los costos. Sin embargo, fue a partir del año 2000, cuando comenzó a describirse en diferentes regiones del mundo, un aumento en el número de casos, con incremento en la tasa de complicaciones y mortalidad, falla a tratamiento convencional y recaídas, identificándose como responsable la cepa NAP1/BI/027. Por lo anterior, varios países han desarrollado programas de vigilancia epidemiológica en busca de esta cepa. Por lo que, al no haber reportes sobre el tipo de cepas de *C.difficile* que afectan a la población mexicana, así como de la existencia o no de cepas hipervirulentas, nos dimos a la tarea de establecer un sistema para su detección.

Objetivos: Describir las características fenotípicas y moleculares de las cepas de *C. difficile* que circulan en el Instituto, mediante: su patrón de sensibilidad antimicrobiana, producción de toxinas A/B, presencia de genes Tcd A y Tcd B y presencia del gen Tcd C y su delección de 18pb

Material y Métodos: Se realizó un estudio transversal. De las muestras de heces enviadas al laboratorio de Microbiología del INNSZ, para búsqueda de toxina A/B de *C.difficile*, durante el periodo del 1 de Junio del 2008 al 31 de Mayo del 2009, se realizó la prueba por inmunoensayo enzimático y se aisló *C.difficile* en agar CCFA y agar carnero. De la muestra, se extrajo DNA para búsqueda de Tcd C y su mutación; de la cepa de *C.difficile*, se buscaron los genes Tcd A y Tcd B, por PCR multiplex y antibiograma, mediante dilución en

agar. Por último se describió el espectro clínico de la enfermedad asociada a *Clostridium* en relación a los resultados ya comentados.

Resultados: se envió un total de 784 muestras para búsqueda de toxina A/B de *Clostridium difficile*; con una tasa de positividad del 7.14% (56/784) solo con toxinas positivas, 9.69% (76/784) con cultivos positivos y 11.86% (93/784) con cultivo y/o toxina positivo. La tasa anual de EACD por cada 1000 egresos, fue de la siguiente manera: para toxina +: 10.9 casos por cada 1000 egresos, cultivo +: 12.3 casos por cada 1000 egresos y cultivo y/o toxina +: 15.89 casos por cada 1000 egresos.

Se aislaron un total de 76 cepas, la mayoría toxigénicas, con ambos genes TcdA y Tcd B; el 22.6% tuvo la delección del gen TcdC y el 100% fueron sensibles a metronidazol y vancomicina. Se obtuvo un total de 93 pacientes con toxina A/B positiva y/o cultivo con *C.difficile*; 16% comunitario y 84% asociado a los cuidados de la salud. El 20% se catalogo como portadores asintomáticos y 65 pacientes con EACD; 48 pacientes (73.8%) no cumplieron criterios de severidad y 17 pacientes si (26.2%). La mayoría de los pacientes con enfermedad por *Clostridium* recibió metronidazol, y no se encontraron diferencias cuando se comparo la falla a tratamiento y las recaídas entre ambos grupos; también se compararon algunas características fenotípicas y moleculares de las cepas entre los pacientes con enfermedad severa y no severa; sin encontrar asociaciones entre genes y resistencia antimicrobiana con la severidad del cuadro. De los 17 pacientes con EACD severa, 2 tuvieron cepas con mutación en el gen Tcd C y resistencia a moxifloxacino, características de la cepa NAP1/BI/027. Por último, se encontró una mortalidad asociada a *C.difficile* < 1%.

Conclusión: Aunque los resultados obtenidos fueron preliminares, los características fenotípicas, moleculares y clínicas, señalan la existencia de cepas hipervirulentas en nuestro país; sin embargo tendrá que corroborarse la existencia o no de NAP1 mediante PCR y/o electroforesis de campos pulsados más adelante. En general, hubo un incremento en la tasa de infección y enfermedad por *C.difficile*, y esto conjunto con el punto anterior, nos enfatiza la importancia de reforzar las medidas de prevención y control descritas en pacientes con *C. difficile*.

Planteamiento del problema

Hasta el momento, no hay reportes sobre el tipo de cepas de *Clostridium difficile* que afectan a la población mexicana, así como de la existencia de cepas hipérvirulentas en México

MARCO TEÓRICO

Microbiología

Clostridium difficile en un bacilogram positivo relativamente grande (2-17mcm de largo), anaerobio estricto, formador de esporas y toxinas, de rápido crecimiento, descrito por primera vez en 1935, ¹ con su olor característico a heces de caballo. Se nombró inicialmente *Bacillus difficilis* por la dificultad en su aislamiento en medios convencionales y 3 años más tarde se renombró *Clostridium difficile*.

Inicialmente *Clostridium* se observó como componente de la flora intestinal de los neonatos sanos y su frecuencia en niños < 1 año se ha reportado entre un 20 y 64%, siendo la mayoría solo portadores asintomáticos;¹ el papel como patógeno se describió hasta 1970 cuando se observó su toxina en el excremento de pacientes con colitis pseudomembranosa asociada a antibióticos. Mas tarde en 1974, Tedesco y colaboradores reportaron en un ensayo retrospectivo, 200 pacientes con exposición a clindamicina, de los cuales, 41 desarrollaron diarrea y 20 pacientes colitis pseudomembranosa. Sin embargo, fue hasta 1978 cuando se reconoció a *C.difficile* como causa de colitis pseudomembranosa y 3 años más tarde se describió la producción de toxinas A y B como factor de virulencia del mismo ².

El análisis en su DNA ribosomal indica que *C.difficile* está relacionado con *C.sordellii* pero no a otros *Clostridium* toxigénicos como *C.perfringes*, *C.botulinum* y *C. tetani*.

Clostridium puede existir en forma de esporas, que es la forma infectante y en la forma vegetativa, que es el bacilo que normalmente se conoce. Las esporas suelen ser resistentes al calor, al ácido y a los antibióticos y el bacilo, a través de la producción de toxinas, produce enfermedad.

Toxinas

C. difficile produce 2 exotoxinas que son las causantes de colitis y diarrea: toxina A y toxina B, codificadas por los genes Tcd A y Tcd B, respectivamente. Junto con 2 genes reguladores: Tcd C y Tcd D, así como un gen porina, Tcd E, forman un locus patogénico cromosómico, llamado PaLoc ó *Locus* de patogenicidad, como se muestra en la figura 1:

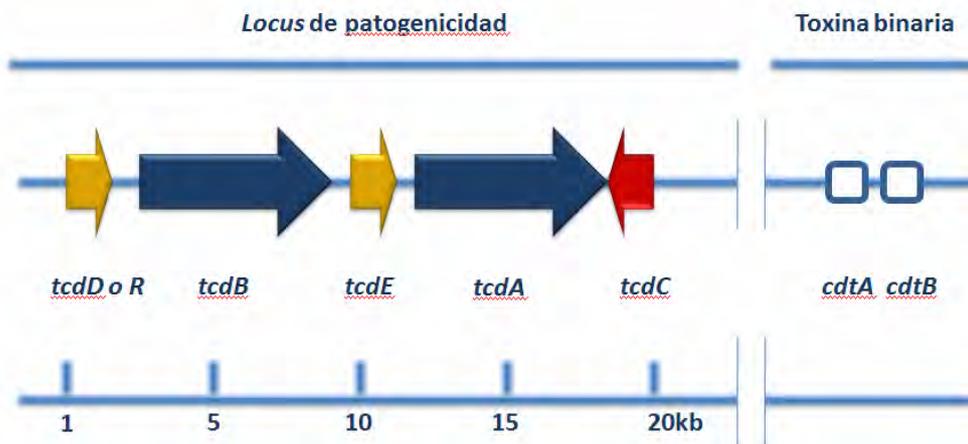


Figura 1. Locus patogénico de *C. difficile* compuesto por los genes: Tcd A, Tcd B, Tcd C, Tcd D y Tcd E. Los genes Cdt A y Cdt B que codifican para la toxina binaria no forman parte del Locus.

El gen Tcd D y Tcd E estimulan la expresión de toxinas A y B y de manera contraria, el gen Tcd C se encarga de la regulación negativa, por lo que, los polimorfismos o deleciones del éste gen, puede producir un aumento en la expresión de toxina A y/o B, y los niveles de toxina en heces, correlaciona con la severidad de la enfermedad,³ es decir, a mayor cantidad de toxina, mayor severidad de la enfermedad.

Las toxinas A y B contienen una serie de unidades repetitivas y contiguas en el término carboxil. Para la toxina A, esta región es importante para su receptor ya que se une y facilita el transporte intracelular, así como para su búsqueda por ELISA⁴. En el caso de la toxina B, su receptor aun no ha sido identificado. Una vez dentro de las células, toxina A y B inactivan las vías reguladoras mediadas por las proteínas de la familia Rho involucradas en el citoesqueleto y en la transducción vía guanosina trifosfato (GTP). Esta disrupción lleva a la retracción celular y apoptosis; además ambas toxinas, alteran también las uniones intercelulares^{5,6}.

IN vitro, se ha observado que las toxinas A y B alteran el citoesqueleto de los fibroblastos en el cultivo de tejido y en las células epiteliales del intestino, producen glicosilación de las proteínas Rho a través de la uridin-5 difosfato glucosa².

Toxina A entonces, produce lesión e inflamación en el epitelio intestinal, dando lugar a la fuga de líquido intestinal. Los mediadores de la inflamación son metabolitos del ácido araquidónico, sustancia P, TNF, IL-8, IL-6, IL-1 (51-54). Esta toxina, también activa a los neutrófilos y ambas toxinas (A y B) promueven la quimiotaxis para localizar a las células inflamatorias (principalmente neutrófilos) en las pseudomembranas y en la mucosa intestinal^{7,8}.

Toxina B es 10 veces más potente que la toxina A en mediar el daño en la mucosa colónica^{9,10}. Por lo tanto las cepas que no tiene toxina A pueden ser tan virulentas como las que tienen ambas toxinas.

Existe una tercer toxina, conocida como toxina binaria, que se encuentra en algunas cepas productoras de enfermedad, con una frecuencia que varía del 1-16%¹¹. Esta toxina es codificada por 2 genes cromosómicos, separados del *Locus* patogénico: Cdt A y Cdt B. El gen Cdt B codifica una proteína de la toxina que media la unión en la superficie celular y la traslocación intracelular, mientras que Cdt A rompe el ensamblaje del filamento de actina, mediante la ribosilación de adenosin difosfato, produciendo muerte celular, siendo la toxina binaria, un factor de virulencia extra en el *Clostridium difficile*¹².

Por último, hay un pequeño porcentaje de cepas de *C. difficile* no productoras de toxinas y por tanto no patógenas, solo colonizan el tracto gastrointestinal¹³.

Fisiopatología

Tanto el hospedero como el huésped juegan un papel importante en la epidemiología de *C.difficile*. Algunos factores del huésped que pueden influir en el desarrollo de la enfermedad pueden ser niveles de IL-8, receptores intestinales de toxina y la producción de anticuerpos vs toxina A^{14,15,16,17}. La producción de anticuerpos vs toxina A es el factor del huésped mejor descrito en la patogénesis de la enfermedad. Los portadores asintomáticos muestran niveles séricos más elevados de IgG vs toxina A que los pacientes que desarrollan la enfermedad por *C.difficile*. En un estudio prospectivo con 271 pacientes hospitalizados, los enfermos con niveles bajos o indetectables de anticuerpos vs toxina A, eran más susceptibles a desarrollar EACD, que aquellos con anticuerpos detectable (OR 48; IC 95% 3.4-678). Estas observaciones se hicieron en ausencia de niveles de anticuerpos basales previos a la infección. El montar una respuesta de anticuerpos vs toxina A durante un episodio inicial de enfermedad asociada a *Clostridium* se asoció con una protección relativa contra episodios recurrentes^{15,18}.

Estar colonizado con cepas no toxigénicas también otorga protección. Parece que tener *C.difficile* como colonizante, protege contra una super infección por una nueva cepa^{19,20}.

El aumento en los niveles de IL-8, parecen correlacionarse con una alteración en la respuesta humoral vs toxina A y aumenta por tanto la probabilidad de adquirir la enfermedad asociada a *C.difficile*^{21,22}. Un estudio con 125 pacientes hospitalizados: 42 con EACD, 42 con *C. difficile* pero sin cuadro clínico y 41 sin ninguno

de los dos, se observó que la frecuencia de un alelo de IL-8 con un solo polimorfismo (genotipo AA, responsable del aumento en la producción de IL-8), se asoció de manera significativa con el desarrollo de EACD en comparación con los 2 grupos controles (39% vs 16 y 17%)²¹. Los pacientes que tuvieron enfermedad asociada también tuvieron niveles más elevados de IL-8 a nivel fecal comparada con los controles.

En el caso de los neonatos, la ausencia de receptores intestinales para las toxinas de *C. difficile* puede ser un factor protector vs *Clostridium*. Aunque esta observación se ha hecho en modelos animales neonatos, también puede tener un papel importante en la patogénesis de *C. difficile* en los humanos²³. Este grupo de edad tienen un rango elevado de portadores asintomáticos (>50%) con títulos elevados de toxina en heces. El desarrollo de inmunoglobulinas en suero y heces se desarrolla a los 2 años de edad en el 60% de los niños sanos y esto se mantiene hasta la adultez^{24,25}.

Epidemiología

La diarrea es una de las complicaciones más comunes asociadas al uso de antibióticos y la colitis, una de las complicaciones más serias. En los pacientes hospitalizados, la diarrea asociada a antibióticos ocurre en el 29% de los casos. *C. difficile* es la causa del 20-30% de los pacientes con diarrea asociada a antibióticos, 50-75% de los pacientes con colitis asociada a antibióticos y > 90% con colitis pseudomembranosa asociada a antibióticos²⁶.

La colonización por *C. difficile* ocurre en el 20-50% de los adultos hospitalizados comparado con el 3% de los adultos sanos en general. Los individuos colonizados sirven como reservorio para contaminar el ambiente y es que *C. difficile* es altamente transmisible a través de fomites y puede ser cultivado de casi cualquier superficie incluyendo manos, ropa y estetoscopio del personal de salud; por lo que es fácil su transmisión entre los pacientes dentro del nosocomio.

Una nueva exposición a *C. difficile*, es más probable que produzca enfermedad, mientras que los pacientes ya colonizados es más probable que permanezcan asintomáticos durante su hospitalización. Lo anterior se demostró en un estudio prospectivo en 810 pacientes hospitalizados: 192 ya estaban colonizados y 618 no lo estaban; los expuestos por primera vez a *Clostridium*, desarrollaron con más frecuencia enfermedad que los ya colonizados (22 vs 1)²⁷. Este fenómeno se observó aún cuando portadores y pacientes que desarrollaron la

enfermedad, se expusieron a la misma cepa. Incluso los brotes son con frecuencia producidos por una sola cepa de *C. difficile* aun cuando muchas otras cepas existan en el medio; como ocurrió en 2 brotes en el mismo hospital que fueron atribuidos a una sola cepa aunque se aislaron 31 cepas distintas de 98 pacientes en la institución.

En general, la incidencia de enfermedad asociada a *C. difficile* (EACD) va de 1-10 casos por cada 1000 admisiones, lo que aumenta la morbi mortalidad y los costos ²⁸. La duración de estancia hospitalaria en un paciente con EACD, se prolonga de 18-30 días y la enfermedad por episodio, tiene un costo extra estimado de 4,107 euros, calculado por el grupo británico y 3,340 dólares por el grupo americano.

Entre 1989 y 1992, se identificó una cepa de *C. difficile* altamente resistente a clindamicina (cepa J), causante de brotes en 4 hospitales en EUA ²⁹. El uso de clindamicina se identificó como un factor de riesgo para adquirirla.

Mas tarde, en 2004, el Dr. Pepin y colaboradores, notaron en el condado de Sherbrook, Quebec, Canadá, un aumento espectacular en la frecuencia y severidad de enfermedad por *Clostridium*. Fue un estudio retrospectivo con 1771 casos y se observó que la incidencia de EACD aumentó 4 veces: de 35.6 casos por cada 100 000 habitantes en 1991 a 156.3 por cada 100 000 habitantes en 2003; con una mortalidad 3 veces mayor: 4.7% en 1991 vs 13.8% en 2004 y 2.5 veces el número de EACD complicada: 7.1% en 1991 vs 18.2% en 2003. En un subgrupo de pacientes mayores de 65 años, hubo un incremento hasta 10 en la incidencia: 102 en 1991 a 866.5 en 2004 por cada 100 000 habitantes. En los pacientes hospitalizados, la incidencia aumentó de 3-12 por cada 1000 admisiones (1991-2002) a 25-43 por cada 1000 (2003-2004), observándose en éstos últimos, casos más severos y refractarios a tratamiento; 10% requirieron admisión a la UTI, 2.5% fueron sometidos a colectomía de urgencia y la mortalidad fue del 16% ³⁰.

Posteriormente, la Dra. Loo y colaboradores, publican en el año 2005, un ensayo prospectivo en 12 hospitales en Québec, con 1703 pacientes, notando también un aumento en la incidencia de EACD nosocomial: 22.5 casos por cada 1000 admisiones, con una mortalidad a 30 días del 6.9%. Las cepas aisladas de *C. difficile* fueron tipificadas por electroforesis de campos pulsados y analizadas para los genes de toxina binaria y deleciones parciales en el gen Tcd C, encontrando que de 157 cepas, 129 fueron resistentes a fluoroquinolonas, 132 tuvieron los genes para toxina binaria y el gen Tcd C con deleción parcial del mismo, siendo la mayoría (129/157) identificadas como NAP1. Por otro lado, se realizó un estudio de casos y

controles para identificar factores de riesgo para adquirir esta nueva cepa, identificando que el uso de fluoroquinolonas aumentó 3.9 veces su frecuencia (OR 3.9 IN 95% intervalo de 2.3-6.6) así como las cefalosporinas en general (OR 3.8 IC 95% 2.2-6.6) ¹².

Al mismo tiempo CDC (Centros de prevención y control de enfermedades) notó un aumento en la frecuencia y severidad de *C.difficile* asociada a los cuidados de la salud desde el 2000 en EUA, con un rango de 31 a 61 casos por cada 100 000 habitantes entre 1996 y 2003, siendo superior en el subgrupo mayor de 65 años: 228 por cada 100, 000 habitantes. Igualmente, notaron un aumento en la mortalidad: 5.6 – 23.7 por cada 100 000 habitantes en 1999 y 2003 respectivamente, siendo responsable nuevamente esta nueva cepa hipervirulenta descrita desde el 2001 como NAP1/BI/027, toxinotipo III. Hasta Octubre del 2008, se han reportado un total de 40 estados afectados por ésta cepa (EUA).

Por otro lado, en el año 2008, en el noveno congreso de la Sociedad Americana de Anaerobios, Thompson en una conferencia que llevó como nombre: Diversidad de cepas entre los aislamientos de *C. difficile* comunitarios y asociados a los cuidados de la salud, mostro que de 151 cepas nosocomiales y 30 cepas comunitarias, el 54% y 50% respectivamente fueron tipificadas como NAP1 ³¹.

Por lo anterior, desde el 2005, en Europa, hay países que desarrollaron programas de vigilancia epidemiológica para identificar la existencia de esta cepa (027). Hasta Junio del 2008, 16 países han reportado la existencia de *C. difficile* NAP1/BI/027, siendo responsable de brotes en Bélgica, Alemania, Finlandia, Francia, Irlanda, Luxemburgo, Holanda, Suiza y Reino Unido (Inglaterra, Wales, Norte de Islandia y Escocia). Por otro lado, 7 países han reportado la cepa ribotipo 027 como casos aislados: Austria, Dinamarca, Suecia, Noruega, Hungría, Polonia y España ³².

Cuadro 1. *Clostridium difficile* tipo 027: Brotes en Europa

País	Periodo de Vigilancia	No. Hospitales +/No. Hospitales investigados 027 (%)	No. Cepas 027 aisladas/Total cepas aisladas (%)	Mortalidad atribuible a <i>C.difficile</i>
Bélgica	2007	32/74 (43%)	158/856 (18%)	-----
Dinamarca	2006-2008	3/6 (50%)	13/44 (30%)	-----
Finlandia	2007-2008	4/9	131/268 (49%)	NA
Francia	2006-2007	64/214 (30%)	337/1227 (27%)	NA
Alemania	2007-2008	13/NA	44/NA	2.3%
Irlanda	2006	7/NA	107/NA	NA
Luxemburgo	2006-2008	10/10	96/368 (26%)	-----
Holanda	2005-2007	35/70 (50%)	285/1553 (18%)	4.1%
Suiza	2005-2008	3/10 (30%)	26/250 (10%)	-----
Inglaterra	2006-2007	110/147(76%)	879/2084 (42%)	-----
Escocia	2006-2008	9/18 (50%)	20/253 (5.7%)	-----

Cuadro 2. *Clostridium difficile* tipo 027: Casos esporádicos en Europa

País	Periodo de Vigilancia	No. Hospitales +/No. Hospitales investigados 027 (%)	No. Cepas 027 aisladas/Total cepas aisladas (%)	Mortalidad atribuible a <i>C.difficile</i>
Austria	2006	1/43 (2%)	1/1004 (<1%)	-----
Noruega	Enero-Abril/08	1/2	3/47 (6%)	-----
Polonia	2005	1/4	1/400 (<1%)	-----
España	Enero-Junio/07	1/1	4/388 (1%)	-----
Suecia	1997-2001 Mayo 2008	-----	4/1325 (<1%)	-----
Hungría	-----	-----	1/150 (<1%)	-----
Canada, Quebec	1997-2002	-----	1/55 (1.8%)	-----

En el cuadro 3, se muestra el cambio en la epidemiología molecular ocurrido en estos 3 lugares en el mundo, antes del 2001, predominando la cepa ribotipo 001 y después del 2001 con predominio de esta nueva cepa ribotipo 027^{33,34,35}:

Cuadro 3. Cambio en la epidemiología molecular de *C. difficile* en 3 países

	Canadá	EUA / CDC	Reino Unido
Periodo	< 2000	< 2001	1996
Cepa	-Ribotipo 001 -Ribotipo 027 -Otros	Ribotipo 001 (Cepa J) Toxinotipo 0	-Ribotipo 001 -Ribotipo 106 -Ribotipo 027
Periodo	> 2000	2001	2007 - 2008
Cepa	-Ribotipo 027 -Ribotipo 001 -Otros	NAP1/BI/027 Toxinotipo III	-Ribotipo 027 -Ribotipo 106 -Ribotipo 001

Los reportes en los países latinoamericanos se limitan a reporte de casos con series pequeñas, la mayoría en adultos mayores de 60 años, a excepción de un reporte en Brazil, con una media de 48 años. El método diagnóstico predominante fue la detección de toxinas A y/o B por ELISA, a excepción de Argentina y Chile que emplearon ensayo de citotoxicidad y cultivo. Una de las constantes como factores de riesgo, fue el uso de antimicrobianos en donde predominan las quinolonas y en general la mortalidad reportada es igual o menor al 4% (cuadro 4):

Cuadro 4. Reporte de casos en países latinoamericanos de *C. difficile*

Característica	Gardilic M y col. 2000	Fernández y col. 2001	Álvarez L y col. 2001	Herrera P y col. 2003	Marcon AP y col. 2006	García C. y col. 2007
País (año)						
Tipo de estudio	Retrospectivo, descriptivo	Retrospectivo, descriptivo	Prospectivo, observacional	Retrospectivo, descriptivo	Casos y controles	Transversal, observacional
No. pacientes EACD	27	16	26	33	49	55
Grupo etario	Adultos	Adultos	≥ 15 años	≥ 15 años	> 13 años	≥ 14 años
Característica del grupo estudiado	Toxina positiva	Hosp. y ambul	Hospitalizados	Nefrológicos	> 72hrs en UTI	Hospitalizado
Edad en años	65.5 (77.7% > a 65)	73 (75% > a 65)	70* (80% > 60)	63.2 (69% > a 60)	48.7	61
Género fem (%)	62.9	56.2	57	51	45	38.2
Método de diagnóstico	Tox A (Becton-Dickinson)	Detección de efecto citopático y cultivo	Detección de efecto citopático	Tox A (Becton-Dickinson)	Toxin A/B kit (Radiascreen)	Toxina A y B (Remel, Lenexa, KS)
Antib. previos	100%	100%	100%	79%	95.9%	-----
Antib. > asociación	Cipro	Cipro	Penicilina	Cipro	Ceftria	Clinda
Días de EIH previos	25	32 ^a	16.8	ND	ND	ND
Tratamiento inicial	Metronidazol ^A	Metro y Vanco	ND	Metronidazol	ND	ND
Mortalidad atribuida	4%	ND	3.8%	3%	ND	ND

^ASolo un caso inició tratamiento con vancomicina oral
^BPromedio solo de los pacientes hospitalizados (81.2%)

*Mediana
 FQ, fluoroquinolonas, UTI, Unidad de terapia intensiva

***Clostridium difficile* en México**

El primer artículo se publicó en 1984³⁶, en donde Torres y colaboradores, determinaron la incidencia de *C. difficile* y su actividad citotóxica en 122 muestras de heces de niños < 1 año en el Hospital de Pediatría del IMSS en la ciudad de México. La distribución fue la siguiente: 52 muestras de heces fueron de niños que habían recibido antibióticos (AB) y tenían diarrea; 26 muestras de niños con exposición a AB sin diarrea; 22 niños con diarrea y sin exposición a AB y 22 muestras control de niños sanos. La incidencia de *C. difficile* y la prueba de citotoxicidad fue similar en los niños que usaron AB y el grupo control (23 vs 27.2% respectivamente y prueba de citotoxicidad: 7.6 y 4.5), el único grupo diferente fueron los niños con diarrea sin AB, con una incidencia de 4.5% y citotoxicidad en el 0%. De los 52 casos de niños con exposición a AB y diarrea: 26 se presentaron con diarrea aguda, 25 con diarrea después de 15 días y 1 caso con colitis pseudomembranosa, sin encontrar diferencia en la incidencia de *C. difficile* y la prueba de citotoxicidad en estos grupos. Los autores concluyeron que *C. difficile* no parece una causa importante de diarrea en niños mexicanos.

En 1987 Camorlinga y colaboradores estudiaron el papel de *C. difficile* y su citotoxicidad en infantes (< 1 año) y niños (1-15 años) con diarrea, así como la influencia de los AB en la colonización por *C. difficile*, encontrando que: el uso de AB disminuyó la colonización por *C. difficile* en infantes: 7.1 vs 32%, sin embargo no se afectó la presencia de citotoxicidad: 5.1 vs 4%, explicando esto último por la elevada proporción de cepas no toxigénicas: 48% en este grupo y 63% en total. En contraste, en los niños (1-15 años) los AB favorecieron la colonización: 10.5 vs 4.3%, así como la prueba de citotoxicidad: 5.7% vs 2.8%, comportamiento que es más parecido a lo ocurrido en los adultos. Los autores comentan entonces que la influencia de los AB, en la colonización parece ser edad dependiente³⁷.

Por otro lado, la presencia de *C. difficile* fue independiente de la presencia o ausencia de diarrea en ambos grupos, aunque en el caso de las pruebas citotóxicas positivas en el grupo de los niños, hubo un predominio en los pacientes con diarrea: 7.7 vs 4.4%, no así en los infantes.

Por último, se identificaron un total de 62 cepas, en 2 periodos de tiempo: 1981-1982 (del estudio anterior) y 1984-1985; y las dividieron en grupos de acuerdo a la susceptibilidad a bacteriófagos y bacteriocinas, de manera que obtuvieron 10 grupos designados con las letras del abecedario de la A-J y observaron que durante los 4 años, predominaron 2 grupos: A y B, la mayoría no toxigénicas; lo que explica su persistencia en el

medio. También encontraron grupos de cepas, específicos para cada periodo de tiempo que pudiera tener que ver con el tipo de AB usados en el transcurso de 4 años: D, E, F, I, J solo se encontraron en 1984-1985 y C, H: 1981-1982³⁷.

En 1997, se reportaron 4 casos de colitis pseudomembranosa por el servicio de Gastroenterología del Hospital Español, en la Ciudad de México. El 75% de los casos (3 casos) tuvieron más de 80 años y comorbilidades; todos habían recibido AB y clínicamente se presentaron con diarrea acuosa, con moco, dolor abdominal y fiebre. Por laboratorio se les detectó leucocitosis con necrofilia y bandemia. Un paciente desarrollo anasarca e hipoalbuminea, sugestivo de enteropatía perdedora de proteínas como complicación por *Clostridium*; a todos se les realizó endoscopia reportándose colitis pseudomembranosa. La respuesta a metronidazol o vancomicina por vía oral fue exitosa inicialmente sin embargo 2/4 tuvieron recaída, respondiendo más tarde a metronidazol VO y uno de ellos tuvo 2 recaídas, respondiendo nuevamente con metro y *Saccharomyces boulardii*³⁸.

Durante el 2008, el Dr. García Bueno y colegas realizaron una revisión de la literatura sobre EACD y reportaron un aumento en la número de casos con EACD, así como en la gravedad de la misma en el Hospital Pediátrico de Sinaloa en el servicio de Gastroenterología, que bien pudiera ser por esta nueva cepa NAP1 por lo que actualmente se encuentra realizando tipificación y análisis molecular de las cepas³⁹.

En el Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, el año pasado, el Dr. Camacho Ortiz y cols, del servicio de Infectología, estimaron la prevalencia de EACD⁴⁰, de manera retrospectiva durante el periodo comprendido del 2003 al 2007, así como los factores de riesgo asociados a *C. difficile*, mediante un estudio de casos y controles. Calcularon una tasa de positividad del 5.43 % (170/3171), con una tasa anual de infección de 5.04 casos por cada 1000 egresos, cifra dentro de lo reportado por la literatura.

Como se muestra en la figura 2, hubo un aumento en la tasa durante el 2004 y 2005:

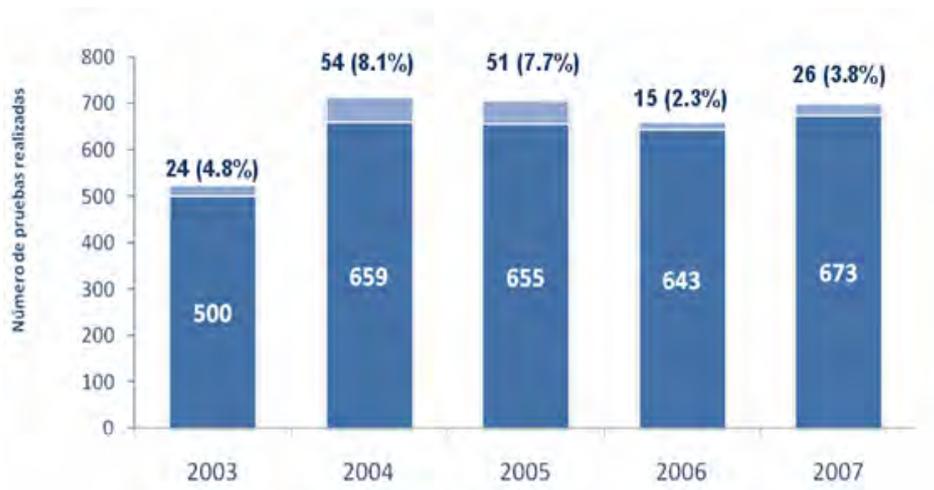


Figura 2. Distribución anual de las 3,130 pruebas realizadas para la detección de toxina A de *C.difficile* de 2003 a 2007.

Sin embargo, a pesar de este aumento, en general los pacientes del Insitituto cursaron con una evolución favorable, reportándose solo un caso con colectomía terapéutica y ninguno murió.

En el análisis univariado, se encontró que, la presencia de HIV/SIDA, los días de estancia hospitalaria, los días de empleo de AB antes del diagnóstico, el número de AB previo al diagnóstico, la estancia > 7 días en el hospital, haber estado hospitalizados en las últimas 12 semanas, estancia en la UTI, > de 5 días en la terapia intensiva, albúmina menor a 3, quimioterapia en las últimas 6 semanas y bloqueadores H2 fueron factores de riesgo para adquirir EACD con $P < 0.05$ como se muestra en el cuadro 5⁴⁰:

Cuadro 5. Análisis univariado de las características generales y de los factores de riesgo para el desarrollo de enfermedad asociada a *Clostridium difficile*

Característica	Casos n = 113 (%)	Controles n = 226 (%)	RM	IC 95%	p
Género femenino	70 (61.9)	114 (56.1)	0.87	0.49 – 1.25	0.317
Edad (Intervalo)	53 (17-88)	51 (17-92)			0.710
Mayor a 64 años	33 (29.2)	60 (26.5)	1.14	0.69 - 1.88	0.606
Dx. principal no quirúrgico	77 (68.1)	160 (70.7)	0.882	0.54 – 1.43	0.252
VIH/SIDA	6 (5.3)	1 (0.4)	12.61	1.50 – 106.11	0.003
Días de estancia hospitalaria	25.5 (2-201)	9 (1-90)	-----	-----	<0.001
Días de empleo de antibióticos antes del diagnóstico	15 (0-115)	2 (0-82)	-----	-----	<0.001
No antib. previo al diagnóstico	3 (0-11)	1 (0-8)	-----	-----	<0.001
Número de evacuaciones diarias	3 (0-12)	1 (0-4)	-----	-----	<0.001
Más de 7 días de EIH	105 (92.9)	143 (63.3)	7.61	3.53 – 16.42	<0.001
Hosp. en las últimas 12 semanas	47 (41.6)	36 (15.9)	3.75	2.24 – 6.30	<0.001
Estancia en UTI (%)	40 (35.4)	28 (12.4)	3.87	2.23 – 6.73	<0.001
Más de 5 días en UTI	30 (26.5)	12 (5.3)	6.44	3.15 – 13.18	<0.001
Más de 5 días de AB's	84 (74.3)	71 (31.4)	6.32	3.80 – 10.49	<0.001
Albumina menor a 3.0 g/dL*	41 (53.9)	31 (18.7)	5.10	2.80 – 9.26	<0.001
QT en las últimas 6 semanas	7 (6.1)	12 (5.3)	1.17	0.45 – 3.07	0.112
Bloqueadores H ₂	68 (60.2)	106 (49.6)	1.71	1.08 – 2.70	0.021
Bloq. de bomba de protones	68 (60.2)	127 (56.2)	1.17	0.74 – 1.86	0.484
Uso de inmunosupresores	29 (25.6)	62 (27.4)	1.00	0.50 – 2.02	0.546

En el análisis multivariado, el uso de bloqueadores H₂, edad menor a 65 años, hospitalización durante las 12 semanas previas, uso previo de cefalosporinas, uso previo de fluoroquinolonas, estancia en UTI, días de empleo de antibióticos antes del diagnóstico y días de estancia hospitalaria, aumentaron el riesgo de presentar enfermedad por *Clostridium*, con P < 0.05 como se muestra en el cuadro 6:

Cuadro 6. Análisis multivariado de los factores asociados al desarrollo de enfermedad asociada a *Clostridium difficile*

Característica	RM	IC 95%	P
Uso de bloqueadores H2	21.73	7.14 – 66.67	<0.001
Edad menor a 65 años	10.21	2.74 – 38.0	0.001
Hospitalización durante las 12 semanas previas	4.39	1.81 – 40.64	0.001
Uso previo de cefalosporinas	3.41	1.56 – 7.46	0.002
Uso previo de fluoroquinolonas	3.11	1.12 – 8.62	0.029
Estancia en UTI	2.76	1.38 – 5.49	0.004
Días de empleo de antibióticos antes del diagnóstico	1.05	1.01 – 1.09	0.010
Días de estancia hospitalaria	1.10	1.05 – 1.16	<0.001

Cepa NAP1/BI/027

El nombre de esta cepa refleja sus características demostradas por diferentes métodos de tipificación: NAP1 son las siglas de “North American Pulse Field type 1” por electroforesis de campos pulsados; BI por restricción de endonucleasas y 027 por ribotipificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta cepa fue aislada por primera vez en 1984¹¹, sin embargo antes del año 2000, solo se había reportado de manera esporádica, y era sensible quinolonas; después del 2000, su presencia recobra valor, al ser la responsable del aumento en la incidencia y severidad de los casos de EACD en todo el mundo, así como su resistencia a fluoroquinolonas.

La cepa NAP1, tiene ciertas características que le confieren mayor hipervirulencia:

- Produce una toxina adicional, la **toxina binaria**; ésta se parece a la toxina-iota del *Clostridium perfringens*; sin embargo su papel no está del todo claro^{41,42}. Su presencia parece correlacionar con la severidad de la enfermedad según algunos autores (Barbut et al 2005). La presencia de esta toxina, no es específica de NAP1, y su prevalencia en los aislados clínicos, generalmente es baja (1-20%). En el Reino Unido⁴³, se ha reportado en un 6.4% de los aislados, España: 4.5%, América 5.8% y Polonia 8.6% .
- NAP1 produce **mayores cantidades de toxina A y B in vitro** comparado con otras cepas de *Clostridium difficile*⁴⁴; produce 16 veces más toxina A y 23 veces más toxina B. Y a mayor carga toxigénica, mayor severidad de la enfermedad³.

- Lo anterior, parece ser consecuencia de la deleción en la posición 117 (de 1 ó 18 pb) del gen Tcd C, lo que interfiere con la regulación negativa de los genes Tcd A y Tcd B ^{45,46}, contribuyendo al aumento en la producción de toxinas. La deleción en el gen Tcd C no es especifica de esta cepa, ya que puede estar presente en otros ribotipos ³².
- La cepa epidémica pertenece al **toxintipo III**; a diferencia de la mayoría de las cepas de *C. difficile* que corresponden al toxintipo 0. El toxintipo se basa en el análisis del polimorfismo del *Locus* patogénico.
- La susceptibilidad antimicrobiana de esta cepa, también es diferente: NAP1 es resistente a fluoroquinolonas *in vitro*; observación poco frecuente antes del 2001. Es resistente a eritromicina y la sensibilidad a clindamicina es variable, ya que se ha reportado resistencia en cepas con el gen *ermB* en Europa ³².
- Parece tener también una mayor capacidad de esporulación, lo que le confiere mayor capacidad de diseminación y resistencia a un ambiente hostil ³⁹.

A pesar de las características antes mencionadas, esto no explica del todo el aumento en su frecuencia y severidad de la enfermedad, ya que de manera histórica ya se habían aislado estas cepas con toxina binaria y deleción en el gen Tcd C ⁴⁵. Sin embargo algo no descrito de manera previa en la cepa, es la resistencia a fluoroquinolonas, lo que pudo haberle conferido mayor virulencia.

Hay reportes recientes que sugieren que la cepa NAP1, puede no responder al tratamiento con metronidazol a pesar de la ausencia en la resistencia *in Vitro*; sin embargo, en general metronidazol sigue siendo el fármaco de primera línea en la mayoría de los casos.

Mc Donald y cols reportaron un análisis microbiológico extenso de 187 aislados, obtenidos de pacientes con EACD de 8 brotes en EUA entre el 2000 y 2003. La cepa NAP1/BI/027 produjo el 51% de los casos comparado con el 17% de los casos previos ². Todas las cepas NAP1 mostraron la presencia de toxina binaria, la deleción de 18pb en el gen Tcd C y la resistencia a a fluoroquinolonas (FQ).

En general si se detecta la existencia de la cepa 027, se deben monitorizar el número de casos, su severidad y mortalidad. Reafirmar las medidas de control ya establecidas por los sistemas de epidemiología y revisar el uso de antimicrobianos, que sus indicaciones sean adecuadas y determinar se alguno en particular aumenta la prevalencia de EACD.

Factores de riesgo

En el cuadro 7, se resumen los factores de riesgo conocidos para EACD nosocomial y comunitario ¹¹:

Cuadro 7. Factores de riesgo para EACD nosocomial y comunitaria

Factor de Riesgo	EACD nosocomial	EACD comunitario
Disrupción de la microflora colónica normal	-Antibióticos -Cirugía -Quimioterapia	-La mayoría no tiene exposición a antibióticos - Algunas FQ - Condiciones GI crónicas
Exposición a esporas del <i>C. difficile</i>	-Superficies del ambiente hospitalario -Pacientes cercanos infectados -Personal de salud	-Superficies en casa? -Miembros de la familia -Mascotas?
Factores del huésped	-Alteración del sistema inmune -Producción baja o ausencia de Acs antitoxina A/B -Comorbilidades -Edad avanzada	-Niños -Mujeres posparto -Uso de inhibidores de bomba
Factores microbiológicos	Tipo de cepas	

Antibióticos

Los antibióticos juegan un papel importante en la patogénesis de *C. difficile*. Por un lado alteran la flora colónica normal y por otro proveen un nicho para que *Clostridium* se multiplique y elabore toxinas. En una serie de pacientes con enfermedad por *Clostridium*, durante la misma, hubo una ausencia de *Bacteriodes spp* (especie predominante en la flora colónica) y una vez que los síntomas se resolvieron, nuevamente estuvo presente en heces ⁴⁷.

El desarrollo de resistencia antimicrobiana de *C. difficile*, juega un papel importante en la virulencia del mismo.

Cualquier antibiótico puede producir EACD, sin embargo hay antibióticos que se relacionan con mayor frecuencia al mismo, como: la clindamicina, betalactámicos (penicilinas y cefalosporinas), quinolonas y sulfas; y los menos relacionados a enfermedad por *Clostridium* son: metronidazol, vancomicina, bacitracina, nitazoxanida, rifaximina, carbapenémicos, tygeciclina, tetraciclinas, cloranfenicol, rifampicina, aminoglucósidos, linezolid, teicoplanina y daptomicina ²⁸.

Edad avanzada

La edad avanzada parece promover no solo la infección por *Clostridium* si no también su severidad ⁴⁸. Esta asociación se ha notado desde 1980, incluso antes de la emergencia de cepas hipervirulentas ^{49,50}. Las razones parecen ser multifactoriales; por un lado hay una disminución de la respuesta inmunológica vs *C. difficile*, es más frecuente que tengan otras comorbilidades que les confieren mayor riesgo de desarrollar EACD y por último, tienen mayor probabilidad de ser hospitalizados y recibir AB.

Los niños menores de 2 años de edad, por lo general son portadores asintomáticos, sin embargo también pueden desarrollar EACD. Los reportes en Canadá durante 2000 - 2003, mostraron que 200 niños, con una media de 5.4 años tuvieron EACD, de los cuales 23% requirieron hospitalización, y 31% tuvo enfermedad recurrente. En otro brote, en un hospital en la India, el 18% de los casos de EACD, se detectó en niños entre 5-12 años expuestos previamente a AB.

Supresión del ácido gástrico

El papel de los supresores de ácido gástrico como factor de riesgo para *C. difficile* es controvertido; algunos reportes sugieren que los inhibidores de bomba de protones (IBP) contribuyen en el aumento de la frecuencia de EACD ^{51,52}. Por ejemplo, un ensayo de casos y controles: 317 pacientes con EACD adquirida en la comunidad y 3167 controles, encontró que la exposición a IBP en los últimos 90, aumento el riesgo para desarrollar diarrea por *Clostridium* (OR 3.5; 95% IC 2.3-5.2). Sin embargo otros estudios no han demostrado lo anterior. Un estudio retrospectivo, con 5619 individuos con enfermedad asociada a *Clostridium*, mostró que el uso de IBP no aumenta el riesgo. (OR 1 IC 95% 0.79-1.28) ⁵³.

Por otro lado, el uso de IBP, disminuye la acidez de la cámara gástrica, principal mecanismo de defensa para algunas bacterias y esporas, por lo que aumenta el riesgo de infecciones entericas entre las que destacan *Salmonella*, y *Campylobacter* y pudiera promover también la infección por *C. difficile* ⁵⁴.

Mayor exposición a las esporas de *C. difficile*

El medio hospitalario, mayor duración de estancia en el nosocomio, compañeros de cuarto con EACD o colonizados, y portar las esporas en las manos u otros instrumentos por el personal de salud, aumentan el riesgo de exposición a *Clostridium* y por tanto de enfermedad.

Manifestaciones clínicas

La EACD se presenta generalmente como diarrea, aunque también puede haber fiebre, náusea y dolor abdominal. Los síntomas inician por lo general, en las primeras 48 horas después de la infección por *C. difficile*, y la mayoría de los pacientes con *Clostridium* nosocomial, se infectan en las primeras 3 semanas de admisión ¹¹.

El espectro de la enfermedad, es variado, va desde el portador asintomático hasta la enfermedad fulminante con megacolon tóxico ⁵⁵.

De un 20-50% de los pacientes hospitalizados, se colonizan por *Clostridium* comparado con el 2% de los adultos sanos en la comunidad. Aunque estos pacientes son asintomáticos, sirven como reservorios para contaminar el ambiente.

Diarrea + colitis por *Clostridium*

Incluye diarrea de 10-15 veces/día, dolor abdominal tipo cólico, fiebre de bajo grado y leucocitosis. Estos síntomas por lo general ocurren con la administración de antibiótico; pueden iniciar durante el tratamiento ó 5-10 días después de los mismos y aunque infrecuente pero puede presentarse hasta 10 semanas después ³⁰.

A la exploración física puede haber dolor en marco colónico. Las toxinas están presentes en las heces. La colonos copia puede mostrar desde eritema leve en parches y mucosa friable, hasta colitis pseudomembranosa severa.

Una leucocitosis de causa incierta, en un paciente hospitalizado (aun en ausencia de diarrea) puede reflejar infección por *C. difficile*. En un estudio prospectivo de 60 pacientes con leucocitosis de origen desconocido, (leucos > 15000/microL), se observó con más frecuencia, la toxina de *C. difficile* que en los controles: 58 vs 12% respectivamente ⁴⁸.

La presencia de pseudomembranas en la mucosa colónica es altamente sugestivo de EACD

Colitis fulminante

Se manifiesta con dolor abdominal difuso, diarrea, distensión abdominal, fiebre, hipovolemia, acidosis láctica y leucocitosis marcada (40 000leucos ó >) ^{56,57}. La diarrea puede ser menos prominente en pacientes con íleo prolongado, por el secuestro de secreciones en el colon atónico y dilatado.

Otras complicaciones, incluyen megacolon toxico y perforación intestinal ⁵⁸. El megacolon toxico es un diagnóstico que se basa en la dilatación colonica (>7cm en su diámetro mayor) acompañado de toxicidad sistémica.

Recaídas

Se desarrollan en el 10-25% de los casos de *C. difficile* y puede ocurrir en varias ocasiones. La recaída pueden presentarse días o semanas después del primer episodio; la presentación clínica puede ser similar o más severa que la inicial ⁵⁹ y esto va en relación al sistema inmune del huésped. Los pacientes con síntomas recurrentes después del primer episodio también pueden representar un síndrome de intestino irritable post infeccioso

Presentación inusual de *C. difficile*

Otras manifestaciones de *C. difficile* incluyen: enteropatía perdedora de proteínas con ascitis, infección por *C. difficile* en el contexto de enfermedad intestinal inflamatoria (EII) e involucro extracolónico.

a) Enteropatía perdedora de proteínas

Hasta la mitad de los pacientes con infección por *Clostridium*, desarrolla enteropatía perdedora de proteínas, manifestada por ascitis, edema e hipoalbuminemia ^{60,19}. La inflamación de la pared intestinal, produce perdida de albumina hacia el lumen, produciendo una perdida mayor que la síntesis hepática y como resultado niveles de albumina igual o menor a 2g/L; la enteropatía perdedora de proteínas responde con tratamiento medico vs *Clostridium*.

b) *C. difficile* en EII

La infección por *C. difficile* así como otros patógenos entéricos pueden complicar el curso de la EII. Las infecciones entéricas son responsables de hasta el 10% de las recaídas de pacientes con EII ⁶¹. La asociación entre EII y *C. difficile* se debe a diferentes factores, como son: el uso de antibiótico para el tratamiento de otros patógenos, y hospitalizaciones frecuentes. Aunque raro, *C. difficile* puede disparar el inicio de la enfermedad intestinal inflamatoria ⁶¹.

Por lo anterior, el diagnóstico de infección por *C. difficile* en pacientes con EII requiere un alto índice de sospecha, para evitar un manejo inadecuado.

c) Manifestaciones extracolónicas

Es raro, pero se han descrito 3 casos de apendicitis por *C.difficile* ⁶²; el involucro a intestino delgado también es una manifestación poco habitual ^{63,64,65}; pueden tener ileítis y mayor riesgo de presentar un curso fulminante. Por último, se han descrito también celulitis por *C.difficile* y artritis reactiva ^{63,66}.

Diagnóstico diferencial

Aunque *C. difficile* es la causa infecciosa más frecuente de diarrea asociada a AB, se deben diferenciar otras causas infecciosas y no infecciosas. *S.aureus* previamente se implicó como causa importante de colitis pseudomembranosa asociada a AB ^{67,68}. Otros patógenos incluyen: *K. oxytoca*, *C. perfringens*, *Candida spp* y *Salmonella*.

Dentro de las causas no infecciosas, la diarrea asociada a AB también puede ser por mecanismos osmóticos o bien por NPT. Diferenciar estas formas no infecciosas puede ser difícil sobre todo en los pacientes colonizados por *Clostridium*. Una de las características que apuntan hacia un mecanismo osmótico son el cese de síntomas al discontinuar la ingesta oral y la ausencia de leucos en heces, por otro lado, la presencia de fiebre y leucocitosis va a favor de *Clostridium* u otras causas infecciosas. Por último, también se debe considerar colon irritable post infeccioso en pacientes con síntomas recurrentes después del tratamiento de *C. difficile*.

Diagnóstico

El método más usado es la detección de toxina A/B en heces por ELISA. Hay pruebas comercialmente disponibles que detectan toxina A y/o B. Se prefieren las pruebas que detecten ambas toxinas, ya que pueden existir cepas solo productoras de toxina B. Las ventajas de este ensayo es su disponibilidad y rapidez ya que los resultados están en menos de 24 hrs. A pesar de una buena especificidad (99%), la sensibilidad va del 60 – 95% según la marca comercial ²⁷.

Durante el 2008, Tim Plache y cols ⁶⁹, realizaron una revisión de la sensibilidad y especificidad de los diferentes ensayos para toxina disponibles en el mercado, obteniendo lo siguiente (cuadro 8):

Cuadro 8. Métodos empleados para la búsqueda de toxina A/B de *C. difficile*

Método	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
Meridian Premier	95	97
Tech Lab Tox A y B	83	99
Tech Lab Tox A y B Quick check	84	100
Remel Xpect	82	96
Meridian Inmunocard	90	99
Bio Merieux VIDAS	76	96

Por lo tanto, si la incidencia de clostridium es baja (<10%), tanto el VPP y VPN de estos ensayos es también bajo y varía de acuerdo al ensayo que se utilice. Lo que hace que los datos epidemiológicos basados solo en este ensayo, sean poco confiables, por lo que para mejorar el diagnóstico, los autores sugieren utilizar al menos 2 pruebas diagnósticas: una prueba rápida y cultivo o citotoxicidad ^{54,69}.

Para que una prueba de toxina sea positiva, se necesitan al menos de 100-1000 pg de toxina en la prueba ⁶⁷. Con una serie de 3 muestras para toxina, el valor diagnóstico aumenta un 10%, lo que produce altos costos sin aumentar sustancialmente el diagnóstico ⁷⁰.

Ensayo de citotoxicidad. Este ensayo también se conoce como ensayo de cultivo tisular y se considera el *Gold estandar* para el diagnóstico de *C.difficile* ⁷¹. El ensayo consiste en agregar muestra de heces del paciente (diluida con buffer y filtrada) a una monocapa de células cultivadas de fibroblastos; si las toxinas de *Clostridium* están presentes, producen un efecto citopático que se caracteriza por fibroblastos rodeando el tejido tisular. Se requiere solo una pequeña cantidad de toxina por célula, de manera que, puede detectar 10-20pg de toxina A y 1pg de toxina B, haciéndolo un ensayo más sensible (94-100%). Más tarde, se agregan anticuerpos vs toxinas de *C. difficile*, lo que le da una especificidad del 99%.

A pesar de ser el ensayo ideal para el diagnóstico de *Clostridium*, la mayoría de los laboratorios no lo tienen, su costo es alto y lleva al menos 48-72 hrs para realizarlo.

Cultivo. El cultivo anaeróbico, se usa con menos frecuencia para el diagnóstico de *C. difficile*. Aunque es una prueba con una sensibilidad > 90%, se requieren de al menos 2-3 días para su aislamiento y no se pueden distinguir las cepas productoras de las no productoras de toxinas (no patógenas) ⁷². Es una herramienta importante para ensayos epidemiológicos.

En un artículo de revisión, Emilio Bouza y cols recomiendan el cultivo, como prueba complementaria al ensayo de toxina por ELISA, por su elevada sensibilidad, mejorando el diagnóstico en al menos un 15%; además hace posible realizar pruebas de susceptibilidad antimicrobiana y biología molecular ²⁸.

Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR). El PCR en tiempo real (PCR-RT) usa como blanco, la región del gen de la toxina B ⁷³, lo que le confiere una sensibilidad del 92% con una especificidad del 97%. Su complejidad y costos hacen que sea una prueba poco disponible aún.

En el cuadro 9, se resumen las pruebas disponibles para el diagnóstico de *C. difficile* ⁷⁴:

Cuadro 9. Pruebas diagnósticas disponibles para *C. difficile*

Prueba diagnóstica	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
Ensayo de citotoxicidad	92.7 - 100	99 - 100
Cultivo	96.4	99.1
Toxina A + B por ELISA	66 – 96.2	93.5 - 100
Toxina A por ELISA	65.4 – 88.3	65.4 - 100
PCR - RT	87 – 91.5	96 - 100

Endoscopia. La endoscopia puede ser una herramienta útil para el diagnóstico de *C. difficile* en las siguientes situaciones:

- Sospecha clínica elevada de EACD, con ELISA negativo
- Diagnóstico temprano de *C. difficile*; antes de los resultados de laboratorio
- Falla al tratamiento
- Presentación atípica de *C. difficile*

Los hallazgos macroscópicos en la endoscopia varían de acuerdo a la severidad del caso; van desde eritema en la mucosa colónica, úlceras y pseudomembranas (patognomónico de la infección por *Clostridium*), las cuales se observan como placas amarillas o blanco-grisáceas hasta de 2cm sobre la mucosa colo rectal. Algunos pacientes con colitis pseudomembranosa tienen lesiones dispersas con apariencia casi normal de la mucosa, mientras que otros presentan pseudomembranas que confluyen cubriendo la totalidad de la mucosa.

A nivel histopatológico, las pseudomembranas se clasifican en 3 tipos ⁷⁵:

Tipo 1: es la forma más leve y los cambios inflamatorios se confinan al epitelio y la lámina propia; las pseudomembranas típicas están presentes y ocasionalmente hay abscesos de las criptas

Tipo 2: hay más disrupción de las glándulas, con marcada secreción de mucina y una inflamación mas intensa de la lamina basal

Tipo 3: existe una necrosis intensa de toda la mucosa con pseudomembranas confluentes

Imagen. Pueden ser de utilidad las diferentes técnicas radiológicas. La prevalencia de un colon anormal, en una tomografía (TAC) en un paciente con EACD, se acerca al 50%; el engrosamiento de la pared del colon > 4mm es el hallazgo más frecuente; las áreas más comúnmente afectadas con recto y sigmoides ²⁸.

Tratamiento

El tratamiento en general, se resume en el siguiente algoritmo (figura 3)¹¹:

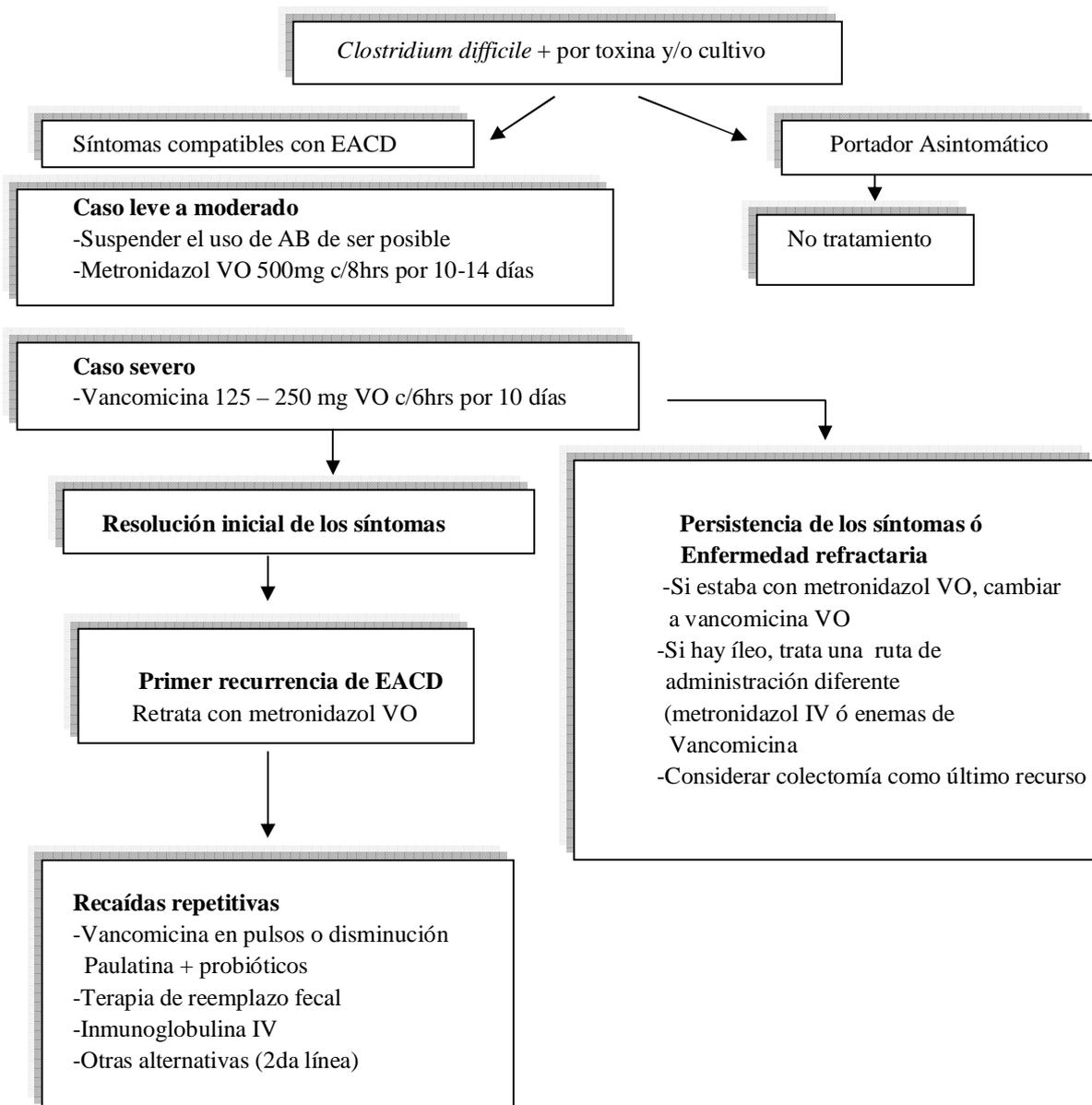


Figura 3. Algoritmo para el tratamiento de EACD

El paso más importante en el tratamiento de la diarrea producida por *Clostridium difficile* es quitar los AB lo antes posible, ya que hasta el 25% de los casos pueden responder con esta simple medida. Si no se pueden retirar, tratar de sustituirlos por antibióticos que con menos frecuencia produzcan EACD.

El manejo también debe incluir medidas de aislamiento de contacto y lavado de manos antes y después del contacto con el paciente. En este sentido se recomienda lavado de manos con agua y jabón, y no con alcohol gel ya que las esporas de *C.difficile* son resistentes al alcohol. Fármacos antidiarreicos como loperamida y opiáceos en general, deben evitarse sin embargo no hay una evidencia clara de que estos, causen daño. La dieta es a tolerancia, a menos que se planee alguna cirugía u otro procedimiento. Se debe iniciar tratamiento empírico si la sospecha clínica es alta. No se da tratamiento en el caso de portadores asintomáticos.

Las guías publicadas en los 90s refieren metronidazol sobre vancomicina como tratamiento de primera línea (2B) para enfermedad no severa y las razones son: menores costos, disminuir la incidencia de *Enterococo* vancomicina resistente y la efectividad clínica comparable en enfermedad no severa ^{76,77,78}. Un estudio prospectivo, aleatorizado y doble ciego, con 81 pacientes con enfermedad leve, se demostró que metronidazol y vancomicina vía oral (VO) producen rangos similares de cura (90 vs 80%) ⁷⁹.

Limitantes en el uso de metronidazol son la neuropatía periférica dosis dependientes, náusea y sabor metálico. La dosis: 500mg c/8hrs ó 250mg c/6hrs VO; si el paciente no tolera la VO, otra opción es metronidazol intravenoso (IV) 500mg c/8hrs y es que se excreta por vía biliar y aumenta el paso a la mucosa intestinal durante la EACD ⁸⁰. La mayoría de las cepas de *C. difficile* (>90%), son sensibles a metronidazol, con un MIC 0.25 a 2 mcg/ml ¹¹⁴. Hay pocos estudios de resistencia, con un MIC > 8 mcg/ml, sin embargo no hay correlación clínica. Los datos de Musher y cols han demostrado que todas las cepas, incluyendo NAP1 y aquellas de pacientes con falla clínica a metronidazol, fueron sensibles a al mismo *in Vitro* ⁸¹.

La duración del tratamiento en EACD no severa es de 10-14 días. Se recomienda, que los pacientes que requieren tratamiento AB prolongado, deben continuar tratamiento para *Clostridium* durante todo el curso con AB, más una semana después de haberlo terminado. No pedir nueva toxina, ya que hasta el 50% de los pacientes continúan con toxina positiva, hasta 6 semanas después del tratamiento ⁸².

La respuesta clínica se observa con el deceso de la fiebre en el primer día y la diarrea hasta el 4-5to día ²⁸.

La farmacocinética de metronidazol VO es diferente en pacientes sanos y pacientes con EACD; en los primeros, metronidazol VO se absorbe completamente en el tracto gastrointestinal (GI) y la concentración fecal por tanto es nula; al contrario, los niveles en heces en pacientes con EACD son mayores con concentraciones que exceden el MIC (9.3mcg/gr) y éste va disminuyendo gradualmente conforme disminuye la diarrea y se restaura la mucosa colónica. Lo anterior puede ser porque durante la diarrea aumenta el tránsito intestinal, disminuyendo el contacto de metronidazol con la mucosa y aumenta la concentración en heces; además disminuye la absorción del fármaco en una mucosa dañada ⁸¹.

Por estas observaciones, un aumento modesto en el MIC para metronidazol, puede llevar a niveles insuficientes, después de pocos días del tratamiento y producir falla. Aunque se han descrito algunos *C.difficile* resistentes a metronidazol, la frecuencia es baja y no parece estar aumentando a la par con el aumento de falla al tratamiento ^{83,84}.

En la figura 4, se muestra la falla a tratamiento y el porcentaje de enfermedad recurrente antes y después del surgimiento de la cepa NAP1 ¹¹:

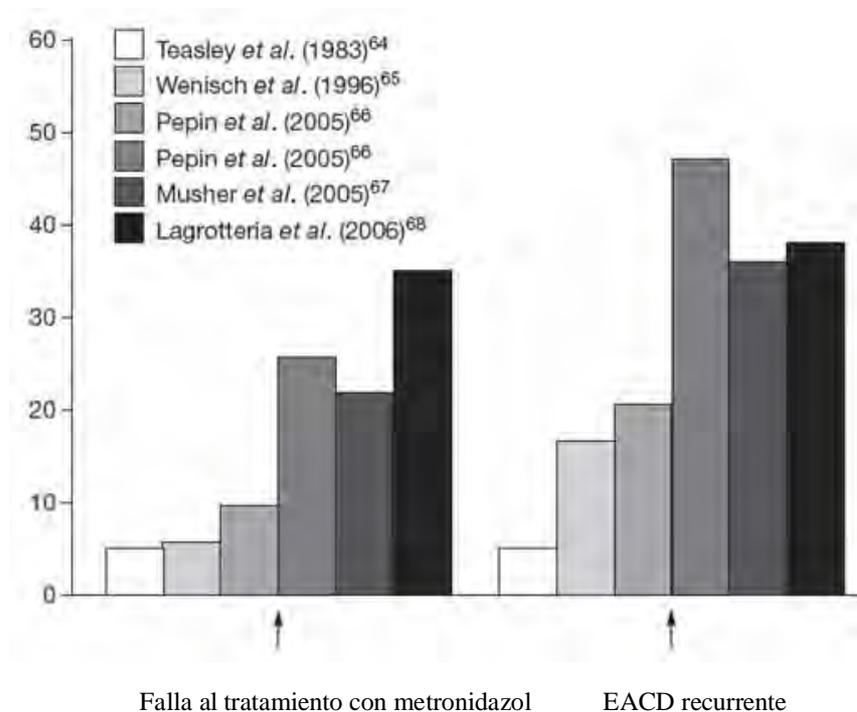


Figura 4. Porcentaje de falla a tratamiento con metronidazol y recaídas por EACD. La flecha muestra el periodo a partir del cual se identificó la cepa NAP1/BI/027

Se muestra por un lado el aumento en el porcentaje de falla al tratamiento, que se ve más pronunciado cuando se documentan brotes por la cepa NAP1, como lo marca la flecha; y por otro lado, parece haber también un aumento en el porcentaje de enfermedad recurrente que se ve disparado en relación a los brotes reportados por esta cepa hipervirulenta.

Las indicaciones de vancomicina oral en EACD no severa son: embarazo, lactancia, intolerancia a metronidazol o la falla a metronidazol ²⁸.

Enfermedad severa

La infección por *C.difficile* puede provocar síntomas severos, sin embargo no hay un consenso que defina enfermedad severa por *C.difficile*. Algunas de las definiciones que se han usado en la literatura son:

- En el brote en Quebec, la presencia de > 20 000 leucos y aumento en la creatinina, fueron marcadores de severidad ⁵³.
- En un ensayo aleatorizado que comparó metronidazol y vancomicina, se usó como puntaje de severidad: la presencia de > 60 años, temperatura > 38.3°C, albúmina < 2.5 ó leucos > 15 000, a las 48 horas del ingreso al estudio y se daban 2 puntos, si por endoscopia había evidencia de pseudomembranas o el paciente se admitía a la UCI ⁷⁹. Los pacientes con 2 ó más puntos, se consideraban con enfermedad grave.
- Por último, en un ensayo fase 3 con tolevamer vs vancomicina y metronidazol, se definió enfermedad severa como: 10 ó > evacuaciones/día, leucos igual o > 20 000 o dolor abdominal severo ⁸⁵.

La enfermedad severa, es más común en el primer episodio de EACD. Las complicaciones dependen del huésped y el hospedero; por ejemplo en el brote en Québec, el 11% se complicaron e incluyó: choque, colectomía, megacolon, perforación y muerte en los próximos 30 días ⁵³.

Actualmente, se recomienda el uso de vancomicina VO como primera línea para enfermedad severa (1B). En este subgrupo de pacientes, el rango de cura es mayor con vancomicina que con metronidazol: 97 vs 76 % respectivamente ⁷⁹.

La mayoría de las cepas de *C.difficile*, son sensibles a vancomicina *in Vitro* con un MIC de 1 mcg/ml (rango de 0.06 a 4 mcg/ml) y los reportes con resistencia intermedia a vancomicina (MIC 4-16 mcg/ml) son sensibles *in vivo*⁸¹. La vancomicina VO no se absorbe, por lo que múltiples estudios han reportado niveles en heces de 1000-3000 mcg/ml y a diferencia de metronidazol, los niveles se mantienen, durante todo el tratamiento.

La dosis de vancomicina oral: 125 – 500mg c/6hrs, siendo efectiva tanto en enfermedad leve, moderada y severa. Los pacientes que no toleran la VO, se benefician de metro IV, por la excreción biliar e intestinal del fármaco⁸⁰; en contraste, vancomicina IV no tiene ningún efecto ya que no se excreta en el colon.

Vancomicina intracolónica, puede ser efectiva como tratamiento adjunto en casos severos, aunque los datos son limitados. Hay un reporte de 9 casos con síntomas refractarios, megacolon tóxico o colitis fulminante, en quienes se administró vancomicina rectal además de los AB estándar; se disolvieron 0.5-1gr de vancomicina en 1 ó 2 litros de salina y se administró en enema, dejándola 60 min y se repitió cada 4-12 hrs; 8 ptes se recuperaron completamente y 1 paciente murió de FOM. Por tanto vancomicina por enema, puede ser efectivo como terapia adjunta en pacientes seleccionados sobre todo cuando hay íleo (2C).

Recurrencia ó recaída. Se define como la perdida de síntomas por *Clostridium* después de un tratamiento apropiado, seguido de la reaparición de EACD. Una recaída debe distinguirse de una EACD persistente, es decir síntomas que no resolvieron durante el tratamiento inicial, ya que el abordaje y tratamiento es distinto.

La recaída, también debe distinguirse de la re infección con la misma cepa o una distinta de *C.difficile*^{86,87}. Estudios moleculares han mostrado que la mitad de las recurrencias son re infecciones con la cepa original^{88,89}.

Las recaídas ocurren hasta en el 25% de los casos independientemente del fármaco y la severidad de la enfermedad. La mayoría de las recaídas ocurren en las primeras 2 semanas después de suspender tratamiento, aunque se ha reportado hasta 3 meses después. Los factores de riesgo asociados a recaídas son: uso prolongado de AB, hospitalización prolongada, > 65 años, albúmina baja, diverticulosis y otras co morbilidades^{90,91}. Además, los pacientes con al menos una recurrencia, tienen un 50-65% de posibilidad de presentar otros episodios.

El mecanismo de recaída, después de una infección inicial no está del todo claro; puede ser por la persistencia de esporas de *Clostridium* en los divertículos colónicos⁹². La alteración en la respuesta inmune del huésped, a las toxinas de *C.difficile* también puede contribuir a la recurrencia. Los pacientes con recaídas tienen niveles bajos ó indetectables de anticuerpos anti toxina comparados con los pacientes sin recaídas⁹³.

La resistencia antimicrobiana no parece ser un factor de riesgo para recurrencia, sin embargo, el tratamiento con metronidazol o vancomicina para el episodio inicial, puede alterar el micro ambiente en el colon, lo que potencialmente aumenta la susceptibilidad a recaída.

Generalmente los episodios por recaída son similares o menos severos que el episodio inicial⁹⁴. Siempre deben considerarse otras causas de diarrea, incluyendo agentes infecciosos, EII o colon irritable. Se debe considerar colonoscopia en casos atípicos. La falta de respuesta clínica a metronidazol, no debe interpretarse como evidencia de organismos resistentes a metro.

La primera recaída, debe tratarse con metronidazol VO (2C). Vancomicina debe usarse en casos severos.

Si el paciente vuelve a recaer, entonces se usa vancomicina VO de manera intermitente o disminuyendo las dosis de manera progresiva + probióticos (2C).

El uso de vancomicina intermitente, se basa en la teoría de la persistencia de esporas a pesar del AB. El tratamiento intermitente puede permitir a las esporas, germinar en los días que no se administran AB. Una vez que las esporas se convierten en la forma vegetativa, estos son susceptibles a los AB cuando se readministran. Los AB en esta forma se pueden administrar de manera pulsada o disminuyendo la dosis paulatinamente (125mg c/6 hrs por 1 semana, 125mg c/12 hrs por 1 semana, 125mg c/24 hrs por una semana, 125mg un día sí y el otro no y finalmente 125mg cada 3er día por 2 semanas).

Probióticos

Los estudios con probióticos son inconclusos en relación a su beneficio como tratamiento. Los probióticos son bacterias vivas no patógenas, capaces de colonizar la mucosa colónica. La alteración en la microflora intestinal en el contexto de EACD, ha aumentado el interés en el papel de los probióticos, para restaurar la microflora.

Los probióticos pueden ser efectivos para tratamiento y prevención de la EACD por diferentes mecanismos:

- Alteración de la flora intestinal: el tracto GI esta colonizado por diversos microorganismos. La administración de AB, altera este balance y es un factor clave en la patogénesis de la colonización y enfermedad por *C.difficile*. Los pacientes con EACD recurrente tienen una población bacteriana disminuida, comparado con los controles ⁹⁵. La mayoría de la probióticos colonizan el intestino de manera temporal, produciendo ácidos bactericidas y péptidos que promueven la competencia entre otros microbios, a través de nutrientes y adhesión epitelial. Estos efectos parecen reducir el ambiente propicio para *C. difficile* ^{96,97,98}. Tanto los *Lactobacilos* como *S. boulardii* ⁹⁹, han mostrado suprimir el crecimiento de *C. difficile* en hamsters.
- Actividad antimicrobiana: las bacterias de los probióticos producen ácidos, que bajan el pH a nivel intestinal, inhibiendo toxinas que inhiben el crecimiento bacteriano ¹⁰⁰. *S. boulardii* ha mostrado, que *in vitro* secreta una proteasa que inhibe la unión de la enterotoxina A ¹⁰¹ y el *Lactococcus lactis*, ha mostrado que secreta un péptido cationico, con actividad antimicrobiana contra algunas cepas de *C. difficile in vitro* ¹⁰².
- Protección de la barrera intestinal: el sitio inicial de interacción en el huésped humano, entre las bacterias comensales y patógenas, es el epitelio intestinal. Los probióticos, son capaces de interferir con la unión de las toxinas de *C. difficile* A y B en las células epiteliales del intestino. En modelos animales y a nivel *in vitro*, los probióticos inhiben la adhesión y disminuyen la invasión de organismos patógenos en el intestino. Específicamente, los *Lactobacilos* aumentan la expresión de la mucina intestinal ^{103,104} y disminuyen la tras locación bacteriana. Varios prebióticos, incluyendo *Lactobacillus rhamnosus GG*, *Bifidobacterium breve* y *Streptococcus thermophilus* ¹⁰⁵ han mostrado en modelos animales, que estabilizan la permeabilidad intestinal. Estudios *in Vitro*, han mostrado la habilidad de *S.boulardii* para inhibir la adherencia de *C. difficile*.
- Inmunomoduladores: los probióticos modulan, tanto la respuesta innata como la adaptativa del sistema immune, estimulando los receptores *Toll like* y aumentando la expresión de citocinas en las células dendríticas y monocitos en la sangre periférica ¹⁰⁶. La ingesta de *Lactobacilos* se ha asociado con un aumento en la actividad fagocítica. Además, *Bifidobacterium*, *Saccharomyces* y varias cepas

de *Lactobacillus*, se han asociado con un incremento en la secreción de IgA tanto en sangre como en heces ¹⁰⁷.

Los probióticos varían, en su capacidad para resistir al ácido gástrico y biliar, colonizan el tracto GI e influyen en la secreción de citocinas; por tanto, es difícil generalizar los hallazgos observados con una especie de probiótico o sus combinaciones.

En un meta análisis en 2006, sobre el uso de probióticos para el tratamiento de EACD, se incluyeron 6 ensayos controlados y aleatorizados, que involucro 354 pacientes; *S. boulardii* fue el único prebiótico, que redujo la recurrencia de EACD ¹⁰⁸. En 2008, una revisión en Cochrane, incluyo 4 ensayos; los autores concluyeron que no hay suficiente evidencia para recomendar los probióticos como adyuvantes en el tratamiento de EACD ¹⁰⁹.

El interés en el papel de los probióticos, para el tratamiento de recurrencia, aumentó por un estudio de 124 pacientes con EACD, que fueron aleatorizados para recibir 4 semanas con *S. boulardii* o placebo (además del tratamiento con vancomicina o metronidazol) ¹¹⁰. Los pacientes con historia de EACD tuvieron menor rango de falla con *S. boulardii* que con placebo (19.3 vs 64.7%). Entre los pacientes con su primer episodio de EACD, el rango de falla fue el mismo en ambos grupos. Como resultado de este hallazgo, varios estudios se han enfocado en el uso de probióticos para el tratamiento de EACD recurrente. De 32 pacientes tratados con vancomicina oral con y sin *S. boulardii*, una menor frecuencia de recaídas se observó, entre los que recibieron probióticos (16.7 vs 50%) ¹¹¹.

Aunque los datos acumulados sugieren que *S. boulardii*, podría ser el agente de mayor beneficio, aunque investigaciones más recientes, estudian a los *Lactobacillus*. Los resultados sugieren, que la evidencia disponible no soporta el uso de probióticos para tratar pacientes con EACD, aunque deben considerarse como tratamiento adyuvante en pacientes con recaídas.

Los probióticos juegan a un papel en la prevención de EACD, sobre todo entre los ancianos. En un ensayo con 135 pacientes con tratamiento AB (media 74 años), los pacientes se aleatorizaron para recibir probióticos con *Lactobacillus caseimunitas*, *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* durante y después de la terapia antimicrobiana (1 semana), los cuales desarrollaron menos EACD que los que recibieron placebo (0 vs 17%) ¹¹². Otro ensayo con 150 pacientes > 65 años, observó que los que

recibieron prebióticos, con *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium bifidum*, tuvieron menor incidencia de EACD (2.9 vs 7.25%) y menor incidencia de toxina de *C. difficile* positiva (46 vs 78%)¹¹³.

Esto sugiere, que los probióticos pueden ser útiles en pacientes ancianos con antibiotico terapia para prevenir EACD.

En resumen, se sugiere no usar probióticos para el tratamiento primario de EACD en la mayoría de los pacientes (2C). Sin embargo, pueden considerarse, en pacientes con enfermedad recurrente no severa y pacientes sin comorbilidades significativas.

Por último, se sugiere el uso de probióticos para prevenir EACD en ancianos sin comorbilidades significativas (2C).

Inmunoglobulina IV

El uso de Inmunoglobulina (Ig) se ha descrito en caso de varias recaídas por *Clostridium*. Los anticuerpos monoclonales anti toxina A o toxina B han mostrado resultados prometedores en animales; actualmente hay estudios fase II en humanos, que sugieren, que el uso de Ig anti toxina puede ser útil en algunos pacientes con recaídas o enfermedad severa, como tratamiento adyuvante al tratamiento convencional.

Bacterioterapia fecal

Puede considerar en pacientes con enfermedad severa y recurrente a pesar de los tratamientos convencionales (2C).

Tratamientos alternativos

Existen otras opciones para tratamiento de *C. difficile* en caso de recaídas múltiples o enfermedad refractaria (cuadro 10)¹¹⁴:

Cuadro 10. Bacitracina, teicoplanina y acido fusídico para el tratamiento de EACD refractaría ó en recaída

Fármacos (regimen requerido)	Respuesta (%)	Recaída (%)	Media de días para mejoría o resolución del cuadro
Metronidazol (250 mg qid to 500 mg tid × 10 days)	94–95	5–16	2.4–3.2
Vancomicina (125 mg qid × 7 days to 500 mg qid × 10 days)	86–100	15–33	2.6–4.2
Bacitracina (20,000 to 25,000 U qid × 7–10 días)	76–80	42	2.4–4.1
Teicoplanina (100 to 400 mg bid × 10	96–98	8	2.8–3.4

días)			
Acido fusídico (500 mg tid × 10 días)	93	28	3.8

- Bacitracina: es menos eficaz comparada con metronidazol o vancomicina, con un rango de recaída del 42% y su costo en general es elevado.
- Teicoplanina y acido fusidico: no están disponibles en EUA, sin embargo el rango de éxito (>90%) es similar comparado con metronidazol y vancomicina, sin embargo la experiencia con estos fármacos es limitada.

En un meta análisis de 12 estudios (1157 pacientes), se evaluaron 8 antibióticos para el tratamiento de EACD: vancomicina, metronidazol, acido fusidico, nitazoxanida, teicoplanina, rifaximina y bacitracina ¹¹⁵. Cuando se compararon uno con otro, ningún AB fue superior al otro.

- Resinas fijadoras de aniones: la ventaja de estos fármacos, es que no alteran la flora colónica, lo que permite una reconstitución más rápida de la misma. Las dos resinas fijadoras de aniones son: colestipol y colestiramina. No son efectivas como tratamiento primario para colitis por *C.difficile*, aunque pueden ser benéficas como tratamiento adjunto en caso de recaída ¹¹⁶. En una serie de 11 pacientes con EACD en recaída, la administración de colestipol mas vancomicina, llevó a una resolución sostenida en todos los pacientes ¹¹⁷.
- Tolevamer: es una nueva resina que fija la toxina de *C.difficile*; los estudios preliminares sugieren resultados prometedores, aunque no esta aprobada aun por la FDA, ni esta comercialmente disponibles. Tolevamer ya ha sido administrada en humanos, tanto para el tratamiento del primer episodio, como el tratamiento de enfermedad recurrente. En un ensayo multicéntrico y doble ciego, los pacientes con EACD fueron aleatorizados para recibir: 3 gr de tolevamer al día (97 ptes), 6 gr de tolevamer/día (95 ptes) ó 500mg de vancomicina al día (97 ptes). Tolevamer a dosis de 6gr/día NO fue menos efectivo que vancomicina en relación al tiempo de resolución de la diarrea y se asoció con menores recurrencias ²⁸.

Estas resinas así como fijan toxinas, también fijan fármacos, como la vancomicina, por lo que deben darse 2-3 horas aparte de la vancomicina ¹¹⁸.

- Nitazoxanida: ha sido aprobada para el tratamiento de protozoarios y helmintos, así como *Cryptosporidium* en pacientes con SIDA. Este fármaco bloquea las vías metabólicas de los anaerobios y ha mostrado ser efectivo vs *C.difficile in Vitro* (MIC 90 0.06 con rango de 0.03-0.5mcg/ml) ⁸¹. Dos terceras partes de la dosis, se excretan en heces como tizoxanida que es metabolito activo. En un ensayo prospectivo, doble ciego y controlado se mostró que nitazoxanida VO 500mg c/12 hrs por 10 días es tan efectivo como metronidazol en tratar EACD ¹¹⁹. Otro estudio con 22 pacientes con EACD con falla a metronidazol y vancomicina, evaluó el uso de nitazoxanida, con cura en el 77% (17); la enfermedad recurrió en 6 de 17 y 2 pacientes se trataron nuevamente con nitazoxanida con éxito ⁷⁴. Tiene pocos efectos adversos y no hay hasta ahora resistencia observada *in Vitro* ⁸¹. Actualmente hay un estudio prospectivo y doble ciego que compara nitazoxanida y vancomicina ⁷⁴.
- Rifaximina: se absorbe poco en el tracto GI después de la administración VO. Es efectiva *in Vitro* para gramnegativos y grampositivos incluyendo anaerobios como *C.difficile*; y ha mostrado ser efectiva en la diarrea del viajero. El MIC 90 para *C.difficile* es 0.008mcg/ml (rango < 0.002 – 0.5mcg/ml) ¹²⁰. Aun es limitada la experiencia con éste fármaco para EACD. En un ensayo abierto, 10 pacientes se trataron con rifaximina, y 9 respondieron. En otro estudio, 8 pacientes con múltiples recurrencias por *C.difficile*, se trataron con vancomicina VO con disminución de la dosis seguido por 2 semanas con rifaximina; 6 pacientes se curaron en un primer curso, sin embargo algunos recurrieron, y un total de 7 respondieron con un 2do curso del mismo tratamiento; sin embargo hubo un paciente que no respondió y se aisló un *C.difficile* resistente a rifaximina ¹²¹. Por lo anterior, se sugiere que la 2da recaída la trates con AB intermitente o en dosis en descenso con o sin probióticos y las recaídas subsecuentes con vancomicina seguido de rifaximina (2C)
- OPT-80 (tiacumicin B): es un nuevo AB no absorbible, altamente efectivo vs *C.difficile in Vitro* con un MIC90 0.008 (rango 0.001-0.06), por lo que parece muy prometedor. Actualmente hay un estudio que compra OPT-80 vs vancomicina que esta en progreso ⁸¹.
- Ramoplanina: nuevo péptido que inhibe la síntesis de pared, inhibiendo la síntesis de peptidoglicano; se absorbe poco en tubo digestivo y no puede administrarse IV, por lo que es una buena opción para

EACD. Ramoplanina tiene una excelente actividad *in Vitro* vs *C.difficile*, incluyendo cepas resistentes a metronidazol y con resistencia intermedia a vancomicina²⁸.

- Daptomicina y linezolid: también muestran buena actividad *in Vitro* vs *C.difficile*, por lo que se investigan actualmente en diferentes ensayos²⁸.
- Tigeciclina: en un reporte de casos reciente¹²², 4 pacientes con enfermedad severa refractaria a tratamiento, fueron tratados de manera exitosa con tigeciclina, 3 de ellos en combinación con vancomicina, con una media de 16.7 días; los síntomas mejoraron en el transcurso de una semana y en ninguno hubo recaída a los 3 meses de seguimiento; lo que sugiere que, el uso de tigeciclina puede ser una alternativa para el tratamiento de enfermedad severa refractaria a tratamiento. El MIC de tigeciclina para *C.difficile* es bajo: 0.06-0.25mcg/ml. La concentración en heces de tigeciclina son mayores que metronidazol o hidroximetronidazol

Actividad AB de diferentes fármacos vs *C.difficile*

Un alto porcentaje de cepas de *C.difficile* son resistentes a diferentes AB, como cefalosporinas, clindamicina, macrólidos, aminoglucósidos, tetraciclinas, clotrimazol, ertapenem, imipenem y cloranfenicol. La mayoría de las FQ que se usan hoy día tienen poca actividad vs *C.difficile* aunque algunas de las más nuevas tienen buena cobertura vs anaerobios con MIC menores que las anteriores para este patógeno. Por otro lado este microorganismo muestra susceptibilidad *in Vitro* a ampicilina, meropenem, piperacilina, piperacilina-tazobactam, teicoplanina y vancomicina²⁸.

Pelaez y cols en 2002, revisaron el perfil de susceptibilidad de 415 cepas de *C.difficile* obtenidas durante un periodo de 8 años y encontraron un rango de resistencia a metronidazol (MIC > 16mcg/ml) del 6.3% y una resistencia intermedia a vancomicina del 3.1%. En general la resistencia fue más frecuente en las cepas de pacientes con HIV. Los autores creen que la resistencia a metro puede perder en las cepas que pasan periodos prolongados congeladas²⁸. La interpretación clínica de esta resistencia no está clara ni su papel en la pobre respuesta a metronidazol o recurrencia.

Cirugía

Los rangos reportados de cirugía por EACD, van de 0.39%, en el Hospital Johns Hopkins, durante un periodo de 6 años, a 3.6% en un periodo de 6 meses en un brote en Dublín. La Universidad de Pittsburg reportó el requerimiento de cirugía en el 1.9% de 2334 pacientes con EACD, entre 1989 y 2000.

La mortalidad de los casos que requieren cirugía va del 30-35% aunque algunos reportan hasta un 50% ¹¹⁴.

Las indicaciones quirúrgicas son: toxicidad sistémica y peritonitis, evidencia clínica y radiológica de dilatación colónica progresiva y perforación ²⁸.

La literatura antes de la emergencia de la cepa hipervirulenta NAP1, sugería cirugía en los pacientes con EACD severa, que no respondieran al tratamiento médico en las primeras 48 horas, tuvieran perforación intestinal o FOM ¹²³. Sin embargo EACD por cepas hipervirulentas, progresan a enfermedad severa y muerte en < 48 hrs. Por lo que, basados en la experiencia del brote en Canadá, la colectomía fue benéfica en los pacientes inmunocompetentes, > 65 años, con leucos > 20 000 y/o lactato entre 2.2 y 4.9meq/L ¹²⁴. Además de estos criterios, se recomienda cirugía también en aquellos pacientes con abdomen agudo, ileo severo o megacolon tóxico

Se recomienda que los pacientes sometidos a cirugía, se les realice colectomía total (1C) preservando el recto e ileostomía ¹²⁵.

Prevención

El objetivo de los programas de prevención y control, tiene 2 metas ¹²⁶:

- 1) Evitar que la gente se colonice
- 2) Evitar que los ya colonizados, se enfermen.

Estos programas tienen los siguientes componentes:

- Medidas de contacto: se deben tomar en el momento en que se identifique el diagnóstico y días después del cese de la diarrea, debido a que las esporas pueden durar hasta 6 semanas en los individuos.
- Higiene de manos: debe hacerse con agua y jabón, tanto el paciente como el personal de salud que tenga contacto con él

- Limpiar el ambiente hospitalario: debe realizarse con soluciones que tengan hipoclorito de sodio como lo recomienda CDC y esto porque las esporas pueden sobrevivir en superficies inertes durante meses, lo que perpetua las fuentes de infección nosocomial
- Restricción de antimicrobianos: el limitar el uso de ciertos antibióticos, durante los brotes, como ocurrió en Quebec durante el año 2000, redujo la incidencia de EACD hasta en un 60% (25).
- Higiene en casa: el paciente con EACD una vez que es dado de alta, debe lavarse las manos con agua y jabón cuantas veces sea necesario; la cocina y el baño, deben lavarse con blanqueador y agua (1:10).
- Diagnóstico y tratamiento oportunos: son medidas que han probado ser favorables tanto para el paciente, como para prevenir la expansión del germen o sus esporas ¹¹.

JUSTIFICACIÓN

Hasta el momento, no hay reportes sobre el tipo de cepas de *Clostridium difficile* que afectan a la población mexicana, así como de la existencia de cepas hipérvirulentas en México. Es necesario entonces establecer un sistema para su detección, ya que además de las implicaciones clínicas ya mencionadas, en el momento en que se identifique, deberá monitorizarse y reforzarse los programas de prevención y control que eviten una mayor expansión a nivel local y nacional.

OBJETIVOS

- General
 - Describir las características fenotípicas y moleculares de las cepas de *C. difficile* que circulan en el Instituto
- Específicos
 - Describir:
 - Patrón de sensibilidad antimicrobiana
 - Producción de toxinas A/B
 - Presencia de genes Tcd A y Tcd B
 - Presencia del gen Tcd C y la delección de 18pb
- Secundarios
 - Determinar la tasa de prevalencia de EACD
 - Describir el espectro clínico de EACD en relación con los resultados de la determinación de toxinas, perfil de resistencia antimicrobiana, presencia de los genes Tcd A y Tcd B, gen Tcd C y la delección en el mismo

MATERIAL Y MÉTODOS

- Diseño del estudio: transversal
- El análisis se realizó de las heces enviadas al Laboratorio de Microbiología Clínica del INNSZ para búsqueda de toxina A/B de *C. difficile* durante el periodo: 1 de Junio 2008 al 31 de Mayo 2009
- Paciente con > una muestra en un lapso de 6 semanas:
 - Análisis de la cepa:
 - Igual a cepa previa: se excluía del análisis
 - Diferente a cepa previa: se incluía en el análisis
- De las muestras de heces enviadas al laboratorio de Microbiología del INNSZ, para búsqueda de toxina A/B de *C. difficile*, se realizó la prueba por inmunoensayo enzimático y se sembró la muestra para cultivo de *C. difficile* en agar CCFA y agar carnero. Si la prueba de toxina A/B resultaba positiva o indeterminada, ó el cultivo positivo para *C. difficile*, se extrajo DNA de la muestra y mediante PCR-RT se buscó la presencia del gen Tcd C de *C. difficile* y si era positivo, la delecion de 18bp en el mismo. Por otro lado, a las 48 hrs si creció *C.difficile* del cultivo, se procedió a la extracción de DNA de la cepa para búsqueda de los genes Tcd A y Tcd B, por PCR multiplex. Así mismo se realizaron pruebas se susceptibilidad de la cepa mediante dilusión en agar (figura 5).

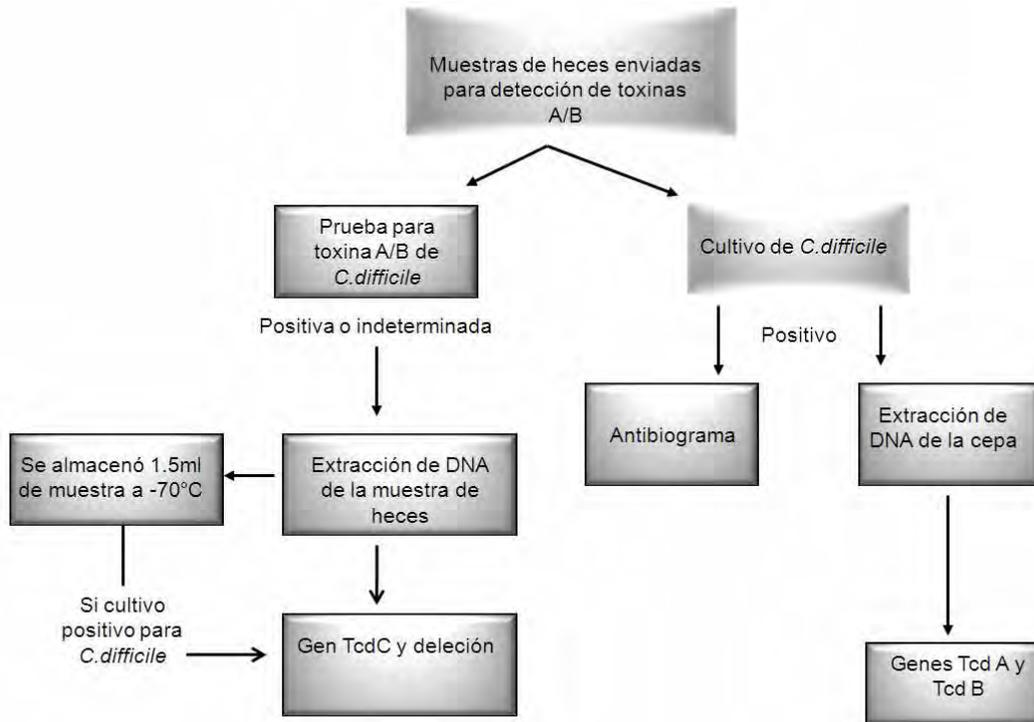


Figura 5. Algoritmo para la identificación de *C. difficile*, su fenotipo y características moleculares

- Se excluyeron las muestras con toxina y cultivo negativos para *C. difficile*
- Los datos anteriores, así como información clínica y demográfica de cada paciente se vació en una base de datos
- Se describió el espectro clínico de la enfermedad asociada a Clostridium en relación a los resultados ya comentados (características moleculares y fenotípicas de *C. difficile*)
- Los pacientes con toxina y/o cultivo positivo, con información demográfica y/o clínica incompleta, se eliminaron del análisis; sin embargo, los datos moleculares y fenotípicos de la cepa se utilizaron para el estudio.

Procedimientos de laboratorio y biología molecular

Prueba para toxina A/B de *C.difficile*

Se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante BioMerieux VIDAS. Se mezcló 1000 µl del diluyente + 200 µl de heces en un tubo eppendorf con capacidad de 2 ml, se centrifugó durante 5 min a 12000

gravidades y del sobrenadante se tomaron 300ml que se colocan en el primer pozo de los cartuchos incluidos en el kit de VIDAS; estos cartuchos se colocaron en el equipo minividas que más tarde arrojó un resultado positivo o negativo de cada muestra.

Cultivo de *C. difficile*

En un tubo de ensaye con 2ml de OH se adicionaron 2ml de heces del mismo paciente quedando una dilución 1:1 que se dejó en reposo durante 1 hr y posteriormente se centrifugó por 10 minutos a 4100 revoluciones; 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 una jarra extractora de CO₂ colocando una tarjeta (anaero gen) generadora de una atmósfera anaeróbica con 5% de CO₂. Después de un periodo de 48 hrs a 35°C, se revisan los agares; si se observaba en uno u otro agar colonias compatibles con *C. difficile* por su olor, morfología, fluorescencia bajo luz UV y gram compatible con éste anaerobio, se procedió a la identificación bioquímica definitiva por tarjeta VITEK.

Almacenamiento de heces

De la muestra enviada al laboratorio del Microbiología, se tomo 1.5ml de heces y se almacenó a -70°C

Extracción de DNA de heces

Se realizó la extracción del DNA de heces a partir de la muestra mediante el kit QIAamp.

Detección de genes Tcd A y Tcd B

De las cepas de *C.difficile* se realizó la **extracción de DNA** mediante el kit QIAamp, de manera que se toman las cepas del agar y junto con 200ml de buffer TE se colocan en tubo eppendorf de 2ml y se purifica el DNA en 5 pasos: 1) Lisado: a la mezcla anterior, agregas proteinasa K 20ml + 200ml de buffer AL y mezclas con vortex por 15 segundos y se incuba durante 10min a 56°C. Agregas 200ml de etanol (96%) y mezclas con vortex por 15 segundos. 2) Unión del DNA (carga negativa) a membranas QIAamp (carga positiva): agregas la mezcla del paso anterior al QIA amp Mini spin column, cierras la tapa y centrifugas a 8000 rpm por 1 min; esto último permite la absorción del DNA sobre las membranas QIA amp y el buffer de lisis asegura que otros contaminantes no se adhieran a la membrana. Después de centrifugar la muestra, retiras el sobrenadante. 3) Lavado con Buffer AW1: al QIA amp mini spin column agregas 500 mcl de buffer AW1, cierras el tubo, centrifugas y vacías el sobre nadante 4) Lavado con buffer AW2: agregas 500mcl de buffer AW2 y centrifugas a 14000 rpm por 3 minutos y desechas lo filtrado. 5) Elusión para extracción final de DNA: se

coloca QIAamp mini spin column en tubo eppendorf de 2ml, le agregas 200mcl de agua destilada mQ e incubas a temperatura ambiente por 5 min, centrifugas a 8000 rpm por 1 min y se obtiene DNA purificado.

A partir del DNA purificado, el siguiente paso es buscar los genes Tcd A y Tcd B (productores de toxina A y toxina B respectivamente) por **PCR multiplex** realizando los siguientes cálculos por cada muestra:

25 mcl por muestra: 20mcl de la mezcla que se calcula a continuación y 5mcl de DNA

- Agua mQ: 12.6mcl (restas 20mcl – 7.4 mcl)

- Buffer: 2.5mcl (porque siempre será el 10% del volumen total, que son 25 mcl): provee el pH óptimo para que funcione la taq polimerasa.

- MgCl₂: 2.4 mcl (esto se obtiene a partir de una concentración estandarizada de 3mM (C1), una concentración stock de 25mcl (C2), y V1= 20mcl, usando la siguiente fórmula: $V1C1= V2C2$). El MgCl₂ estimula a la taq polimerasa para que incorpore los desoxinucleotidos.

- Desoxinucleotidos (dNTPs): 1 mcl (concentración estandarizada 250mM (C1), concentración stock: 5000mM (C2) y V1= 20mcl, con la fórmula $V1C1=V2C2$). Se usan para la síntesis de DNA

- Mix Primers (TcdA-R, TcdA-F, TcdB-R, TcdB-F): se necesita 1mcl por muestra que contiene 20 pmol. Son los oligonucleotidos que contienen las secuencias complementarias al DNA blanco, de manera que se obtienen 2 genes: TcdA con 624 pb y TcdB con 412 pb

- Taq polimerasa: se necesitan 0.5mcl por muestra que contiene 2.5 U. Esta enzima dirige la síntesis de DNA durante el proceso de replicación.

Se coloca en un micro contenedor (con capacidad de 200mcl) 5mcl de DNA por cada cepa + 20mcl de la mezcla antes mencionada y se coloca en un termociclador, de manera que cada muestra se somete a 35 ciclos (con un tiempo aproximado de 2.5 horas), cada uno consistente en 3 pasos: 1) desnaturalización a 94°C: se separa la doble hélice de DNA en 2 hebras sencillas, 2) alineación a 52°C: los primers se unen en sitios específicos en cada hebra del DNA y 3) alargamiento a 70°C: la taq polimerasa sintetiza DNA a partir de los primers, obteniéndose por cada ciclo el doble de cadenas de DNA por lo que aumenta de manera exponencial (2,4,8,16, 32...).

Preparación del gel de agarosa y lectura al DNA: en un matraz de 300ml, agregas 2gr de agarosa más 100ml de TBE 0.5X, calientas en microondas durante dos y medio minutos para que se diluya la agarosa, dejas que se enfríe a temperatura ambiente y agregas 15mcl de SYBR safe (pinta el DNA). Vacías la mezcla en una

base más el marcador de pozos (peine) y dejas hasta que solique a temperatura ambiente. Retiras el gel de la base y lo colocas en la cámara de electroforesis; agregas buffer TBE 0.5X hasta cubrir el gel. Al primer pozo agregas con ayuda de una pipeta 3mcl del marcador de peso molecular + 2mcl de mix (previamente mezclados) y en el resto de los pozos viertes 15mcl de cada muestra + 2mcl del mix (este último para que la muestra se vaya al fondo del pozo); por último agregas tu cepa control positivo (ATCC) y control negativo (*Clostridium sordelli*). Conectas los claves de la cámara de electroforesis a la fuente de energía y programas 100voltios durante un lapso de 45 minutos. Al término retiras el gel y lo colocas dentro de la cámara fotográfica Gel Logic 1500 Imaging Sistem y con luz ultravioleta visualizas en la pantalla del computador los resultados de la electroforesis por campos pulsados, observando el marcador de peso molecular, la presencia o ausencia de los genes TcdA y TcdB de acuerdo a su peso molecular (antes mencionado) de cada una de las cepas de *C.difficile* y su presencia en la cepa ATCC control positivo y ausencia en la cepa control negativo.

Detección del gen Tcd C y su delecion

A partir de la extracción de DNA de la muestra de heces, se determina la concentración del mismo mediante espectrofotometría. Se inicia el programa ND-1000 y se escoge la aplicación “ácido nucleico”. Por otro lado, se conecta el espectrofotómetro, se colocan 2 mcl de agua mQ en el mismo, se cierra la tapa, click en la aplicación “ok”y a continuación se limpia el sistema eligiendo la acción “blank”. Se identifica la muestra anotando el número en la aplicación “ID”, se colocan 2 mcl de la muestra y se elige la opción “measure”, apareciendo a un costado de la pantalla la concentración en ng/UL. Se anotan los resultados de cada una de las muestras y a continuación se calcula el volumen de muestra que necesitas para obtener 20 ng/UL de DNA en un volumen total de 50mcl, a través de la siguiente fórmula:

$V_1C_1=V_2C_2$, en donde:

$C_2= 20\text{ng/UL}$

$V_2= 50\text{mcl}$

$C_1= \text{concentración medida por ejemplo } 187.7 \text{ ng/UL}$

$V_1= ?$

Despejo de la fórmula $V1 = V2C2/C1$, dando como resultado en éste ejemplo 5.3mcl de la muestra de DNA puro que necesito para obtener 20ng. El siguiente paso es restar 50 mcl que es el volumen final – 5.3 mcl de la muestra y esto es igual a 44.7mcl de agua mQ.

A continuación, se realiza la detección del gen Tcd C y si esta presente la presencia o la ausencia de la delección de 18pb por PCR-RT, en donde se usa una mezcla de los primers + sonda + fluocromo LCRcd640, con el objeto de que el software detecte la fluorescencia emitida por el gen Tcd C. Por cada muestra se necesita 10.6 mcl que contienen los primers-sonda-fluorocromo y 4.4 mcl de la mezcla (Master Mix) que contiene buffer, MgCl₂, dnTP's, y la taq polimerasa. Lo anterior (15mcl) se vacía a una alícuota junto con 5mcl del DNA de cada muestra (total 20mcl) y se coloca en el termociclador. Se programa el número de muestras que se analizarán que se identifican con su número correspondiente y a continuación en la pantalla, se grafican los resultados por muestra, de manera que conforme aumenta el número de ciclos, aumenta el número de copias del gen y aumenta la captación de fluorescencia y se forma una pendiente si esta el gen TcdC y además se analiza la presencia o ausencia de la delección de 18pb de acuerdo a la ausencia o la presencia de la “joroba” en la gráfica, respectivamente.

Pruebas de sensibilidad antimicrobiana

Se realiza a través del método por dilución en agar, que es el método de referencia para anaerobios, especialmente para *C. difficile*.

Día 1:

Preparación del caldo de tioglicolato enriquecido

En un matraz con capacidad de al menos 300ml, se agregan 200ml de agua mQ, 5.2 gr de tioglicolato en polvo, 200mcl de hemina y 200mcl de vitamina K (0.1%); esta mezcla se calienta en el microondas hasta que se disuelvan los ingredientes completamente, se deja enfriar a temperatura ambiente y se reparten 5 ml en 40 tubos de ensaye que más tarde se esterilizan en el autoclave a 121 °C por aproximadamente 50 minutos.

Día 2:

Preparación de antimicrobianos

Se prueba un total 6 antimicrobianos (metronidazol, vancomicina, clindamicina, meropenem, imipenem y moxifloxacino). Del polvo de cada uno de éstos, se calcula el peso necesario para la concentración estándar (stock), según la siguiente fórmula:

$$\text{Peso} = \frac{\text{Volumen (ml)} \times \text{concentración deseada (mcg/ml)}}{\text{Potencia (mcg/mg)}}$$

El volumen final son 20ml, que se reparten entre el diluyente y el solvente y la concentración final es 10 veces más que el último MIC; por ejemplo, para metronidazol, el peso se calcula con la fórmula anterior, en donde la concentración deseada se inicia a partir del MIC mas alto que en este caso es 32 mcg/ml, y se calcula el doble: 64, calculándose a una concentración al 10x, quedando 640mcg/ml; el valor de la potencia de metronidazol equivale a 1000 mcg/mg, y el volumen son 20ml, de manera que el peso se calcula en 0.0128g que se diluye en 1ml de dimetilsulfóxido + 19ml de agua mQ. Finalmente todos los antibióticos se filtran (para esterilizarlos), se almacenan en alícuotas con capacidad de 1.5ml y se almacenan a -70°C.

En el cuadro 11, se muestran los valores de cada uno de los antibióticos empleados:

Cuadro 11. Antibióticos para prueba de *C. difficile*.

Antibiótico	Potencia (mcg/mg)	Solvente	Diluyente	MIC	Concentración stock (mcg/ml)	Peso (gr)
Metronidazol	1000	D.S	H20 mQ	32	640	0.0128
Clindamicina	799	H20 mQ	H20 mQ	8	160	0.0040
Vancomicina	987	H20 mQ	H20 mQ	32	640	0.0129
Imipenem	998	SAF pH 7.2	SAF pH 7.2	16	320	0.0064
Meropenem	998	H20 mQ	H20 mQ	32	640	0.0128
Moxifloxacino	982	H20 mQ	H20 mQ	32	640	0.0130

H20 mQ: agua destilada mQ

D.S: Dimetilsulfóxido

SAF pH 7.2: Solución amortiguadora de fosfatos

NaOH: Hidróxido de sodio 0.1 ml/L

Una vez que se prepara la concentración estándar de cada antimicrobiano, se elaboran las siguientes concentraciones de cada antibiótico (total 10), como se muestra en el cuadro 12:

Cuadro 12. Diluciones para cada antimicrobiano

Concentración del antibiótico (mcg/ml)	Volumen – Antibiótico (ml)	Diluyente – agua mQ (ml)	Concentración intermedia (mcg/ml)	Concentración final a 1:10 diluciones en agar (g/L)
640	2	2	320	32
640	1	3	160	16
640	1	7	80	8
80	2	2	40	4
80	1	3	20	2
80	1	7	10	1
10	2	2	5	0.5
10	1	3	2.5	0.25
10	1	7	1.25	0.125

Este procedimiento se lleva a cabo utilizando un mechero de bunsen para mantener un ambiente estéril y los antibióticos se mantienen durante el procedimiento a una temperatura de 4°C (para evitar que se inactiven).

Preparación del medio de cultivo

Se utiliza polvo deshidratado de agar brucella, que contiene caseína de digestión pancreática, tejido animal de digestión péptica, dextrosa, extracto de levadura, NaCl, Na₂SO₄ y agar. Se preparan un total de 1500ml del medio, diluyendo por cada 1000ml de agua destilada mQ, 43gr del polvo agar brucella, 1ml de solución de hemina y 1ml de solución de vitamina K1. Se hierve para disolver el agar y se vacían 19ml de caldo en tubos de ensayo, que más tarde se esterilizan en el autoclave a 121°C durante 50 minutos. Una vez estériles, se colocan en baño maría a 50°C para evitar que solidifique el medio.

Una vez listo el medio brucella y los antibióticos a 10 concentraciones, se identifican las cajas de petri (medio en donde será vaciada la mezcla) con cada antibiótico y su concentración respectiva (de cada concentración de antibiótico se elaboran 2 cajas, por ejemplo 2 con metronidazol a 64, 32, 16, 8 ...). A cada tubo de ensaye con 17ml del medio brucella (se consumen 2ml aproximadamente durante el proceso de esterilización), se agregan 2 ml de cada concentración del antibiótico y 1 ml de sangre de carnero lisada, se mezcla el contenido en el tubo y finalmente se vacía (20ml) en la caja de petri correspondiente. Se preparan también medios de brucella sin antibiótico como control, es decir se mezclan cajas 17 ml del caldo brucella más 1ml de sangre carnero, y se vacían en cajas de petri etiquetadas como controles. Posteriormente, se deja que solidifique el medio a temperatura ambiente (30 minutos aprox) y más tarde se almacenan a 4°C.

Preparación de la cepa de *C. difficile* en tioglicolato

Se identifica cada cepa con un número, mismo que se anota en el tubo con el tioglicolato enriquecido; este medio previamente se calienta a 50°C en baño maría para que sea caldo nuevamente y se deja enfriar a temperatura ambiente. Se agrega a cada tubo 250 mcl de NaHCO₃ y 5-10 colonias de la cepa. Se incuban las cepas junto con el control ATCC a 37°C en condiciones de anaerobiosis y se dá lectura en 24 hrs.

Día 3

Se da lectura a los tubos de ensaye con tioglicolato 24 hrs después de la siembra; si hay crecimiento el medio se pone turbio y a continuación se ajusta a una densidad equivalente a 0.5 de McFarland.

Siembra de la cepa en agar brucella + antibiótico

Una vez ajustada la densidad a 0.5 de Mc Farland (color rojo), se toman 500 mcl de cada cepa y se coloca en cada uno de los orificios del replicador, así como la cepa control ATCC. El replicador tiene un total de 37 orificios, de manera que se aplican 35 cepas y 2 controles. A continuación se cubren los orificios con la tapa que toma de 1-2mcl de cada orificio (es decir de cada cepa), equivalente a 10x5 UFC y se depositan en el agar brucella. Por ensayo se prueban 3 antimicrobianos, a 10 concentraciones cada uno y de cada uno un control, es decir hay 60 platos de antibiótico y 6 controles en agar brucella sin antibiótico; de éstos, 4 se siembra en anaerobiosis, para confirmar la viabilidad y crecimiento de la cepa, así como control de contaminación por otros anaerobios y 2 en aerobiosis, para descartar contaminación con gérmenes aerobios.

Por último, se diluye la cepa control ATCC 700057 para asegurar que la concentración del inóculo final de la cepa sea de 1 a 4 por 10x7, lo cual se logra tomando 10 mcl de la suspensión diluida al 0.5 de Mcfarland y se

diluye en 10ml de solución fisiológica 0.9%; esto resultará en una suspensión de 10×5 UFC/ml. De éste tubo, se toman 100mcl y se diluyen en 10 ml de salina al 0.9% nuevamente, lo que resulta en una suspensión de 10×3 UFC/ml. Se toman 100mcl de la mezcla, que se coloca sobre el agar brucella y se siembran de manera radiada (2 veces). Se incuba y al momento de la lectura, la presencia de aproximadamente 150 colonias indicará una densidad de 1.5×10^8 UFC/ml

Se colocan las cajas de petri en jarras extractoras de CO₂ colocando una tarjeta (anaero gen) generadora de una atmosfera anaeróbica con 5% de CO₂ y se incuba a 37°C durante 48 hrs

Día 4

Lectura del patrón de sensibilidad de *C. difficile*

Cuando se inicia la lectura de los platos, se busca posible contaminación con aerobios o anaerobios, de manera que si ésta se detecta, se vuelven a probar las cepas en donde ocurrió.

- Si no hubo contaminación, se examinan los platos con las diferentes diluciones del antibiótico, de manera que se observa cual fue el MIC en donde hubo inhibición en la apariencia del crecimiento, comparado con el crecimiento con los platos de control anaeróbico y se anotan los resultados, determinando una cepa sensible o resistente de acuerdo al cuadro 13:

Cuadro 13. MIC para cada antibiótico

MIC (mcg/ml)			
Antibiótico	Susceptible	Intermedio	Resistente
Clindamicina	Igual ó < 2	4	Igual ó > 8
Metronidazol	Igual ó menor a 8	16	Igual ó > 32
Imipenem	Igual ó < 4	8	Igual ó > 16
Meropenem	Igual ó < 4	8	Igual ó > 16
Moxifloxacino	Igual ó < 2	4	Igual ó > 8
Vancomicina	Igual ó 4	5 - 16	> 16

Por último, se verifica que el MIC de la cepa control ATCC 700057, esté dentro del rango que le corresponda para cada antibiótico, según el cuadro 14:

Cuadro 14. MIC de diferentes antibióticos para la cepa control ATCC 700057

MIC (mcg/ml)	
Antibiótico	<i>C. difficile</i> ATCC 700057
Clindamicina	2 - 8
Metronidazol	0.125 – 0.5
Imipenem	1 - 8
Meropenem	0.5 - 4
Moxifloxacino	1 - 4
Vancomicina	0.5 - 4

Definiciones operacionales

Diarrea: Heces que se amoldan a un contenedor o más de 200ml de materia fecal, de consistencia líquida o semilíquida durante una o más evacuaciones durante 24 hrs.

Megacolon tóxico: se basa en la dilatación colónica (>7cm en su diámetro mayor) acompañado de toxicidad sistémica

Enfermedad Asociada a *Clostridium difficile* (EACD): Se define como la presencia de diarrea o megacolon tóxico + la presencia de una prueba de laboratorio positiva para *C. difficile* ó bien la presencia de pseudomembranas por colonoscopia o cirugía, corroborado por histopatología

EACD recurrente: enfermedad que cumple los criterios de EACD, que fue resuelta con o sin tratamiento y que cumple los mismos dentro de las 8 semanas siguientes a partir del inicio del primer episodio.

EACD nosocomial o asociado a cuidados de salud: cumple criterios para EACD y los síntomas iniciaron después de 48 hrs de haber sido ingresado al hospital y menos de 12 semanas después de haber sido egresado del hospital.

EACD comunitario: cumple criterios de EACD que inician durante las primeras 48 hrs después de haber ingresado al hospital, y el paciente no estuvo hospitalizado durante las 12 semanas previas.

EACD severa: se define como la presencia de 2 ó > puntos en el paciente, que se menciona a continuación: > 20 000 leucos, aumento de la creatinina sérica, > 60 años, temperatura > 38.3°C, albúmina < 2.5, 10 ó más evacuaciones/día, dolor abdominal severo; se dan 2 puntos si por endoscopía había evidencia de pseudomembranas, el paciente se admitía a la UCI ó presentaba alguna de las siguientes complicaciones: choque, colectomía, megacolon tóxico, perforación ó muerte en los próximos 30 días

Análisis estadístico

- Se hará estadística descriptiva utilizando medianas y valores mínimo-máximo o frecuencias absolutas y relativas.
- Para las comparaciones entre grupos, se utilizarán para las variable categóricas chi2 o exacta de Fisher, según sea adecuado para sus distribuciones.
- Los riesgos se expresarán en razones de momios, con IC 95%.
- Se tomará como significativa una $p < 0.05$

Aspectos éticos

- El estudio fue evaluado y aprobado por el Comité Institucional de Investigación Biomédica en Humanos del Instituto (ver anexos).

RESULTADOS

Del 1 de Junio del 2008 al 31 de mayo del 2009, se enviaron un total de 784 muestras para búsqueda de toxina A/B de *Clostridium difficile*, con una tasa de positividad del 7.14% (56/784) solamente recaudando las toxinas positivas, 9.69% (76/784) con los cultivos positivos y 11.86% (93/784) con cultivo y/o toxina positivo.

La tasa anual de infección, por cada 1000 egresos, tomando en cuenta que el número total de egresos en un año fue de 4845:

- Toxina +: 11.55 casos por cada 1000 egresos
- Cultivo +: 15.7 por cada 1000 egresos
- Cultivo y/o toxina +: 19.2 casos por cada 1000 egresos

Y la tasa anual de EACD por cada 1000 egresos, es de la siguiente manera:

- Toxina +: 10.9 casos por cada 1000 egresos (53)
- Cultivo +: 12.3 casos por cada 1000 egresos (60)
- Cultivo y/o toxina +: 15.89 casos por cada 1000 egresos

Cuadro 15. Total de muestras enviadas para búsqueda de toxina A/B de *C. difficile* y muestras positivas o negativas para toxina y/o cultivo.

Exámenes realizados	Número (%)	Cultivo y/o toxina positiva
	N=784	N=93
Toxina positiva	56 (7.14)	56 (60)
Cultivo positivo para C.difficile	76 (9.69)	76 (81.7)
Tox pos/Cultivo pos	39 (4.97)	39 (41.9)
Tox neg/Cultivo pos	37 (4.71)	37 (39.7)
Tox pos/Cultivo neg	2 (0.25)	2 (2.15)
Tox pos/Cultivo no realizado	15 (1.91)	15 (16.12)
Tox neg/Cultivo neg	-----	-----

De las 76 cepas de *Clostridium difficile*, se obtuvieron las siguientes características (cuadro 16):

Cuadro 16. Características fenotípicas y moleculares de las 76 cepas de *C. difficile*

Característica	N= 76 (%)
No toxigenogénicas	37 (48.7)
Ausencia de genes Tcd A y Tcd B	10/37 (27)
Genes Tcd A y Tcd B	22/37 (59.4)
Gen Tcd A	3/37 (8.1)
Gen Tcd B	2/37 (5.5)
Toxinogénicas	39 (51.3)
Gen Tcd A y Tcd B	35/39 (89.7)
Gen Tcd A	1/39 (2.5)
Gen Tcd B	3/39 (7.8)
Gen Tcd C -	14/76 (18.4)
Gen Tcd C +	62/76 (81.6)
Tipo salvaje	48/62 (77.4)
Mutado (delecion 18pb)	14/62 (22.6)

Las cepas fueron clasificadas como toxigénicas y no toxigénicas por la presencia o ausencia de la toxina A/B por el método BioMerieux VIDAS, que es con el método que contamos; sin embargo, sabemos que la sensibilidad del mismo va del 75 – 85%, por lo que la prueba de citotoxicidad hubiera sido idónea. Esto es importante mencionarlo, puesto que algunas de las toxinas negativas, representan realmente un falso negativo, ya que de las 37 cepas clasificadas como no toxigénicas, hubieron 24 pacientes con EACD, lo que nos habla de que 13 (17%) cepas fueron realmente no toxigénicas; 10 sin genes y 3 con Tcd A y Tcd B positivos y solo una con la delecion Tcd C.

En relación al antibiograma, se utilizaron 6 antibióticos para medir la concentración mínima inhibitoria (MIC) y los rangos de sensibilidad en 55/76 (72.3%) cepas, que se muestra en el cuadro 17:

Cuadro 17. Antibiograma de 6 antibióticos de *C. difficile*

Antibiótico	Rango MIC (mcg/ml)	Sensibles (%) N= 55	Intermedias (%) N= 55	Resistentes (%) N= 55
Meropenem	1 - 4	55/55 (100)	0/55 (0)	0/55 (0)
Imipenem	2 - 16	10/30 (33.34)	19/30 (63.33)	1/30 (3.33)
Metronidazol	0.125 - 4	55/55 (100)	0/55 (0)	0/55 (0)
Vancomicina	1 - 4	55/55 (100)	0/55 (0)	0/55 (0)
Clindamicina	1 - > 64	9/45 (20)	9/45 (20)	27/45 (60)
Moxifloxacino	1 - > 64	42/55 (76.4)	0/55 (0)	13/55 (23.7)

Se obtuvieron un total de 93 pacientes con toxina A/B positiva y/o cultivo con *C. difficile*; de los cuales, 12 fueron excluidos del análisis, dado que no se obtuvo el expediente clínico o bien la información estaba incompleta (cuadro 18):

Cuadro 18. Características demográficas y clínicas de 81 pacientes con toxina A/B positiva y/o cultivo con *C. difficile*

Características	N= 81 (%)
Género femenino	46 (56.7)
Edad en años	52.7 (16 – 91)
> 65 años	24 (29.6)
Diagnóstico de ingreso	
- Infeccioso	35 (43.3)
- Cirugía electiva	10 (12.3)
- Inflamación de tubo digestivo o anexos	7 (8.6)

- Inmunológico	6 (7.5)
- Metabólico	5 (6.3)
- Cardiovascular	4 (4.9)
- Neoplasia	3 (3.7)
- Endócrinológico	1 (1.2)
- Sangrado de tubo digestivo	1 (1.2)
- Neurológico	1 (1.2)
- Otros	1 (1.2)
- Consulta externa	7 (8.6)
Enfermedad subyacente	
- Endócrina	23 (28.4)
- Inmunológica	18 (22.2)
- Cardiovascular	16 (19.7)
- Infeccioso	9 (11.1)
- Renal	7 (8.6)
- Oncológica	7 (8.6)
- Trasplante de órgano sólido	5 (6.2)
- Neumopatía crónica	4 (4.9)
- Hematológico	2 (2.4)
DEIH antes de la prueba (media)	17.09 (0 - 196)
DEIH totales (media)	33.8 (1 – 259)
Recibieron antibióticos en las últimas 12 semanas	74 (91.3)
Recibieron lactobacilos en las últimas 12 semanas	3 (3.7)

Expuestos a inhibidores de bomba de protones en los últimos 3 meses	66/80 (82.5)
Expuestos a inhibidores H2, en los últimos 3 meses	28/80 (35)
Recibieron quimioterapia	4 (4.9)
Radioterapia	1 (1.2)
Estancia en la terapia intensiva	31 (38.2)
Duración en la terapia (días)	14.8 (1 - 123)
Cirugía de tubo digestivo	16 (19.7)

13 casos fueron clasificados con *C. difficile adquirido* en la comunidad, que representó el 16% (13/81) y 68 (84%) asociado a los cuidados de la salud, según la definición de CDC.

16 pacientes fueron catalogados como portadores asintomáticos, cifra que representó el 20%; la mayoría (10 casos) se definió por portar una cepa no toxinogénica, confirmado por la ausencia de genes productores de toxina A y B; 3 casos, por no cumplir con criterios para enfermedad asociada a *Clostridium*, es decir sin diarrea, fiebre, dolor abdominal, leucocitosis, pseudomembranas o megacolon tóxico y por último, tuvimos 3 pacientes con diarrea crónica, toxina negativa y el *Clostridium* se identificó por cultivo, en los 3 casos, la colonoscopia fue compatible con EII: un paciente con Enfermedad de Crohn y 2 con CUCI y ninguno de los 3 recibieron tratamiento para *C.difficile* durante su evolución; a pesar de ello, la respuesta clínica fue favorable con inmunosupresores.

De los 16 pacientes, agrupados como portadores asintomáticos, 1 fue comunitario y el resto nosocomial; y por último un paciente fue portador de una cepa con la delección en el gen Tcd C.

65 pacientes fueron clasificados con EACD, 48 pacientes (73.8%) no cumplieron criterios de severidad y 17 pacientes si (26.2%).

Del primer grupo de pacientes, con enfermedad no severa (48), 27% (13) no recibió tratamiento; de los cuales 10 (77%) se auto limitaron en los 14 días siguientes, 2 pacientes continuaron con síntomas sin embargo su evolución y tratamiento posterior no fueron valorables y en un paciente no se pudo obtener información sobre

su curación, evolución y tratamiento. De los 10 casos cuya enfermedad se autolimitó a pesar de no haber recibido tratamiento, en 3 de ellos se discontinuó el esquema antimicrobiano (30%), lo que pudo haber contribuido al cese de la diarrea; en ninguno de los 10 pacientes se reportan recaídas en los siguientes 30 días.

Continuando con el grupo de pacientes con EACD no severa, 27 (56.2%) recibieron tratamiento, la mayoría (24) con metronidazol VO con una media de 10 días; se curaron 21, con una tasa de éxito del 87.5% (21/24), sin embargo se reportó una tasa de recaída del 14. 2%; 2 de estos pacientes recibieron nuevamente metronidazol con buena respuesta y 1 paciente fue dado de alta con probióticos con respuesta no valorable. De los 24 pacientes que recibieron metronidazol, 3 pacientes tuvieron falla a tratamiento, los 3 fueron dados de alta: 2 con antidiarreicos y 1 con probióticos y su respuesta no fue valorable.

Los otros 3 pacientes con EACD no severa y que recibieron tratamiento, se les administraron probióticos, de los cuales 1 tuvo una respuesta adecuada y 2 su respuesta y evolución no fue valorable. El paciente con respuesta favorable, tuvo recaída a la semana y fue dado de alta con antidiarreicos. Por último, cabe mencionar que de los 48 pacientes con enfermedad no severa, en 8 pacientes no fue posible obtener información sobre su tratamiento y evolución.

En relación a los 17 pacientes clasificados con EACD grave, el 100% recibieron tratamiento, todos con metronidazol, con una duración media de 8.5 días; 3 pacientes inicialmente requirieron metronidazol por vía intravenosa: uno por ventilación mecánica y 2 por intolerancia a la vía oral y una vez que pudo reanudarse la misma, se completó el esquema por ésta vía. La tasa de éxito con metronidazol fue del 94% (16) y de recaída 5.8% (1) que más tarde se autolimitó. Vale la pena mencionar que el paciente catalogado con falla a metronidazol, fue un hombre de 68 años quien ingresó para resección de pseudoquiste pancreático, que se llevó a cabo, una semana previa al diagnóstico de EACD con criterios de gravedad; el paciente inició con diarrea, dolor abdominal y choque séptico por lo que fue trasladado a la terapia intensiva, con requerimiento de aminas; la toxina de *Clostridium* fue negativa, por lo que le suspendieron el metronidazol al segundo día de tratamiento, finalmente se aisló *C. difficile* y el paciente falleció por FOM + choque séptico refractario, sin ningún otro aislamiento por lo que se consideró que la EACD pudo haber sido la causa de su deceso; la cepa no mostró delección del gen Tcd C y solo fue positiva para el gen Tcd A.

Por último, un paciente del grupo de EACD severa, se le hizo el diagnóstico de colitis pseudomembranosa por colonoscopia, con toxina y cultivos positivos.

En el cuadro 19, se comparan algunas características moleculares y de sensibilidad antimicrobiana de las cepas del grupo de pacientes con EACD no severa y EACD severa:

Cuadro 19. Antibiograma y características moleculares de las cepas de pacientes con EACD no severa y severa

Característica	Enfermedad no severa N=48 (%)	Enfermedad severa N=17 (%)	OR (IC 95%)	P
Genes Tcd A y Tcd B	30 (62.5)	12 (70.5)	1.44 (0.38-5.65)	0.76
Gen Tcd A	2 (4.2)	1 (5.8)	1.44 (0-22.59)	0.6
Gen Tcd B	3 (6.25)	0 (0)	0 (0-6.66)	0.39
Delección Tcd C	10 (20.8)	3 (17.6)	0.81 (0.15-3.95)	0.54
Resistencia a moxifloxacino	8 (16.6)	3 (17.6)	1.07 (0.19-5.44)	0.59
Resistencia a clindamicina	14 (29.2)	7 (41.2)	1.7 (0.46-6.21)	0.54

De los 48 pacientes con EACD no severa, solo pudieron analizarse 35 cepas, ya que en el resto no se obtuvo desarrollo. Como se observa en el cuadro, no se encontraron asociaciones entre genes y resistencia antimicrobiana con la severidad del cuadro.

Por último, cuando se comparó la falla a tratamiento y recaída entre ambos grupos, tampoco encontramos diferencia con una P no significativa (cuadro 20):

Cuadro 20. Pacientes con enfermedad no severa y severa

Característica	Enfermedad no severa N=48 (%)	Enfermedad severa N=17 (%)	OR (IC 95%)	P
Falla a tratamiento	5 (10.4)	1 (5.88)	0.54 (0.02-5.48)	0.5
Recaída	4 (8.3)	1 (5.88)	0.69 (0.03 –7.51)	0.60

De las complicaciones descritas por *Clostridium*, tuvimos un paciente que ameritó colectomía, sin embargo el diagnóstico final fue Enfermedad de Crohn con actividad severa por histopatología y desconocemos si a este paciente se le dio tratamiento para *Clostridium* por falta de datos en el expediente.

En cuanto mortalidad, parece que aumentó el porcentaje (7.4 vs 4.4%), comparado con los reportes anteriores, sin embargo solo un caso pudo atribuirse a *C. difficile*, y el resto a otras causas.

DISCUSIÓN

En general, se envió un mayor número de muestras para búsqueda de toxina A/B de *Clostridium*, en relación a los años anteriores (784 vs 626 anuales), lo que traduce, una búsqueda más exhaustiva. Por otro lado, es evidente el incremento en la tasa de positividad (7.14 vs 5.43%) comparado con los años anteriores y si tomamos la tasa por cultivo y/o toxina positivos, la cifra aumenta prácticamente al doble (11.8 vs 5.43%). Lo mismo podemos mencionar, con la tasa anual de infección por cada 1000 egresos en donde hubo un incremento de 5.04 a 11.5 casos por 1000 egresos, tomando las toxinas positivas; con una tasa anual de enfermedad de 10.9 casos por 1000 egresos. Cabe recalcar, que si solo hubiéramos considerado el diagnóstico por toxina, no se hubieran identificado 37 muestras con éste germen, lo que representa el 39.7% de los casos identificados; al contrario de lo que hubiera ocurrido si solo se hubieran tomado los cultivos positivos, ya que se no se hubieran identificado 2 muestras, que representa el 2.15%. En relación a la presentación clínica, 1 de cada 4 pacientes tuvieron criterios de EACD severa y el 17.6% de estas cepas, tuvo la delecion en el gen Tcd C, factor de virulencia agregado; 2 de las cepas con la delecion, fueron también resistentes a moxifloxacino, dos características de la cepa NAP1/BI/027, que si bien son resultados preliminares, nos hace pensar que es posible su existencia en el Instituto.

El incremento en la tasa de infección y enfermedad de *C. difficile*, podría explicarse por el mayor numero de muestras enviadas, el uso de ELISA para toxina A y B, que aumenta la sensibilidad entre un 8 – 15% comparada con ELISA para toxina A, usada en los años anteriores; y por último también pudiera reflejar un incremento real en su incidencia ya que la tasa anual de EACD por cada 1000 egresos fue de 10.9 casos por cada 1000 egresos, siendo que la incidencia general descrita va de 1 – 10 casos por cada 1000 egresos y estamos en el límite alto ²⁸.

Como ya se mencionó, el 40% de las muestras con *C. difficile*, se hubieran perdido si solo se hubiera realizado toxina sin cultivo, lo que enfatiza la importancia de realizar como escrutinio la prueba para toxina y complementarla con otra prueba como el cultivo, cuya sensibilidad es mayor (75 vs 96%).

Por otro lado, en relación a las características fenotípicas y moleculares de las 76 cepas obtenidas, la mayoría fueron toxigénicas y predominaron ambos genes positivos Tcd A y Tcd B, lo que concuerda con lo descrito en la literatura. Fenner y cols en el 2008, en el Laboratorio de Microbiología del Hospital Universitario Basel en

Suiza, caracterizaron desde el punto de vista molecular, 124 cepas de *C. difficile* aisladas en el transcurso de un año, mostrando que el 81.5% fueron positivas para los genes Tcd A y TCd B ¹²⁷. No se ha descrito hasta ahora, una mayor asociación de gravedad con las cepas productoras de ambas toxinas vs toxina A vs toxina B, hallazgo que tampoco encontramos con la RM, cuyas P no fueron significativas.

En relación al gen Tcd C, sabemos que es un gen regulador negativo que se encuentra en el *Locus patogénico* del *Clostridium* y los polimorfismos o deleciones del mismo, pueden producir un incremento en la expresión de los genes productores de toxina lo que se asocia con mayor severidad del cuadro clínico ³. La mayoría de nuestras cepas, no tuvieron deleción (tipo salvaje), sin embargo hasta un 22.6% tuvo la deleción de 18 pb (mutante), cifra muy similar a la reportada en la literatura: 5 – 20% ^{127,128}; y aunque no es específica de la cepa hipervirulenta NAP1, es un factor agregado de virulencia. El 28.6% de las 76 cepas identificadas con deleción del gen Tcd C, se manifestaron como enfermedad severa, sin embargo no encontramos asociación con la presencia de Tcd C mutado y mayor severidad de la enfermedad, que pudiera ser por el reducido número de casos.

En la relación a la sensibilidad antimicrobiana, observamos que el 100% de las cepas, fueron sensibles a meropenem a diferencia de imipenem, lo que guarda relación con el menor riesgo de producir EACD descrita con meropenem y doripenem, no así por otros carbapenémicos ²⁸.

Por otro lado, el 80% de las cepas fueron resistentes o con sensibilidad intermedia a clindamicina, primer fármaco descrito como factor de riesgo para *Clostridium* y cuya resistencia reportada es variable. Fenner y cols reportaron una resistencia del 27.4%, la mayoría ribotipo 027 ¹²⁷; Mutlu y cols (2007) en 116 cepas aisladas en el Reino Unido, reportaron una sensibilidad del 62.9% ¹²⁹; y Sanchez-Somolinos y cols (2008) en 101 cepas aisladas en Madrid, el 65% fueron resistentes a clindamicina ¹³⁰.

La resistencia a quinolonas también varía, con rangos de 20 – 87% ^{127,129,130}. En nuestro caso fue del 23.7%, porcentaje que hubiéramos esperado mayor, tomando en cuenta que es uno de los principales fármacos relacionados a EACD (RR 3.11 IC 95% 1.12 – 8.62), y su uso en general ha ido en incremento.

El 100% de nuestras cepas fueron sensibles a metronidazol y vancomicina, fármacos de primera línea para el tratamiento EACD. Pelaez y cols en 2002, revisaron el perfil de susceptibilidad de 415 cepas de *C.difficile*, obtenidas durante un periodo de 8 años y encontraron un rango de resistencia a metronidazol (MIC >

16mcg/ml) del 6.3% y una resistencia intermedia a vancomicina del 3.1%. Sin embargo hay poca correlación clínica con la resistencia a metronidazol *in vitro* y su comportamiento *in vivo*^{81,114}.

Un 16% de nuestros pacientes fueron clasificados con *Clostridium* comunitario, y aunque desconocemos cual es la incidencia real en nuestro país, en general se ha descrito a un incremento en la EACD comunitario, como lo mostró un estudio en el Reino Unido con un aumento en la incidencia de < 1 a 20 casos por cada 100 000 habitantes entre 1994 y 2004²⁷. A diferencia del *Clostridium* nosocomial, el comunitario puede ocurrir en pacientes de “bajo riesgo”, es decir sin los factores de riesgo habituales, como son individuos sanos o mujeres durante el periodo alrededor del parto⁷²; por lo que debe considerarse EACD aun en ésta población. Algunos de los posibles factores de riesgo descritos son: condiciones gastrointestinales crónicas que pudieran alterar la flora normal, exposición a superficies en casa, miembros de la familia o mascotas que pudieran transmitir las esporas de *Clostridium* y por último, el uso de inhibidores de bomba de protones.

Uno de cada 5 de nuestros pacientes, se definió como portador asintomático: 1 paciente catalogado como comunitario y el resto nosocomial, que coincide con el mayor rango de colonización de los individuos hospitalizados (20-50%) vs los adultos sanos en la comunidad (3%). Los individuos colonizados sirven como reservorio para contaminar el ambiente, por lo que es importante tomar medidas preventivas, como aislamiento de contacto y lavado de manos con agua y jabón. Por otro lado, se sabe que la colonización es un factor de protección para desarrollar EACD vs una nueva exposición. Lo anterior se demostró en un estudio prospectivo, en 810 pacientes hospitalizados: 192 colonizados y 618 no lo estaban; los expuestos por primera vez a *Clostridium*, desarrollaron con más frecuencia enfermedad que los ya colonizados (22 vs 1). Este fenómeno se observó aún cuando portadores y pacientes que desarrollaron la enfermedad, se expusieron a la misma cepa²⁷.

De los pacientes con EACD, en el grupo con enfermedad no severa, se menciona un 30% de 10 pacientes que se curaron a pesar de no haber recibido tratamiento, en los que fue importante señalar, que el esquema antimicrobiano se suspendió y es que el paso más importante en el tratamiento de la diarrea producida por *Clostridium difficile*, es quitar los AB lo antes posible, ya que hasta el 25% de los casos pueden responder con esta simple medida¹¹⁴.

Por otro lado el fármaco más utilizado en este grupo de pacientes (enfermedad no severa) fue el metronidazol con una tasa de éxito del 87.5%, cifras muy similar a la mencionada en la literatura. Las guías publicadas

desde los 90s refieren metronidazol sobre vancomicina como tratamiento de primera línea (2B) para enfermedad no severa y las razones son: menores costos, disminuir la incidencia de *Enterococo* vancomicina resistente y la efectividad clínica comparable en enfermedad no severa ^{53, 79}. Un estudio prospectivo, aleatorizado y doble ciego, con 81 pacientes con enfermedad leve, se demostró que metronidazol y vancomicina vía oral (VO) producen rangos similares de cura (90 vs 80%) ⁷⁹.

En relación a los 17 pacientes clasificados con EACD severa, el 100% recibieron tratamiento con metronidazol, con una tasa de éxito del 94%; sin embargo en este grupo de pacientes, se menciona como tratamiento de elección la vancomicina (1B), cuya tasa de éxito va del 95 – 100%; sin embargo no contamos con vancomicina en suspensión o tabletas en nuestro país.

La tasa de recaída en ambos grupos fue del 5.8 a 8.3%, cifra dentro del rango esperado en la literatura (10 - 25%). Esta recurrencia no se relacionó a una resistencia de metronidazol *in vitro*, como ya se ha descrito. Y aunque el mecanismo de recaída, no es del todo claro, una de las teorías ⁶² es la persistencia de esporas en los divertículos colónicos. Por otro lado la alteración de la respuesta inmune del huésped, también parece contribuir, ya que los pacientes con recaídas, tienen niveles bajos o indetectables de anticuerpos anti toxina cuando se comparan con los que no recurren ⁶⁵. Por último, los estudios moleculares ⁶¹, han demostrado que la mitad de las recurrencias son por re infecciones de la original, tema que será interesante investigar mas adelante mediante electroforesis de campos pulsados y/o PCR.

El tratamiento descrito para la primera recaída, es el metrodinazol VO (2C), fármaco que se usó en solo el 40% de nuestros pacientes con buena respuesta, por lo que habrá que poner más énfasis a este respecto en los médicos a cargo.

Por otro lado el uso de probióticos, en las recurrencias por *Clostridium*, parece ser benéfico, según mostró Mc Farland en 2006, en donde encontró que el uso de los mismos, redujo de manera significativa la recurrencia con un RR 0.59 (IC 95% 0.41-0.85) con una P 0.005. La recomendación actual de probióticos, es en las recaídas posteriores junto con vancomicina VO de manera intermitente o disminuyendo las dosis de manera progresiva (2C).

En cuanto al desenlace de nuestros casos, éste fue de menor gravedad que en otros informes de la literatura médica; ya que el caso de colectomía parece no haberse relacionado a *C.difficile* y solamente se reportó un

caso de muerte probablemente por EACD severa, sin embargo como ya se mencionado, el tratamiento fue inadecuado y lo anterior enfatiza la importancia de complementar la prueba de toxina con otros ensayos con mayor sensibilidad.

CONCLUSION

- Aunque los resultados obtenidos en este estudio son preliminares, las características fenotípicas, moleculares y clínicas, señalan la existencia de cepas hipervirulentas en nuestro país, dictado por el comportamiento clínico y la delección en el gen Tcd C que si bien no es específico de la cepa NAP1/BI/027 responsable de diversos brotes en todo el mundo desde el año 2000, así como del aumento en la incidencia, complicaciones y mortalidad de la EACD; nos hace pensar en una posible existencia de la misma, que tendrá que corroborarse mediante PCR y/o electroforesis en gel de campos pulsados más adelante.
- En general, encontramos un aumento en la tasa de infección y enfermedad por *C.difficile* que si bien hay factores que pudieron haber contribuido, es importante por esta razón y la existencia de cepas hipervirulentas, reforzar las medidas de prevención y control descritas en pacientes con *C. difficile*.

ANEXOS



**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN**
"2008 AÑO DE LA EDUCACIÓN FÍSICA Y EL DEPORTE"

MÉXICO, D.F., A 07 DE FEBRERO DE 2008

DR. JOSÉ SIFUENTES OSORNO
INVESTIGADOR PRINCIPAL
JEFE, LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA
DEPARTAMENTO DE INFECTOLOGÍA
PRESENTE

ESTIMADO DR. SIFUENTES:

Por este medio, me permito informarle que el Comité Institucional de Investigación Biomédica en Humanos, del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, **ha revisado y aprobado** el Protocolo de Investigación, titulado:

"Caracterización Clínica y Microbiológica de los Pacientes con Enfermedad Asociada a Clostridium Difficile Nosocomial del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"
REF. 1812

Así mismo se solicita que al terminar el estudio se deberá de enviar los resultados con resumen de todos los datos sobresalientes y conclusiones, un informe anual (si la duración del estudio es mayor de un año), donde comunique los avances y resultados parciales de su investigación.

Sin más por el momento le reitero la seguridad de mi más atenta y distinguida consideración.

ATENTAMENTE,



DR. ANTONIO R. CABRAL CASTAÑEDA

COORDINADOR

COMITÉ INSTITUCIONAL DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN HUMANOS



Investigación: Rubén Lisker Y. Dirección de Investigación.
C.P. Martha Arredondo Urzúa. Jefe del Depto. C.F.E.I.

Tradicción: **ASISTENCIA**
Asistencia: **DOCENCIA**

- Vasco de Quiroga 15,
- Delegación Tlalpan
- C. P. 14000 México, D. F.
- Tel. 54-87-09-00

BIBLIOGRAFÍA

1. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2005 Dec 2;54(47):1201-5
2. Bartlett Jg, et al NEJM 353;23 2005 pp: 2503-05
3. Brito GA et al J Infect Dis. 2002 May 1;185(9):1297-306
4. Hall IC et al Am J Dis Child 1935; 49:390
5. Just I et al Nature. 1995 Jun 8;375(6531):500-3
6. Riegler M et al J Clin Invest 1995 May;95(5):2004-11
7. Melo Filho AA et al Toxicol. 1997 May;35(5):743-52
8. Warny M et al J Clin Invest 2000 Apr;105(8):1147-56
9. Price SB et al Curr Microbiol 1987; 16:55
10. Pothoulakis C et al J Clin Invest. 1988 Jun;81(6):1741-5
11. McFarland LV Nature Clinical Practice Gastroenterology y Hepatology 2008; 5(1): 40-8
12. Loo, VG et al NEJM 2005 Dec 8; 353(23): 2442-9
13. Moncrief JS et al Clin Microbiol 2000 Aug;38(8):3072-5
14. Barbut F et al J Med Microbiol. 2005 Feb;54(Pt 2):181-5
15. Warny M et al Lancet 2005 Sep 24-30;366(9491):1079-84
16. Rupnik M et al J Clin Microbiol 1998 Aug;36(8):2240-7
17. Kyne L et al N Engl J Med 2000 Feb 10;342(6):390-7
18. Leung DY et al. J Pediatr 1991 Apr;118(4 (Pt 1): p633-7
19. Kim KH et al. J Infect Dis 1981 Jan;143(1):42-50
20. Warny M et al. Infect Immun 1994 Feb;62(2):384-9
21. Kyne L et al Lancet 2001 Jan 20;357(9251):189-93
22. Jiang ZD et al Clin Gastroenterol Hepatol 2007 Aug;5(8):964-8
23. Kelly CP Eur J Gastroenterol Hepatol 1996 Nov;8(11):1048-53
24. Eglow R et al J Clin Invest 1992 Sep;90(3):822-9
25. Larson HE et al J Infect Dis 1982 Dec;146(6):727-33
26. Cohen & Powderly: Infectious Diseases, 2nd ed *Capítulo 50*
27. Blossom DB et al. Clin Infect Dis. 2007 Jul 15;45(2):222-7
28. (clostridium 18) Bouza E et al. Med Clin N Am 2006;90 1141-63
29. Johnson S et al. N Engl J Med 1999 Nov 25;341(22):1645-51
30. Pepin J et al CMAJ 2004 Aug 31;171(5):466-72
31. Thompson, AD et al 9th Congress of the Anaerobe Society of America, Long Beach, California 2008
32. Kuijper, EJ et al Eurosurveillance 2008 13 (7-9) pp: 1-7
33. Limbago BM 9th Congress of the Anaerobe Society of America, Long Beach, California 2008
34. Hall V 9th Congress of the Anaerobe Society of America, Long Beach, California 2008
35. Labbé AC et al Antimicrob Agents Chemother 2008 Sep;52(9):3180-7
36. Torres et al, Journal of Clinical Microbiology 1984 p274-275

37. Camorlinga-Ponce et al, *Eur J Clin Microbiol* 1987 Oct;6(5):542-6
38. Solana de Lope J et al, *Rev Gastroenterol Mex* 1997 Apr-Jun;62(2):113-6
39. García-Bueno et al. *Paediatr México* 2008 1:22-26
40. Camacho-Ortiz A, et al. *Rev Invest Clin* 2009: en prensa
41. McFarland LV et al *Infect Immun* 1991 Jul;59(7):2456-62
42. Spigaglia P et al *J Clin Microbiol* 2002 Sep;40(9):3470-5
43. Mutlu E et al *Journal of Medical Microbiology* 2007;56: 921-9
44. Popoff MR ET AL *Infect Immun* 1988 Sep;56(9):2299-306
45. McDonald LC et al *N Engl J Med* 2005 Dec 8;353(23):2433-41
46. McEllistrem MC et al *Clin Infect Dis*. 2005 Jan 15;40(2):265-72
47. Kamthan AG et al *Arch Intern Med* 1992 Aug;152(8):1715-7
48. Pepin J et al *CMAJ* 2005 Oct 25;173(9):1037-42
49. Geric B et al *J Med Microbiol*. 2004 Sep;53(Pt 9):887-94
50. Carignan A et al *Clin Infect Dis*. 2008 Jun 15;46(12):1838-43
51. Falsen E et al *J Clin Microbiol*. 1980 Sep;12(3):297-300
52. Campbell RR et al *Age Ageing*. 1988 Sep;17(5):333-6
53. Pepin J et al *Clin Infect Dis* 2005 Nov 1;41(9):1254-60
54. Pollok RC *NEJM* 2009; 360;6: 636-8
55. Kelly CP et al *N Engl J Med* 1994 Jan 27;330(4):257-62
56. Wanahita A et al *Am J Med*. 2003 Nov;115(7):543-6
57. Bulusu M et al *Am J Gastroenterol*. 2000 Nov;95(11):3137-41
58. Rubin MS et al *Dis Colon Rectum* 1995 Apr;38(4):350-4
59. Fekety R et al *Clin Infect Dis* 1997 Mar;24(3):324-33
60. Gerding DN et al *Infect Control Hosp Epidemiol* 1995 Aug;16(8):459-77
61. Mylonaki M et al *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004 Aug;16(8):775-8
62. Brown TA et al *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2007 Aug;5(8):969-71
63. Jacobs A et al *Medicine (Baltimore)* 2001 Mar;80(2):88-101
64. Hayetian FD et al *Arch Surg*. 2006 Jan;141(1):97-9
65. Vesoulis Z et al *Dis Colon Rectum* 2000 Apr;43(4):551-4
66. Case 19-1998. *N Engl J Med* 1998; 338:1830
67. Bartlett JG *N Engl J Med* 2002 Jan 31;346(5):334-9
68. Gravet A et al *J Clin Microbiol* 1999 Dec;37(12):4012-9
69. Plance t et al *Lancet Infect Dis* 2008; 8: 777-84
70. Kader HA et al *Gastroenterology* 1998 Dec;115(6):1329-34
71. Bartlett JG *N Engl J Med*. 1978 Mar 9;298(10):531-4
72. Shanholtzer CJ et al *J Clin Microbiol* 1992 Jul;30(7):1837-40
73. Delmee M et al *J Med Microbiol* 2005 Feb;54(Pt 2):187-91
74. Aslam S et al *Gastroenterol Clin N Am* 35 2006; 315-35

75. Price AB et al *J Clin Pathol* 1977 Jan;30(1):1-12
76. Nelson R *Cochrane Database Syst Rev.* 2007 Jul 18;(3):CD004610
77. Miller MA *Clin Infect Dis.* 2007 Sep 1;45 Suppl 2:S122-8
78. *Am J Infect Control* 1995 Apr;23(2):87-94
79. *Am J Health Syst Pharm.* 1998 Jul 1;55(13):1407-11
80. Pepin J *Clin Infect Dis.* 2008 May 15;46(10):1493-8
81. Musher MD et al *Crit Care Clin* 2008;24: 279-91
82. Borody TJ et al *J Clin Gastroenterol* 2004 Jul;38(6):475-83
83. Olsson-Liljequist B et al *Scand J Infect Dis Suppl* 1981;26:42-5
84. Brazier JS et al *J Antimicrob Chemother* 2001; 48:741
85. McFarland LV et al *Am J Gastroenterol* 2002 Jul;97(7):1769-75
86. Bolton RP et al *Gut* 1986 Oct;27(10):1169-72
87. Walters BA et al *Gut* 1983 Mar;24(3):206-12
88. Young G et al *Gastroenterology* 1986; 90:1098
89. Wilcox MH et al *J Hosp Infect* 1998 Feb;38(2):93-100
90. Bartlett JG et al *Gastroenterology* 1980 Mar;78(3):431-4
91. McFarland LV et al *JAMA* 1994 Jun 22-29;271(24):1913-8
92. Tedesco FJ et al *Am J Gastroenterol* 1985 Nov;80(11):867-8.
93. Kyne L N *Engl J Med* 2000 Feb 10;342(6):390-7
94. Fekety R et al *Clin Infect Dis* 1997 Mar;24(3):324-33
95. Chang JY et al *J Infect Dis.* 2008 Feb 1;197(3):435-8
96. Orrhage K et al *J Antimicrob Chemother* 2000 Oct;46(4):603-12
97. Hopkins MJ et al *Appl Environ Microbiol* 2003 Apr;69(4):1920-7
98. Wullt M et al *Dig Dis Sci.* 2007 Sep;52(9):2082-6
99. Naaber P et al *Adv Appl Microbiol.* 2004;54:231-60
100. Gill HS *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2003 Oct;17(5):755-73
101. Castagliuolo I et al *Infect Immun.* 1999 Jan;67(1):302-7
102. Rea MC et al *J Med Microbiol* 2007 Jul;56(Pt 7):940-6
103. Mack DR et al *Am J Physiol* 1999 Apr;276(4 Pt 1):G941-50
104. Madsen K et al *Gastroenterology* 2001 Sep;121(3):580-91
105. Tasteyre A et al *Microb Pathog* 2002 May;32(5):219-25
106. Gill HS et al *Am J Clin Nutr* 2001 Dec;74(6):833-9
107. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1999 Jul-Nov;76(1-4):383-9
108. McFarland LV *Am J Gastroenterol* 2006 Apr;101(4):812-22
109. Pillai A et al *Cochrane Database Syst Rev.* 2008 Jan 23;(1):CD004611
110. McFarland LV et al *JAMA* 1994 Jun 22-29;271(24):1913-8
111. Surawicz CM et al *Clin Infect Dis.* 2000 Oct;31(4):1012-7
112. Hickson M et al *BMJ.* 2007 Jul 14;335(7610):80

113. Plummer S et al *Int Microbiol* 2004 Mar;7(1):59-62
114. Mandell, Bennett & Dolin: *Principles and Practice of Infectious Diseases, 6th ed; 2007; capítulo 92*
115. Nelson R *Cochrane Database Syst Rev.* 2007 Jul 18;(3):CD004610
116. Kreutzer EW et al *Johns Hopkins Med J* 1978 Sep;143(3):67-72
117. Tedesco FJ *Am J Gastroenterol* 1982 Apr;77(4):220-1
118. Taylor NS et al *J Infect Dis* 1980 Jan;141(1):92-7
119. Mucher DM et al *CID* 2006;43: 421-7
120. Hetch DW et al *Antimicrob Agenst Chemotherapy* 2007;51: 2716-9
121. Johnson S et al *CID* 2007;44: 846-8
122. Herpers BL et al *CID* 2009;48: 1732-35
123. Dallal RM et al *Ann Surg.* 2002 Mar;235(3):363-72
124. Lamontagne F et al *Ann Surg.* 2007 Feb;245(2):267-72
125. Miller MA *Clin Infect Dis.* 2007 Sep 1;45 Suppl 2:S122-8
126. *MMWR Recomm Rep* 2002 Oct 25;51(RR-16):1-45, quiz CE1-4
127. Fenner L et al *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008; 27:1201-7
128. Kuijper EJ et al *Clin Microbiol Infect* 2006;12: 2-18
129. Mutlu E et al *J Med Microbiol.* 2007 Jul;56(Pt 7):921-9.
130. Sanchez-Somolinos M et al *Cid* 2008;47: 818-22