

Determinación de la prevalencia de cepas potencialmente patogénicas y conocimiento de la comunidad médica sobre *Clostridium difficile* en centros de atención en salud de la ciudad de Bogotá

Gustavo Jaimes Monroy
Diana Milena Quilaguy Ayure
Giovane Mendieta
Alex Peniche

Resumen

En la primera fase del proyecto, se implementó una novedosa técnica llamada RPA (recombinase polymerase amplification) como un método de diagnóstico para *C. difficile*, la cual resulta ser una técnica de bajo costo, alta sensibilidad y especificidad similar a la observada a la presentada por el PCR en tiempo real, pero sin necesidad de equipos costosos como termocicladores. En una segunda fase, se plantea determinar el conocimiento de personal de salud sobre la infección causada por *C. difficile* en centros de atención y cuidado a la salud. Para esto, se realizará un estudio observacional de corte transversal con enfoque cuantitativo, para determinar el conocimiento del personal interviniente con respecto a la práctica, la prevención de la infección por esta bacteria potencialmente patógena en al menos tres instituciones hospitalarias y/o tres hogares geriátricos.

Palabras clave

Clostridium difficile, personal de salud, conocimientos.

Introducción

Clostridium difficile es una bacteria anaerobia, gram-positiva, que en estado vegetativo puede producir las exotoxinas A y B (genes *tcdA* y *tcdB*). En los últimos 10 años las infecciones por *Clostridium* han aumentado dramáticamente en países desarrollados, específicamente la cepa hipervirulenta 027/BI/NAP-1 (alta producción de toxina B) se ha convertido en un importante problema de salud pública, causando múltiples epidemias en Norte América y Europa (1). *C. difficile* se transmite a través de esporas altamente resistentes al medio ambiente, de manera que pueden persistir en pisos y paredes por meses (2).

Las esporas de *C. difficile* se pueden aislar de prácticamente cualquier sitio, incluyendo suelo y agua, animales de granja y domésticos (productos derivados del animal y de materia fecal) (3-9). En pacientes con alteraciones de la flora intestinal, esta bacteria produce múltiples sintomatologías que van desde un simple cuadro de diarrea hasta manifestaciones clínicas severas (perforación del colon), que pueden poner en peligro la vida de los individuos infectados (10). Los estudios epidemiológicos indican que los factores de riesgo más importantes para infectarse con *C. difficile* incluyen ser de edad avanzada (> 65 años),

utilización de antibióticos (<30 días) y frecuentar instalaciones de atención de salud (11-13). Se ha calculado que el riesgo de adquirir *C. difficile* en la población vulnerable (> 65 años y/o uso de antibióticos) incrementa un 2 % por cada año de edad (14). En Estados Unidos se ha calculado que el riesgo de adquirir *C. difficile* a partir de espacios públicos es del 1,6 %; no obstante, se incrementa a 9,5 % cuando las personas visitan con alguna frecuencia ambientes hospitalarios, llegando hasta un 21 % en pacientes hospitalizados (15).

En Colombia no se dispone de información sobre la contaminación ambiental en centros de atención básica y de cuidado al adulto mayor, que permitan identificar las áreas de mayor riesgo de adquirir *C. difficile*. Los estudios realizados en Colombia sobre *C. difficile* se han limitado a realizar estudios observacionales que reportan la prevalencia en la consulta gastroenterológica en hospitales de Bogotá y Medellín (16, 17). De otro lado, tampoco se ha estimado el impacto económico de la enfermedad sobre el sistema de salud y el paciente, en términos de costo del tratamiento e incremento de la hospitalización. En Estados Unidos, se ha estimado que un costo aproximado de 5.000 dólares (medicamente y gastos de hospitalización)

para curar un episodio de *C. difficile* (1); se considera como la segunda infección nosocomial más común en los hospitales y hogares de ancianos (18), obligando a extender la hospitalización por siete días adicionales (19).

Según lo mencionado anteriormente, se plantea la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuál es la prevalencia de cepas potencialmente patogénicas de *Clostridium difficile* en centros de atención en salud de la ciudad de Bogotá y qué conocimiento tiene la comunidad médica sobre la infección causada por este microorganismo? *C. difficile* es una de las principales causas de infección nosocomial y conlleva un incremento del gasto sanitario en relación con el aumento de la estancia hospitalaria, con todos los aspectos diagnósticos y terapéuticos que esto implica. Los estudios realizados en Estados Unidos y Europa indican que esta enfermedad afecta alrededor de medio millón de personas en el mundo ocasionando gastos por cerca 1 billón de dólares, y causando alrededor de 20.000 muertes al año (20, 21).

Según la información provista en las bases de datos poblacionales de Estados Unidos, la infección de *C. difficile* adquirida de la comunidad actualmente representa el 32 % de todos los casos del país (22). Así mismo, este estudio

indica que la cuarta parte de estas personas que han adquirido *C. difficile* de fuentes ambientales requieren de terapia y hospitalización al cabo de 7 días después del diagnóstico. Estudios realizados por la Universidad de Houston (Texas, USA) indican que un 32 % de las muestras obtenidas de casas (en las que no habitan personas infectadas) son positivas para *C. difficile*. Los zapatos, baños y el polvo sobre los muebles son las fuentes de donde se realizaron más aislados de *C. difficile* (23). Todas las cepas aisladas fueron potencialmente toxigenicas, pues fueron positivas por PCR para los genes que expresan las toxinas A y B.

Como se mencionó anteriormente, las esporas de *C. difficile* pueden permanecer viables por meses en las superficies contaminadas. Múltiples estudios indican que los protocolos de desinfección ambiental que se utilizan en los hospitales y centro de cuidado son subóptimos en la eliminación de las esporas de *C. difficile* (24-26). Si bien se dispone de métodos idóneos de cultivo en Colombia para la identificación de *C. difficile*, es necesario combinar las técnicas microbiológicas clásicas con la biología molecular, con el fin de identificar la presencia de genes toxigenicos.

Recientemente, la Fundación Universitaria del Área Andina ha apoyado

el desarrollo de un nuevo método diagnóstico de bajo costo y complejidad, que permite la detección molecular de los genes toxinogénicos *tcdA* y *tcdB* mediante la amplificación isotérmica del ADN. Una de las ventajas de la amplificación isotérmica es que no requiere de costosos equipos termocicladores, por lo tanto, esta técnica puede utilizarse potencialmente en condiciones de campo o en hospitales con poca infraestructura. Se espera que tanto el aislamiento de la bacteria, como la confirmación molecular de cepas toxinogénicas permitan mejorar la desinfección ambiental al identificar los reservorios, proporcionar un medio que permita evaluar la eficacia de la desinfección y, a su vez, permitiría establecer medidas de control efectivas para evitar la diseminación de este organismo.

Desarrollo teórico

Clostridium difficile es la causa más importante de diarrea infecciosa en los Estados Unidos (1), en las últimas dos décadas ha incrementado exponencialmente su incidencia en los países más desarrollados. En solo los Estados Unidos se incrementó tanto la cantidad de pacientes hospitalizados (85.700 en 1993 a 346.800 en 2010), como la mortalidad (de 10 en 1999 a 48 personas por millón de habitantes por año en 2007) por este

patógeno (20, 21). En Europa, los países que han incrementado significativamente durante la última década son Turquía, Austria y España; solamente el Reino Unido ha logrado reducir en un 50 % la cantidad de casos y de muertes asociadas a este patógeno, explicado por la implementación de un diagnóstico y genotificación oportuno (27).

Enigmáticamente, en América latina no se dispone de un sistema de vigilancia y reporte obligatorio para este patógeno, no obstante, los múltiples esfuerzos de difusión sobre el diagnóstico y atención hospitalaria realizados en la comunidad médica internacional durante los últimos años. Entre los 25 países que conforman la Organización Panamericana de Salud únicamente Brasil, Chile, Argentina, Perú, Costa Rica, México y Jamaica han reportado la infección por *C. difficile* en pacientes con diarrea o anormalidades gástricas (28). *C. difficile* hace parte de un reconocido grupo taxonómico infeccioso junto a otras especies que también originan enfermedades mortales, como: *Clostridium tetani* (tétanos), *Clostridium botulinum* (botulismo), y *Clostridium perfringens* (gangrena gaseosa). Típicamente estas bacterias gram positivas anaerobias habitan en diferentes tejidos del hospedero como estadio vegetativo (forma de barra) que libera toxinas al

tejido, las cuales explican en parte la severidad de la patología observada en el tejido u órgano infectado.

Por otra parte, las esporas tienen forma de maraca y son muy resistentes a la degradación ambiental (incluso a desinfectantes cuaternarios), lo que permite que la bacteria se disperse a través del contacto con objetos contaminados, alimentos preparados de animales infectados (marinos, mamíferos, etc.), del suelo e incluso fuentes hídricas (acueductos) (29-32).

Aunque en 1935 se realizó el primer estudio que demostró la capacidad de *C. difficile* de producir diarrea en humanos, también se ha establecido que puede representar hasta un 9,5 % del total de la flora bacteriana intestinal en adultos sanos de la población general (15). Los estudios realizados por Bartlett et al en 1978 concluyeron que el uso de antibióticos es un factor de riesgo para producir diarrea (33). Estudios retrospectivos han ayudado a explicar el aumento en el número de casos desde la década del 70 por el uso generalizado de los antibióticos como la clindamicina y los denominados de “amplio espectro” como la penicilina y la cefalosporina y, más recientemente, las fluoroquinolonas (34-36).

Es así que paradójicamente son los antibióticos, que inhiben o matan bacterias

patógenas infecciosas, de manera colateral también eliminan bacterias simbióticas y/o benéficas al humano, de manera similar a las pérdidas en batalla por “fuego amigo”. Es entonces cuando la ingesta de esporas de *C. difficile* por individuos expuestos a antibióticos, germinan en células vegetativas que colonizan y se multiplican en el tracto gastrointestinal, penetrando la capa mucosa a través de la secreción de proteasas con el fin de adherirse e invadir los enterocitos (37). De manera que *C. difficile* toma la oportunidad de llenar el vacío dejado por las bacterias “amigas”; típicamente en personas vulnerables que reciben antibióticos por otros agentes infecciosos, cirugías, trasplantes, radio-quimioterapia, muchos de los cuales ya están debilitados y se encuentran mal preparados para soportar el estrés de diarrea y fiebre causado por *C. difficile*.

Los métodos disponibles en Colombia para la identificación de *C. difficile* son limitados, costosos o necesitan de varios días de incubación para emitir resultado diagnóstico. Un resultado positivo oportuno puede salvar la vida de las personas infectadas que presenten la expresión patológica más severa como Colitis pseudomembranosa y Colitis fulminante. De manera similar, el diagnóstico oportuno en personas bajo terapia con

antibióticos, en posoperatorio, quimioterapia y mayores de 65 años, que presentan un alto riesgo de infección por *C. difficile*, permitiría una eliminación temprana del patógeno evitando de esta manera una futura complicación patológica.

La Fundación Universitaria del Área Andina ha apoyado el desarrollo de un nuevo método de diagnóstico de bajo costo y complejidad, mediante la detección de genes de la bacteria utilizando la Amplificación mediante la Proteína Recombinasa (RPA). Una de las ventajas de la amplificación isotérmica es que no requiere de costosos equipos como termocicladores, por lo tanto, esta técnica puede utilizarse potencialmente en condiciones de campo o en hospitales con poca infraestructura. El RPA ha demostrado tener una sensibilidad y especificidad similar a la observada en la PCR, además esta metodología puede adaptarse fácilmente a métodos de detección visual utilizando métodos colorimétricos en tiras de papel diagnósticas (RPA-Lateral Flow). En investigaciones recientes realizadas en la University of Texas medical Branch, se ha demostrado que es posible detectar eficientemente parásitos intestinales como *Cryptosporidium* en muestras fecales utilizando RPA-LF (38-40) y *C. difficile* (41).

Metodología

Se realizará un estudio observacional de corte transversal con enfoque cuantitativo, para determinar tanto la prevalencia de las cepas que tengan potencial patogénico en sitios factibles de su localización, así como del conocimiento del personal médico y de las prácticas con respecto a la prevención de la infección por esta bacteria potencialmente patógena en al menos tres instituciones hospitalarias y/o tres hogares geriátricos.

Población de estudio

La población de estudio serán los médicos, enfermeras y bacteriólogos que atiendan la población a estudio y que trabajen en centros hospitalarios con atención de adultos mayores tratados con terapia antibiótica. De los mismos espacios serán recolectadas muestras para estimar la presencia de cepas patogénicas de *C. difficile* en este tipo de áreas hospitalarias y geriátricas.

Muestra

La selección de la muestra será de tipo no aleatorio consecutivo, calculado entre la población de médicos y enfermeras disponibles en los centros hospitalarios que permitan el análisis. Se utilizarán como criterios de selección un

nivel de confianza de 95 %, con un error relativo de 3 % y una P de 50 %.

Muestreo

Se realizarán muestreos al azar de áreas (30 cm) como pasillos, ascensores, manijas de puertas, piso de los baños; y en las superficies altamente manipuladas como mesas, pasamanos, sillas de los cuartos. Para recolectar las muestras se seguirá el protocolo aplicado en UTMB y publicado por Alam (23).

Instrumentos

Se elaborará un cuestionario en donde se explorarán aspectos relacionados con variables orientadas a determinar el conocimiento de los profesionales frente al manejo del riesgo de este tipo de infección por *Clostridium difficile*, así como sobre su diagnóstico y las acciones clínicas. Como criterios de su validación se tendrá en cuenta para su desarrollo estudios similares, prueba piloto a una población de 30 encuestados y sometimiento a juicio de expertos. Cada formulario será aplicado a los profesionales, previo consentimiento informado.

Análisis de la información

Los datos recolectados serán tabulados previa asignación de puntuación para establecer escalas de conocimiento que serán analizados en software estadístico, bajo la estructura de análisis bivariado para las áreas de conformación del cuestionario. Se aplicará para todos los casos las pruebas necesarias para determinar su validez estadística y su reproducibilidad en consecuencia con la búsqueda de asociaciones entre los conocimientos de los profesionales y las prácticas preventivas frente a *C. difficile*.

Se realizará análisis bivariado: es importante recordar que el análisis bivariado se dará en función de dos variables a determinar bien sea:

- a) Cualitativa – Cuantitativa para establecer diferencia de medias. Mostrando Intervalos de Confianza IC. Y su análisis estadístico se dará mediante la T de student o ANOVA.
- B) Cualitativa – Cualitativa para establecer diferencia de proporciones o razón (Pa/Pb) de proporciones y se expresa también en IC y su análisis estadístico es Chi cuadrada.
- C) Cuantitativa – Cuantitativa se establecerá asociación entre 2 variables. Se presenta IC y su análisis estadístico es T student y Prueba Exacta de Fischer.

Referencias

1. Dubberke ER, Wertheimer AI. Review of current literature on the economic burden of *Clostridium difficile* infection. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 2009; 30:57–66.
2. Sunkesula VC, Kundrapu S, Jury LA, Deshpande A, Sethi AK, Donskey CJ. Potential for transmission of spores by patients awaiting laboratory testing to confirm suspected *Clostridium difficile* in retail chicken. *Lett Appl Microbiol* 2010;50:362e5.
3. Borriello SP, Honour P, Turner T, Barclay F. Household pets as a potential reservoir for *Clostridium difficile* infection. *J Clin Pathol.* 1983;36:84E7.
4. Weese JS, Staempfli HR, Prescott JF, Kruth SA, Greenwood SJ, Weese HE. The roles of *Clostridium difficile* and enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in diarrhea in dogs. *J Vet Intern Med.* 2001;15:374E8.
5. Marks SL, Kather EJ, Kass PH, Melli AC. Genotypic and phenotypic characterization of *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* in diarrheic and healthy dogs. *J Vet Intern Med.* 2002;16:533e40.
6. Zidaric V, Zemljic M, Janezic S, Kocuvan A, Rupnik M. High diversity of *Clostridium difficile* genotypes isolated from a single poultry farm producing replacement laying hens. *Anaerobe.* 2008;14:325E7.
7. Gould LH, Limbago B. *Clostridium difficile* in food and domestic animals: a new foodborne pathogen? *Clin Infect Dis.* 2010;51:577E82.
8. Rupnik M, Songer JG. *Clostridium difficile*: its potential as a source of foodborne disease. *Adv Food Nutr Res.* 2010;60:53e66.
9. Weese JS, Reid-Smith RJ, Avery BP, Rousseau J. Detection and characterization of *Clostridium difficile* infection in adults: 2010 update by the Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA) and the Infectious Diseases Society of America (IDSA). *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 2010;31:431–455.
10. McDonald *et al* 2006 (falta completar la fuente).
11. Baxter *et al* 2009 (falta completar la fuente).
12. Keller *et al.* 2014 (falta completar la fuente).
13. Loo *et al.* 2011 (falta completar la fuente).
14. Rea MC, O’Sullivan O, Shanahan F, O’Toole PW, Stanton C, Ross RP, Hill C. *Clostridium difficile* carriage in elderly subjects and associated changes in the intestinal microbiota. *J Clin Microbiol.* 2012;50(3):867-75.
15. Otero *et al.* 2009 (falta completar la fuente).
16. Becerra *et al.* 2011 (falta completar la fuente).
17. Goldstein E, Polonsky J, Touzani M, Citron DM. (2009). *C. difficile* infection (CDI) in a long-term acute care facility (LTAC). *Anaerobe,* 15, 241–243.
18. Currie B. Real-time PCR testing for CDI improves outcomes and reduces costs. *Medical Laboratory Observer.* 2009;41:18–20.
19. Badger VO, Ledebor NA, Graham MB, Edmiston CE. *Clostridium difficile*: epidemiology, pathogenesis, management, and prevention of a recalcitrant healthcare-associated pathogen. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2012 Nov;36(6):645-62.

21. Hall AJ, Curns AT, McDonald LC, Parashar UD, Lopman BA. The roles of *Clostridium difficile* and norovirus among gastroenteritis-associated deaths in the United States, 1999-2007. *Clin Infect Dis*. 2012 Jul;55(2):216-23.
22. Lessa FC. Community-associated *Clostridium difficile* infection: How real is it? *Anaerobe* 2013;24:121e3.
23. Alam S. Investigation of potentially pathogenic *Clostridium difficile* contamination in household environs. *Anaerobe* 2014;27:31e33
24. Carling PC, Huang SS. 2013. Improving healthcare environmental cleaning and disinfection: current and evolving issues. *Infect. Control Hosp. Epidemiol*. 34:507–513.
25. Donskey CJ. 2013. Does improving surface cleaning and disinfection reduce health care-associated infections? *Am. J. Infect. Control* 41(5 Suppl):S12–S19.
26. Sitzlar B, Deshpande A, Fertelli D, Kundrapu S, Sethi AK, Donskey CJ. 2013. An environmental disinfection odyssey: evaluation of sequential interventions to improve disinfection of *Clostridium difficile* isolation rooms. *Infect. Control Hosp. Epidemiol*. 34:459–465.
27. Jones AM, Kuijper EJ, Wilcox MH. *Clostridium difficile*: a European perspective. *J Infect*. 2013;66(2):115-28.
28. Balassiano IT, Yates EA, Domingues RM, Ferreira EO. *Clostridium difficile*: a problem of concern in developed countries and still a mystery in Latin America. *Journal of Medical Microbiology*. 2012;61: 169–179.
29. Kim KH. Isolation of *Clostridium difficile* from the environment and contacts of patients with antibiotic-associated colitis. *J Infect Dis*. 1981;143(1):42-50
30. Ali S, Moore G, Wilson AP. Spread and persistence of *Clostridium difficile* spores during and after cleaning with sporicidal disinfectants. *J Hosp Infect*. 2011 Sep;79(1):97-8.
31. Costa MC, Reid-Smith R, Gow S, Hannon SJ, Booker C, Rousseau J, Benedict KM, Morley PS, Weese JS. Prevalence and molecular characterization of *Clostridium difficile* isolated from feedlot beef cattle upon arrival and mid-feeding period. *BMC Vet Res*. 2012;28(8):38.
32. Janezic S, Ocepek M, Zidaric V, Rupnik M. *Clostridium difficile* genotypes other than ribotype 078 that are prevalent among human, animal and environmental isolates. *BMC Microbiol*. 2012 Mar 27;12:48.
33. Bartlett JG, Moon TW, Chang N, Taylor, Onderdonk AB. Role of *Clostridium difficile* in antibiotic-associated pseudomembranous colitis. *Gastroenterology*. 1978;75:778-782.
34. Schroeder MS. *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Am Fam Physician*. 2005; 71:921–928.
35. Hookman P, Barkin JS. *Clostridium difficile* associated infection, diarrhea and colitis. *World J Gastroenterol*. 2009;15:1554–1580.
36. O'Connor JR, Johnson S, Gerding DN. *Clostridium difficile* infection caused by the epidemic BI/NAP1/027 strain. *Gastroenterology*. 2009;136:1913–1924.

37. Denève C, Janoir C, Poilane I, Fantinato C, Collignon A. New trends in *Clostridium difficile* virulence and pathogenesis. *Int J Antimicrob Agents*. 2009;33(Suppl. 1):S24–S28.
38. Javier DJ, Castellanos-Gonzalez A, White, AC, Richards-Kortum R. Oligonucleotide-gold nanoparticle networks for detection of *Cryptosporidium parvum* HSP70 mRNA. *J Clin Microbiol*. 2009;47(12):4060-6.
39. Crannell A, Castellanos-Gonzalez A, Irani BA, Rohrman AC, White RR. A Nucleic Acid Test to Diagnose Cryptosporidiosis in Low-Resource Settings: Lab Assessment in Animal and Patient Specimens. (Submitted) *Science Translational Medicine* 2013.
40. Weigum SE, Castellanos-Gonzalez A, White C, Richards-Kortum R. Amplification-free detection of cryptosporidium nucleic acids using DNA/ RNA-directed gold nanoparticle assemblies. *J Parasitol*. 2013 PMID: 23617738
41. Quilaguy (falta completar fuente)