

# Infectio

## Asociación Colombiana de Infectología

www.elsevier.es/infectio



### REVISIÓN

## Enfermedad asociada a *Clostridium difficile*: prevalencia y diagnóstico por laboratorio

Jhon Walter Zea\* y Clara Lina Salazar

Grupo de Investigación en Bacterias Anaerobias y Aerobias de Importancia Clínica, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

Recibido el 21 de abril de 2012; aceptado el 19 de septiembre de 2012

#### PALABRAS CLAVE

*Clostridium difficile*;  
Enfermedad asociada a *Clostridium difficile*;  
Diarrea asociada a *Clostridium difficile*;  
Colitis pseudomembranosa;  
Diarrea asociada al cuidado de la salud

#### KEYWORDS:

*Clostridium difficile*;  
*Clostridium difficile* associated disease;  
*Clostridium difficile* associated diarrhea;  
Pseudomembranous colitis;  
Diarrhea associated with health care

#### Resumen

*Clostridium difficile* es un bacilo gram positivo, anaerobio estricto, capaz de formar esporas que le permiten su supervivencia en aguas, suelos y en ambientes hospitalarios, donde puede permanecer hasta años. Inicialmente, fue descrito en 1935 como un agente normal de la microbiota intestinal de recién nacidos sanos.

El presente escrito pretende revisar las generalidades del microorganismo y de la enfermedad asociada a *C. difficile*, enfatizando la prevalencia de ambos en nuestro medio, la problemática, el vacío del conocimiento que se presenta y los métodos de laboratorio que permiten su diagnóstico y estudio.

© 2012 ACIN. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

#### *Clostridium difficile* associated disease: Prevalence and diagnostic laboratory

#### Abstract

*Clostridium difficile* is a gram-positive, strictly anaerobic, bacillus capable of forming spores that enable it to survive in waters, soils, and in hospital environments, where it can remain for years. It was initially described in 1935 as a normal microorganism of the intestinal microbiota of healthy newborns.

This article reviews the general features of the microorganism and the disease associated with *C. difficile*, emphasising the prevalence of both in our environment, the problems, the lack of knowledge on it, and the laboratory methods that help in its diagnosis and study.

© 2012 ACIN. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved

\*Autor para correspondencia.

Universidad de Antioquia. Calle 69 No. 51C - 24, Laboratorio de anaerobios, IPS Universitaria Clínica León XIII. Medellín, Antioquia, Colombia.

Tel. +57(4) 5167300 ext. 3064, +57(4) 3771948

Correo electrónico: jhonriver28@hotmail.com (J.W. Zea)

## Introducción

*Clostridium difficile* (*C. difficile*) es un bacilo grampositivo, anaerobio estricto, capaz de formar esporas que le permiten su supervivencia en aguas, suelos y en ambientes hospitalarios, donde puede permanecer hasta años. Inicialmente, fue descrito en 1935 como un agente normal de la microbiota intestinal de recién nacidos sanos.

Su transmisión por vía fecal-oral convierte al personal de la salud, objetos médicos y superficies infectadas en una importante fuente de infección intrahospitalaria<sup>1,2</sup>, llegando a considerarse, actualmente, el principal agente causal de diarrea nosocomial asociada al tratamiento con antibióticos, donde además de la diarrea, puede causar colitis pseudomembranosa (CSM), enfermedad atribuida, en la mayoría de los casos, a *C. difficile*, e incluso complicaciones como la colitis fulminante, todas ellas englobadas en el término de enfermedades asociadas a *C. difficile* (EACD).

Con la aparición en 2002 del brote causado por la cepa hipervirulenta BI/NAP1/027/toxinotipo III, las cifras de morbimortalidad en el ámbito mundial aumentaron, viéndose afectados, principalmente, los países de Norteamérica y Europa. Al reconocer a *C. difficile* como un patógeno importante para la salud, con alto potencial epidémico, se han desarrollado herramientas diagnósticas y de estudio que han permitido conocer a fondo la fisiopatología de la enfermedad, factores de riesgo asociados, prevalencias, resistencia bacteriana y medidas adecuadas de promoción y prevención.

La implementación de métodos de tipificación molecular, como la electroforesis de campo pulsado en gel (PFGE: *Pulsed field gel electrophoresis*), el análisis con endonucleasas de restricción (REA: *Restriction Endonuclease Analysis*), la toxinotipificación, el análisis de repeticiones en tándem de número variable en locus múltiples (MLVA: *Multiple-locus variable-number*), la ribotipificación y el análisis de secuencias de locus múltiples (MLST: *Multi-locus sequence typing*) han permitido el estudio a fondo de esas características de *C. difficile*, enfocados principalmente al estudio de brotes.

El presente escrito pretende revisar las generalidades del microorganismo y de la EACD, enfatizando la prevalencia de ambos en nuestro medio, la problemática, el vacío del conocimiento que se presenta y los métodos de laboratorio que permiten su diagnóstico y estudio.

## Reseña histórica

Los primeros reportes de *C. difficile* como causante de enfermedad se dieron en 1893, cuando Finney describió el caso de una mujer joven con diarrea hemorrágica y pseudomembranas a nivel del colon<sup>3</sup>. Sin embargo, la bacteria fue aislada por primera vez en 1935 por Hall y O'toole como microbiota normal del tracto gastrointestinal (TGI) de neonatos, denominándola en ese momento *Bacillus difficilis* por su dificultad para crecer en medio *in vitro*<sup>4</sup>.

Bartlett et al. (1978) determinaron que *C. difficile* era el principal agente causal de CSM en pacientes en tratamiento con antibióticos<sup>5</sup>; en este estudio, encontraron que estos pacientes presentaban altos niveles de citotoxicidad en las muestras de materia fecal, atribuyéndolo en

un principio a un agente viral, *Mycoplasma*, o a la toxina de algún otro tipo de bacteria, sin poderlos aislar en el laboratorio. Utilizando un *pool* de antisueros para varios clostridios, se logró en los pacientes en estudio la neutralización de la actividad citotóxica con suero anti-*C. sordelli*, logrando aislar con posterioridad a *C. difficile* de la materia fecal de esos pacientes, y gracias a esto, hoy en día, se puede asociar con el 90 a 100% de los casos de CSM, donde la población más susceptible son los ancianos mayores de 65 años<sup>6-10</sup>.

## Patogénesis

Como mecanismo de infección, la forma esporulada de *C. difficile*, la cual es resistente a la desecación, químicos y temperaturas extremas, ingresa por vía oral, atraviesa el sistema digestivo y se establece en el colon, donde encuentra el ambiente propicio para adoptar su forma vegetativa. La bacteria se adhiere a la capa mucosa del enterocito y la atraviesa con ayuda del flagelo, adhesinas y proteasas que produce<sup>11</sup>.

En condiciones normales, el TGI del humano posee una microbiota indígena característica que le proporciona el equilibrio necesario para poder inhibir el crecimiento de ciertos patógenos para él, lo que se ha llamado "resistencia a la colonización"<sup>12</sup>. Sin embargo, ciertas condiciones (ver factores de riesgo asociados al desarrollo de EACD), como el tratamiento con antibióticos de amplio espectro, pueden ocasionar en el individuo una alteración de esta microbiota permitiendo que *C. difficile* aproveche este desequilibrio para replicarse en grandes cantidades y causar daño a través de la producción de sus toxinas.

## Toxinas

Fue a finales de los años setenta cuando varios autores empezaron a describir la presencia de una toxina en un hámster infectado por la bacteria con un efecto diferente, enterotóxica, a la citotoxina antes mencionada por otros autores<sup>13,14</sup>, y a principios de los ochenta fueron aisladas de materia fecal de humanos enfermos por *C. difficile* las 2 clases de toxinas<sup>15,16</sup>. Hoy en día, se conoce que la bacteria, a nivel del colon, produce una toxina A o enterotoxina y toxina B o citotoxina, ambas tienen efecto citotóxico, causando permeabilidad vascular y hemorragias, pero además, la enterotoxina induce la acumulación de líquidos y células inflamatorias a través de la activación de la respuesta inflamatoria, mientras que la citotoxina causa destrucción del citoesqueleto del enterocito, siendo más potente que la primera<sup>16-18</sup>.

Las cepas de *C. difficile* que no producen toxinas no son patógenas<sup>18</sup>; pero las que tienen los genes *tcdA* y *tcdB*, que codifican la expresión de la toxina A y B, respectivamente, sí lo son. Estos genes se encuentran ubicados en una región del cromosoma llamada locus de patogenicidad (*PaLoc*), el cual contiene también 3 genes accesorios: *tcdR*, *tcdE* y *tcdC*. *tcdR* ha demostrado tener la capacidad de modular positivamente la expresión de los genes de las toxinas, mientras que *tcdC* modula negativamente tal expresión, al interferir con la capacidad de la ARN



Figura 1 Distribución de genes en el *PaLoc* que codifican y regulan la expresión de las toxinas de *Clostridium difficile*<sup>20</sup>.



Figura 2 Distribución de genes en el *CdtLoc* que codifican y regulan la expresión de las toxinas binarias *Clostridium difficile*<sup>22</sup>.

polimerasa de reconocer los promotores de *tcdA* y *tcdB*. Esto se ha sugerido al encontrar que *tcdA*, *tcdB* y *tcdR* se transcriben durante la fase de crecimiento estacionaria, mientras que *tcdC* se expresa ya en la fase de crecimiento exponencial. En cuanto a *tcdE*, su función aún no está bien definida<sup>19-21</sup> (ver fig. 1).

El receptor al cual se unen las toxinas a nivel del epitelio intestinal aún no está bien definido. Se presume que cada toxina tiene tropismo por diferentes sitios en la célula hospedera: la toxina A se enlaza más efectivamente hacia el lado apical de la célula, mientras que la toxina B se enlaza mejor a un receptor aún desconocido en la zona basolateral de la célula. En animales, la toxina A se ha evidenciado que se puede enlazar al trisacárido Gal1(a1-3)Gal(B1-4) GlcNac, mientras que en humanos se ha propuesto a la glicoproteína gp96 como correceptor para la adherencia de la toxina A a la célula<sup>22,23</sup>.

Desde que Hall y O'toole, en 1935, describieron por primera vez a *C. difficile* como microbiota comensal del TGI de recién nacidos, se ha establecido que esta población puede estar infectada sin desarrollar la enfermedad hasta en un 80%, mientras que en los adultos esta cifra es menor del 5%<sup>18,24</sup>. Se han planteado varias hipótesis de por qué los recién nacidos se infectan pero no padecen la enfermedad: a) el calostro proveniente de las madres puede contener anticuerpos que contribuyan a neutralizar las toxinas A y B<sup>25</sup>; b) las células intestinales fetales son mucho menos sensibles al efecto de las toxinas que las células intestinales de los adultos<sup>26</sup>, y c) los recién nacidos pueden carecer de receptores específicos para la unión de las toxinas a nivel de los enterocitos<sup>27,28</sup>.

### Cepa BI/NAP1/027/toxinotipo III

Hacia 2002, la Universidad de Pittsburg Medical Center, en los Estados Unidos, reportó un aumento de los casos de EACD en Norteamérica, inicialmente en Canadá, posterior-

mente, en EE. UU. y Europa<sup>29-32</sup>. Tales casos llevaron a la aparición de un brote causado por una cepa hipervirulenta de *C. difficile*, que en 2005 fue caracterizada como BI/NAP1/027/toxinotipo III, BI por REA, NAP1 por PFGE y 027 por ribotipificación, y cuyas características principales son:

a) Deleción en el gen *tcdC*, por lo cual no se puede controlar la expresión de los genes, lo que conlleva la hiperproducción toxigénica<sup>33,34</sup>.

b) Hiperproducción de toxina binaria. Esta toxina es codificada en una región llamada locus CDT (*CdtLoc*), separada del *PaLoc*, y comprende 3 genes en lugar de 5. Las toxinas que producen, *CdtA* y *CdtB*, se encuentran reguladas por el gen *CdtR* y no poseen relación alguna con las toxinas del *PaLoc*. La *CdtB* es la encargada de unirse a la célula hospedera, permitiendo la traslocación de *CdtA* al interior<sup>22,35,36</sup> (ver fig. 2).

c) Resistencia a las fluoroquinolonas<sup>30,34,37,38</sup>. Se ha sugerido que un factor importante que potenció el desarrollo del brote por este ribotipo 027 resistente a las fluoroquinolonas fue que al mismo tiempo, en los hospitales de Canadá, se empezaba a utilizar comúnmente estos antibióticos<sup>39</sup>.

Además, *in vitro*, se ha demostrado que estas cepas tienen alta capacidad de esporulación, en comparación con las cepas que no causan brotes<sup>40</sup>.

### Prevalencia

El sistema nacional de estadísticas vitales del CDC publicó, en marzo de 2011, el reporte preliminar para muertes en 2009, siendo la enterocolitis la causa número 19 de muerte en la población mayor de 65 años<sup>41</sup>; en 1999, se presentaron 793 muertes causadas por *C. difficile*, mientras que en 2009, se reportaron 7.285 muertes, con una tasa de

muerte ajustada a la edad de 2,2 muertes por 100.000 personas<sup>42</sup>. Según la Guía práctica para la infección por *C. difficile* en adultos, publicada por la Sociedad Americana de Epidemiología para el Cuidado de la Salud y la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas, *C. difficile* es el principal patógeno causante de la colitis asociada a antibióticos y del 20-30% de los casos de diarrea nosocomial asociada a antibióticos<sup>43</sup>.

Después de la aparición de los brotes en Canadá por la cepa BI/NAP1/027/toxinotipo III, las cifras de incidencia y la severidad de la EACD en el ámbito mundial han ido en aumento: en los hospitales canadienses, entre 1997 y 2005, las tasas de incidencia aumentaron de 3,8 a 9,5 casos por cada 10.000 pacientes diarios, o 3,4 a 8,4 casos por cada 1.000 ingresos en cuidados intensivos<sup>43</sup>; mientras en niños hospitalizados en Estados Unidos, entre 2001 y 2006, la incidencia anual de EACD tuvo un incremento de 2,6 a 4,0 casos por 1.000 admisiones, o de 4,4 a 6,5 casos por 10.000 pacientes diarios<sup>44</sup>. Según McFarland et al. (2008), la incidencia de EACD a partir del brote en Canadá cambió drásticamente, de 35,6 casos por 100.000 pacientes en 1991 a 156,3 casos por 100.000 pacientes en el 2004, con un aumento en la mortalidad de 4,5% de casos en 1991 a 22% de casos en el 2004<sup>45</sup>. Loo et al. (2004), describieron en varios hospitales de Canadá una incidencia de 22,5 por 1.000 casos de diarrea nosocomial asociada a *C. difficile*, con una tasa de mortalidad de 6,9% a los 30 días y de 16,7% al año de haber sido diagnosticados<sup>30</sup>.

Tal vez el ribotipo más ampliamente descrito como causante de infección por *C. difficile*, especialmente en Europa, es el ribotipo 001, el cual ha sido asociado a altas tasas de resistencia a antibióticos como eritromicina, ciprofloxacina y moxifloxacina<sup>46,47</sup>. En los últimos años, ha aumentado el reporte de casos de EACD causada por el ribotipo 017, el cual expresa toxinas A-/B+ debido a una delección del gen *tcdA*<sup>46,48,49</sup>, lo cual limita el diagnóstico del laboratorio para aquellas técnicas que detecten la expresión de este gen, resaltando la importancia de implementar o complementar con técnicas moleculares.

Goorhuis et al. (2008), describieron en los Países Bajos una nueva cepa hipervirulenta, ribotipo 078, causante de una EACD de similar severidad a la enfermedad causada por la cepa 027, con un incremento en la incidencia entre 2005 y 2008 del 3 al 13%, afectando principalmente a la población joven y asociada a la comunidad<sup>50</sup>.

En Latinoamérica, en Costa Rica, también se ha descrito a *C. difficile* como el principal agente causal de diarrea nosocomial, con una tasa de infección cercana al 30% de los casos de diarrea<sup>51,52</sup>, mientras que la cepa NAP1 fue encontrada, por primera vez, en otro centro hospitalario de este país con una prevalencia del 54% del total de los aislamientos<sup>53</sup>.

En Brasil, Souza Dias et al. (2010) describieron un seudobrote en su país en el 2002-2003, donde evaluaron 138 casos de EACD, con una incidencia de 3,3 por 1.000 pacientes hospitalizados, y obteniendo 16 tipos diferentes de *C. difficile* por reacción en cadena de la polimerasa (PCR: *Polymerase Chain Reaction*)<sup>54</sup>. En un estudio de casos y controles, se determinó por ensayo inmunoenzimático (EIA) que 22 casos de 49 estudiados eran positivos para las toxinas de *C. difficile*<sup>55</sup>. Balassiano et al. (2011), aislaron y caracterizaron cepas de *C. difficile* de un hos-

pital de Rio de Janeiro, encontrando a través de EIA, una prevalencia de 27,1% (19 de 70) en los pacientes sujetos a estudios, donde la mayoría de las cepas presentaban los genes *tcdA* y *tcdB*, ninguna cepa delección en el gen *tcdC*, y el ribotipo 133 fue aislado en el 50% de esas cepas<sup>56</sup>. El mismo autor, en el 2010, ya había descrito la prevalencia de infección por *C. difficile* en un grupo de pacientes hospitalizados en una unidad de cuidados intensivos (UCI) en Rio de Janeiro, de los cuales, 43 (19,7%) de los pacientes presentaron EACD, con una incidencia de 1,8 casos por 1.000 pacientes diarios que ingresan en la UCI<sup>57</sup>.

En Argentina, Legaria et al. (2003), describieron que de 87 pacientes con sospecha de EACD, el 40% eran positivos para la determinación toxigénica de *C. difficile* a través de EIA<sup>58</sup>. En Chile, Gardilicic et al. (2000), evaluaron por EIA 27 pacientes hospitalizados con 31 episodios de diarrea asociada a *C. difficile* durante 4 meses, de los cuales solo murió 1 (4%) paciente por megacolon tóxico<sup>59</sup>; mientras que en Uruguay, evaluaron 78 pacientes de UCI con diarrea, a los cuales se les evaluó la presencia de *C. difficile* por aglutinación en látex y EIA, encontrando una prevalencia del 26%<sup>60</sup>.

Willingham et al. (1998), determinaron por EIA, que de 126 pacientes peruanos con sida, con y sin diarrea, 27 (21,4%) estaban infectados por *C. difficile*, de los cuales 11 (42%) murieron en el transcurso del estudio<sup>61</sup>. Más recientemente, en 2007, García et al. (2007), reportaron que de 156 pacientes de un hospital de Lima con diarrea nosocomial, 55 (35,2%) fueron diagnosticados de EACD<sup>62</sup>.

En Colombia, hasta la fecha, se han realizado pocos estudios que permitan determinar la prevalencia de la infección y enfermedad por *C. difficile*. En 2008, se publicó una revisión bibliográfica realizada por Otero-Rengino, la cual actualiza la epidemiología, patogénesis y tratamiento de la infección por *C. difficile*<sup>10</sup>, y en 2009, el mismo autor determinó mediante un estudio observacional la prevalencia y la causa de colitis en adultos mayores, atribuyéndole a *C. difficile* el 40% de las causas infecciosas de la enfermedad<sup>63</sup>.

En Medellín, recientemente Becerra et al. (2011), publicaron el estudio "Factores epidemiológicos y clínicos asociados a infección por *C. difficile*", el cual estudia los principales factores clínicos y epidemiológicos asociados al desarrollo de EACD<sup>64</sup>; y Escobar Díaz et al. (2011), desarrollaron el estudio "Diagnóstico de *Clostridium difficile* por toxina y cultivo en pacientes con diarrea hospitalizados en la IPS Universitaria Clínica León XIII", encontrando que de 48 muestras, 8 (16,7%) fueron positivas para toxina y cultivo (estudio aún sin publicar).

## Formas clínicas

Los individuos que padecen la EACD pueden desarrollar cualquiera de estos estados:

### Colitis simple

La colitis se define como un proceso inflamatorio del colon que puede ser causado por diferentes etiologías: isquémica, infecciosa, ulcerativa, entre otras. En este caso, se presenta una diarrea abundante, de 3 o más deposiciones diarias, líquida, con moco y sangre, acompañada

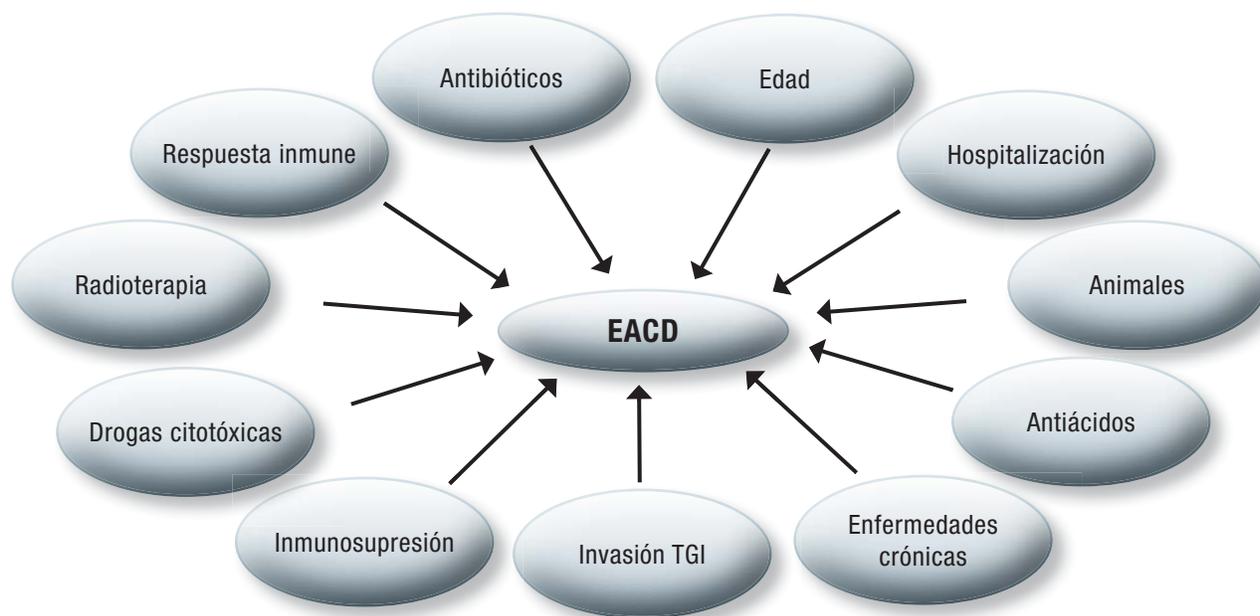


Figura 3 Factores de riesgo que participan en el desarrollo de la enfermedad asociada a *Clostridium difficile*.

de dolor abdominal; generalmente, autolimitada, que se controla con hidratación y la suspensión de la terapia antimicrobiana<sup>18,63</sup>.

### Colitis pseudomembranosa (CSM)

Causada por *C. difficile* se caracteriza por lesiones con eritema, edema, pérdida del patrón vascular, sangrado, placas amarillentas elevadas de 2 a 10 mm<sup>18,63</sup>.

En el estudio de Martín-Alva et al. (2007), sobre la asociación de la toxina A de *C. difficile* y el daño histopatológico causado en los pacientes, se clasificaron los resultados de las biopsias colónicas y se dividieron en 3 tipos de lesiones<sup>65</sup>:

- Tipo I: se pueden apreciar acumulaciones focales de polimorfonucleares con áreas de necrosis epitelial focalizada y exudación de fibrina y neutrófilos en la luz colónica.
- Tipo II: presenta un exudado más prominente que se origina en un área de ulceración epitelial, manteniéndose intacta la mucosa circundante.
- Tipo III: consiste en la necrosis epitelial difusa (no focal, como sucedía en los tipos anteriores), cubierta por una pseudomembrana formada por polimorfonucleares, fibrina y detritus celulares.

### Colitis fulminante

Manifestación grave y altamente letal de la enfermedad, que aparece aproximadamente en el 3% de los infectados con *C. difficile*. Se caracteriza, además de lo descrito en la CSM, por presentar una alteración del estado general del individuo, acompañado por letargo, fiebre, leucocitosis, acidosis láctica, taquicardia, dolor abdominal,

tono muscular ausente, íleo paralítico, megacolon tóxico, entre otras manifestaciones, hasta llegar a la colectomía e incluso la muerte<sup>18,24,66,67</sup>.

### Recurrencias

Aproximadamente entre un 15-45% de los pacientes tratados de EACD sufren recaídas en un período de 2 meses. Esto se puede deber, además de las constantes alteraciones de la microbiota a nivel del TGI, a la posible presencia de esporas de la bacteria no erradicadas por el tratamiento y a que la inmunidad que se genera a partir de la primera exposición no es específica, ya que estas reinfecciones pueden ser por cepas diferentes a la inicial<sup>68</sup>.

### Infecciones extraintestinales

Rara vez, se han reportado casos de infecciones extraintestinales; se han descrito casos de bacteremias, peritonitis, osteomielitis, abscesos viscerales y cerebrales, infección en piel y tejidos, entre otros. En la bacteremia, el daño que las toxinas, especialmente la enterotoxina A, causan a nivel del epitelio del TGI puede llevar a una perforación del mismo y al paso de las toxinas al torrente sanguíneo, donde la acción de la citotoxina puede ser potencialmente letal<sup>69,70</sup>.

### Factores de riesgo asociados al desarrollo de enfermedad asociada al *Clostridium difficile*

El principal factor de riesgo que influye en el desarrollo de la EACD es la terapia prolongada con antibióticos de amplio espectro. Esto se empezó a evidenciar en 1968, cuando Small demostró en hámster inyectados con lincomicina el desarrollo de enterocolitis, y posteriormente

su muerte<sup>71</sup>, mientras otros estudios, en los setenta, encontraron en materia fecal de hámster tratados con antibióticos, especialmente con clindamicina, y que murieron por inflamación del ciego, un alto número de toxinas de *C. difficile*<sup>72-74</sup>. Posteriormente, otras investigaciones determinaron que otros antibióticos, aminoglicósidos y betalactámicos, especialmente ampicilina y cefalosporinas, también incidían en el desarrollo de la EACD en pacientes hospitalizados<sup>75-77</sup>.

La edad avanzada, especialmente en ancianos hospitalizados, juega un papel muy importante en el desarrollo de la EACD. Este factor de riesgo se ha visto muy asociado con la respuesta del sistema inmune, especialmente la de tipo humoral, que pueda presentar cada individuo ante la infección; en pacientes con edad avanzada, se presenta una falla en la producción de inmunoglobulina G antitoxina A, como respuesta inicial a la infección<sup>78-80</sup>, además de otras afecciones que se presentan con la edad y que le dificultan la respuesta contra esta clase de patógenos. Karas et al. (2010), en un revisión de la literatura estableció que en 27 estudios, con 10.975 casos de EACD, la mortalidad calculada era menor de 5,99% en esos pacientes con 3 meses de diagnóstico, siendo esta cifra asociada fuertemente a la edad avanzada, donde el 13,5% de los pacientes tenían más de 80 años de edad<sup>81</sup>.

Entre otros factores de riesgo que participan en el desarrollo de la EACD están: estancia prolongada en hospitales, especialmente en centros para personas de la tercera edad y en las UCI, pacientes con enfermedades crónicas severas (renales y hepáticas), estados de inmunosupresión y quimio/radioterapia, drogas citotóxicas, antiácidos, inhibidores de la bomba de protones, cirugías gastrointestinales y otros procedimientos invasivos en el TGI<sup>1,8,24</sup>.

Como enfermedad mayormente asociada al cuidado de la salud, la presencia de esporas en el medio ambiente hospitalario y su transmisión a los pacientes se ve influida por las inadecuadas prácticas de desinfección de espacios físicos, instrumentos médicos y de lavado de manos del personal de salud<sup>82-84</sup>.

Los animales también establecen una importante ruta de infección para el humano, ya sea que padezcan de la enfermedad o como portadores asintomáticos; se han descrito animales domésticos como gatos y perros, caballos, terneros y lechones como posibles agentes diseminadores de la enfermedad<sup>85-88</sup>. Se ha descubierto, por técnicas moleculares, que algunos ribotipos de *C. difficile* encontrados tanto en humanos como en animales se encuentran genéticamente relacionados<sup>50</sup> (ver fig. 3).

## Diagnóstico por laboratorio y tipificación bacteriana

El diagnóstico de la EACD debe estar basado en una combinación de la clínica del paciente, exámenes de rutina como la colonoscopia o estudios histológicos y el laboratorio. En el laboratorio, existen diferentes métodos para establecer el diagnóstico de la enfermedad: ensayos de neutralización de citotoxina por cultivo celular, aglutinación en látex, cultivo anaerobio más pruebas de identificación y EIA.

En cuanto a las pruebas moleculares, estas pueden ser utilizadas, ya sea como herramientas diagnósticas, siendo el caso de la PCR convencional, o como herramientas de estudio epidemiológico y filogenético, como se va a describir más adelante.

## Cultivo celular

El ensayo de neutralización de citotoxina es la prueba de referencia para la identificación de la toxina B en materia fecal, gracias a que en más del 90% de los pacientes con CSM se puede identificar el efecto citopático que la toxina produce sobre tejido humano *in vitro*. La técnica posee una sensibilidad y una especificidad de casi el 100%. Entre sus limitaciones, encontramos su elevado costo, el tiempo para la entrega de los resultados (2-3 días), la escasez de centros especializados en la técnica y que no existe relación entre la presencia de la toxina y la gravedad de la enfermedad<sup>42,43,89</sup>.

Tricota-Lee et al. (1987), determinaron que los fibroblastos humanos, en comparación con otras líneas celulares, son los más sensibles para la detección de la toxina<sup>90</sup>.

## Cultivo anaerobio

Permite el crecimiento de cepas morfológicamente compatibles con la bacteria; se utilizan medios selectivos y diferenciales incubados en anaerobiosis, el medio más ampliamente utilizado es el de agar cicloserina-cefoxitina-fructosa, descrito por primera vez por George et al. (1979)<sup>89,91,92</sup>. Esta técnica permite el aislamiento de la colonia y su posterior manipulación para utilizarla en la identificación de fenotipos, y el estudio de su perfil de resistencia. Por ejemplo, la identificación confirmatoria se puede realizar mediante las pruebas de indol negativo, L-prolina-aminopeptidasa positiva y métodos comerciales (Crystal™ ID Systems Becton Dickinson, Loveton Circle Sparks, MD)<sup>92</sup>. Sin embargo, esta técnica puede ser ineficaz para fines diagnósticos debido a la dificultad para que este tipo de bacterias crezcan, desarrollo de cepas no toxigénicas o que no expresen la toxina *in vitro*.

También se han utilizado otros medios de cultivo para el aislamiento de *C. difficile*: agar cicloserina manitol, agar sangre manitol cicloserina, agar cefoxitina cicloserina con suplementos de sangre, entre otros. Mundy et al. (1995), compararon el agar cicloserina-cefoxitina-fructosa con el agar sangre manitol cicloserina, donde este último presentó menos inhibición de la flora normal presente en la materia fecal, siendo el agar cicloserina-cefoxitina-fructosa más indicado para el aislamiento de *C. difficile*<sup>93</sup>.

## Ensayos inmunoenzimáticos

Desde los años ochenta hasta la fecha, los EIA han sido ampliamente utilizados y modificados para detectar, dependiendo de la casa comercial, la presencia de la toxina A, la toxina B o ambas en materia fecal.

Son pruebas diagnósticas comerciales, rápidas y económicas, con una sensibilidad cercana al 63-94% y una especificidad del 75-100%; los resultados deben ser comparados a la luz de la historia clínica, debido a que hay cepas que pueden no expresar la toxina que se está evaluando, siendo los EIA

que aplican ambas toxinas en su detección las mejores pruebas diagnósticas<sup>42,43,89,94-96</sup>.

### Aglutinación en látex

Inicialmente, se pensó que la aglutinación en látex para detectar *C. difficile* detectaba la toxina A en las muestras de material fecal; sin embargo, estudios posteriores demostraron que cepas bacterianas no toxigénicas o a las cuales se les ha extraído la toxina son positivas igualmente con el test, sugiriendo que es otra la proteína la causante de la reacción<sup>97</sup>. Lyerly et al. (1991), comprobaron que la proteína causante de la aglutinación era un antígeno común en *C. difficile*: la glutamato deshidrogenasa<sup>98</sup>.

Esta técnica tiene una especificidad del 94-98% y una baja sensibilidad, 58-68%<sup>43,89</sup>, lo cual la hace poco idónea para ser utilizada como test diagnóstico de rutina en el laboratorio.

### Técnicas moleculares

En el caso de *C. difficile*, las técnicas de biología molecular pueden ser utilizadas para fines epidemiológicos, entender los modos de transmisión, evaluar los factores de virulencia y los mecanismos de resistencia bacteriana.

Los primeros pasos para detectar cepas toxigénicas de *C. difficile* se dieron a principios de los noventa, mediante la implementación de la PCR como método más sensible y rápido que permitió detectar los genes que codificaban para la expresión de las toxinas A y B<sup>99-101</sup>.

Los métodos, y algunas técnicas, más utilizados para la tipificación de cepas de *C. difficile* son:

- Métodos basados en restricción: PFGE<sup>102,103</sup>, REA<sup>103,104</sup>, toxinotipificación<sup>105</sup>.
- Métodos basados en amplificación: análisis de repeticiones en tándem de MLVA<sup>106</sup>, ribotipificación<sup>103,107-109</sup>.
- Métodos basados en secuenciación: MLST<sup>106</sup>.

Diferentes estudios han comparado varias de estas metodologías para determinar cuál de ellas presenta un mayor poder discriminatorio en cepas de *C. difficile* aisladas en pacientes con diarrea asociada a antibióticos provenientes de diversos hospitales. La mayoría de trabajos coinciden en que MLVA y PFGE presentan el mayor poder discriminatorio, seguidos de REA y MLST<sup>106,110-112</sup>.

### La electroforesis en campo pulsado en gel

La PFGE es uno de los primeros métodos implementados para la tipificación de *C. difficile*, siendo considerada la técnica estándar en Canadá y Estados Unidos<sup>103</sup>.

Esta técnica emplea una enzima que se encarga de cortar y fragmentar el genoma bacteriano; se han utilizado enzimas como la *Sma-I* o *Sac-II*, dependiendo del autor. Estos fragmentos son separados en un gel de poliacrilamida que es sometido a un campo eléctrico, lo que permite a los fragmentos migrar a través del gel de acuerdo con su tamaño y ser analizados visualmente o a través de un *software*. Patrones de banda con una similaridad  $\geq 80\%$  les permite clasificar como un solo pulsotipo; en Norteamérica, cada pulsotipo se designa NAP y el número del tipo (por ejemplo, NAP1, NAP2, etc.)<sup>22,103</sup>.

Para citar un ejemplo de la aplicación de esta técnica, Gal et al. (2005), desarrollaron y aplicaron un protocolo de PFGE a 50 aislamientos del ribotipo 001 de *C. difficile*, donde la digestión con la enzima de restricción *Sma-I* le proporcionó bandas patrones diferentes y reproducibles<sup>102</sup>.

### Análisis con endonucleasas de restricción

El REA, al igual que en PFGE, utiliza enzimas específicas que cortan el ADN bacteriano en muchos más fragmentos que son separados por electroforesis en un gel de agarosa. La enzima más utilizada es la *Hind-III*, una enzima "cortadora" de 6 pb con numerosos sitios de restricción en el genoma. Este método arroja resultados bastante discriminatorios, pero el patrón de bandas obtenido es más difícil de interpretar y de reproducir comparado con la PFGE<sup>22,103</sup>. Los aislamientos que muestran 6 o menos diferencias visibles en las bandas de restricción son nombrados con el mismo grupo y designados por letras, mientras que los patrones idénticos de restricción son nombrados con números (por ejemplo, CF1, CF2)<sup>103</sup>.

En 1987, Kuijper et al., usando un análisis de digestión con enzimas de restricción, describieron en 2 pacientes con CSM adquirida en el ámbito hospitalario, patrones de restricción del ADN bacteriano muy similares a los hallados en otros aislamientos de la bacteria del mismo ambiente hospitalario, demostrando así la utilidad que tiene la técnica para estudiar la epidemiología de *C. difficile*<sup>113</sup>.

Clabots et al. (1993), con su grupo de investigación, desarrollaron un sistema de tipificación con REA *HindIII* para el ADN completo de 1.965 aislamientos de *C. difficile*. Los resultados obtenidos de esta colección de aislamientos permitieron organizarlos en 75 grupos, de los cuales 43 fueron citotoxina positiva, 28 citotoxina negativa y 4 grupos fueron incluidos en cepas toxigénicas y no toxigénicas. La tipificación con REA fue capaz de discriminar las diferencias obtenidas con cepas de referencia y con otros tipos de *C. difficile* identificados por otras técnicas, concluyendo que la técnica es sensible, discriminatoria, reproducible y rápida<sup>104</sup>. Este grupo de investigación mantiene una colección de aislamientos clínicos de *C. difficile* de varios sitios del mundo, obtenidos en un período de 20 años, aproximadamente. Esta colección fue importante en el momento de identificar la cepa epidémica BI/NAP1/027 y poder demostrar que ya se había aislado en el pasado, pero que otros factores favorecieron el incremento de su virulencia, como por ejemplo, la utilización de fluoroquinolonas<sup>103</sup>.

### Toxinotipificación

La toxinotipificación es un método basado en PCR en el cual las cepas de *C. difficile*, de acuerdo con la longitud y patrones de restricción de 2 fragmentos (el B1 y A3) del *PaLoc*, son clasificadas en toxinotipos.

Rupnik et al. (1998), estudiaron en 219 aislamientos de 22 serogrupos de *C. difficile* los cambios en los genes que codifican para la producción de toxinas. Comparando los genes de las cepas problema con la cepa de referencia para *C. difficile* VPI 10463, y utilizando polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs), se reconocieron 5 patrones diferentes en *tcdB* y 2 en *tcdA*. De acuerdo con los cambios y deleciones encontradas en los genes, las cepas fueron divi-

didadas en 10 grupos, del toxinotipo del I al X<sup>105</sup>. Actualmente, se conocen 27 toxinotipos diferentes (del I al XXVII)<sup>22</sup>.

### Análisis de repeticiones en tándem de número variable en locus múltiples

El análisis de repeticiones en tándem de MLVA es un método que cuenta el número de alelos repetidos en el genoma para una serie de loci conservados que son amplificados por PCR<sup>22</sup>.

Marsh et al. (2006), implementaron un MLVA para subtipificar cepas de *C. difficile* obtenidas de un brote en el 2001 en un hospital de cuidado terciario; los loci identificados fueron comparados con REA, encontrando el mismo tipo esperado. La técnica es un método que permite la detección de brotes de *C. difficile* y contribuye en el estudio de la epidemiología de la transmisión nosocomial<sup>114</sup>.

### Ribotipificación

Así como PFGE es la técnica más utilizada en Norteamérica, la ribotipificación es la más utilizada en Europa. Es el método de tipificación molecular universal de bacterias, utilizada para la discriminación de los diferentes serotipos bacterianos. El ribotipo se define como un grupo de cepas con idénticas bandas patrones, donde una diferencia en una sola banda representa un nuevo ribotipo. Esta técnica se basa en la amplificación, por medio de *primers* específicos, de la región espaciadora interna transcrita que se encuentra entre el rARN 16S y 23S. El resultado de estas amplificaciones son bandas entre 200 y 700 pb visualizadas, normalmente, sobre un gel de agarosa o también a través de un *software*<sup>46,103,108,115</sup>.

Muchas investigaciones han implementado la ribotipificación para el desarrollo de sus estudios, siendo las condiciones de Stubbs et al. (1999) o Bidet et al. (1999), las más utilizadas hasta el momento<sup>46,103,115</sup>. Stubbs et al. describieron por PCR una librería de 116 ribotipos de la bacteria, donde el tipo 001 fue el más común asociado a infecciones intrahospitalarias en el Reino Unido<sup>46</sup>.

### Análisis de secuencias de locus múltiples

El MLST es una técnica muy similar al MLVA, que permite el estudio de la epidemiología y filogenia de *C. difficile*. Esta técnica permite el estudio de la relación entre especies de bacterias, a través de la amplificación y secuenciación de aproximadamente 450-500 pb de fragmentos internos del genoma de, generalmente, 5 a 7 genes *housekeeping*. La diferencia encontrada en la secuencia de cada *housekeeping* se considera un alelo diferente, y cada alelo define un tipo de secuencia<sup>103</sup>.

MLST tiene la ventaja de que los tipos de secuencias arrojados no son ambiguos y fácilmente comparables a través de Internet con una base de datos de otros aislamientos<sup>103</sup>.

### Tratamiento y susceptibilidad antimicrobiana

El tratamiento para el manejo de la CSM está basado en hidratación y la suspensión de los antibióticos causantes de la diarrea, esto con el fin de restaurarle al paciente la

microbiota normal del TGI y su resistencia a la colonización por patógenos como *C. difficile*.

Desde comienzos de los años ochenta hasta la actualidad, el tratamiento con metronidazol y vancomicina ha demostrado ser efectivo contra la bacteria. Para complicaciones clínicas de la EACD, vancomicina provee una mayor respuesta a la enfermedad que el metronidazol<sup>43,116-119</sup>. El manejo de estas formas complicadas y recurrentes puede ir desde el suministro de fluidos intravenosos, vasopresores, vancomicina oral o intravenosa, metronidazol intravenoso, enemas, restablecimiento de la flora intestinal, hasta llegar, como única opción, a la colectomía<sup>22,120,121</sup>.

La susceptibilidad de la bacteria a ciertos antibióticos varía de un lugar a otro. Diversos estudios han reportado cifras diferentes de resistencia de la bacteria al metronidazol, además de cefotaxime, ciprofloxacina, moxifloxacina, levofloxacina, eritromicina, clindamicina, tetraciclina, rifampicina, imipenem y ácido fusídico<sup>122,123</sup>.

### Impacto de las enfermedades asociadas a *Clostridium difficile* en la sociedad, salud y economía

Históricamente, la mortalidad atribuible a infección por *C. difficile* ha sido baja, como un resultado directo o indirecto de infección, que ocurre aproximadamente en menos del 2% de casos. Sin embargo, los sobrecostos atribuibles a infección por *C. difficile* sugieren una carga sustancial sobre los sistemas de salud médica. De 1999 a 2003 en Massachusetts, se atribuyó a EACD un total de 55,380 días de hospitalización y 55,2 millones de dólares<sup>43</sup>. Se estima que en la actualidad, en EE. UU., hay 250.000 casos cada año, los cuales producen mayor estancia hospitalaria, con un costo adicional de 1,1 billones de dólares<sup>124</sup>.

Actualmente, la EACD constituye un problema creciente de salud pública en este entorno debido, principalmente, a los siguientes factores:

- a) La vulnerabilidad de los ancianos a la enfermedad<sup>6,8,9</sup>.
- b) En la mayoría de casos, el tratamiento para la diarrea, independiente de la presencia o no de la CSM, es empírico, basado en hidratación y manejo con antimicrobianos como metronidazol y vancomicina principalmente<sup>43</sup>, lo que puede llevar a la no resolución de la enfermedad, estancias hospitalarias prolongadas y recurrencias.
- c) La eliminación de la microbiota autóctona y el aumento de resistencia en *C. difficile* por el uso indiscriminado de antibióticos<sup>122,123</sup>, tanto en el ámbito hospitalario como de la comunidad.

### Conclusiones

La EACD se considera la principal enfermedad del TGI asociada al cuidado de la salud en pacientes hospitalizados > 65 años y que reciban tratamientos con antibióticos de amplio espectro. Debido al modo de transmisión de la bacteria, sus factores de virulencia, mecanismos de patogenicidad, y la aparición de posibles cepas epidémicas o resistentes a antibióticos, este tipo de enfermedad podría considerarse un problema de salud pública en las instituciones de salud.

Sin embargo, la ausencia de información e investigaciones en el medio no ha logrado evidenciar la verdadera prevalencia del microorganismo y de la EACD. Por tanto, esta revisión pretende retomar esta temática, contextualizar y dilucidar la importancia de realizar investigaciones aplicadas al futuro que permitan resolver esta problemática.

## Conflicto de intereses

Los autores manifiestan que no tienen conflictos de intereses para la publicación de este artículo

## Bibliografía

- Sehulster L, Chinn RY; CDC; HICPAC. Guidelines for environmental infection control in health-care facilities. Recommendations of CDC and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). MMWR Recomm Rep. 2003;52(RR-10):1-42.
- Dubberke ER, Reske KA, Noble-Wang J, Thompson A, Killgore G, Mayfield J, et al. Prevalence of *Clostridium difficile* environmental contamination and strain variability in multiple health care facilities. Am J Infect Control. 2007;35:315-8.
- Finney JMT. Gastroenterostomy for cicatrizing ulcer of the pylorus. Johns Hopkins Hosp Bull. 1893;4:53-55.
- Hall I, O'Toole E. Intestinal flora in newborn infants with a description of a new pathogenic anaerobe. Bacillus difficilis. 1935;49:390-402.
- Bartlett JG, Moon N, Chang TW, Taylor N, Onderdonk AB. Role of *Clostridium difficile* in antibiotic-associated pseudomembranous colitis. Gastroenterology. 1978;75:778-82.
- George RH, Symonds JM, Dimock F, Brown JD, Arabi Y, Shinagawa N, et al. Identification of *Clostridium difficile* as a cause of pseudomembranous colitis. Br Med J. 1978;1:695.
- Barbut F, Corthier G, Charpak Y, Cerf M, Monteil H, Fosse T, et al. Prevalence and pathogenicity of *Clostridium difficile* in hospitalized patients. A French multicenter study. Arch Intern Med. 1996;156:1449-54.
- Asha NJ, Tompkins D, Wilcox MH. Comparative analysis of prevalence, risk factors, and molecular epidemiology of antibiotic-associated diarrhea due to *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, and *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 2006;44:2785-91.
- Wilcox MH, Mooney L, Bendall R, Settle CD, Fawley WN. A case-control study of community-associated *Clostridium difficile* infection. J Antimicrob Chemother. 2008;62:388-96.
- Otero W. Enfermedad asociada a *Clostridium difficile*: nuevas amenazas de un viejo enemigo. En: Sánchez ALCJE, ed. *Clostridium difficile* associated disease: New threats of an old foe. Rev Col Gastroenterol. 2008. p. 142-59.
- 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:S24-8.
- Donskey CJ. The role of the intestinal tract as a reservoir and source for transmission of nosocomial pathogens. Clin Infect Dis. 2004;39:219-26.
- Rifkin GD, Silva J Jr, Fekety R. Gastrointestinal and systemic toxicity of fecal extracts from hamsters with clindamycin-induced colitis. Gastroenterology. 1978;74:52-7.
- Humphrey CD, Condon CW, Cantey JR, Pittman FE. Partial purification of a toxin found in hamsters with antibiotic-associated colitis. Reversible binding of the toxin by cholestyramine. Gastroenterology. 1979;76:468-76.
- Taylor NS, Thorne GM, Bartlett JG. Comparison of two toxins produced by *Clostridium difficile*. Infect Immun. 1981;34:1036-43.
- Banno Y, Kobayashi T, Kono H, Watanabe K, Ueno K, Nozawa Y. Biochemical characterization and biologic actions of two toxins (D-1 and D-2) from *Clostridium difficile*. Rev Infect Dis. 1984;6 Suppl 1:S11-20.
- Riegler M, Sedivy R, Pothoulakis C, Hamilton G, Zacherl J, Bischof G, et al. *Clostridium difficile* toxin B is more potent than toxin A in damaging human colonic epithelium *in vitro*. J Clin Invest. 1995;95:2004-11.
- Hurley BW, Nguyen CC. The spectrum of pseudomembranous enterocolitis and antibiotic-associated diarrhea. Arch Intern Med. 2002;162:2177-84.
- Hundsberger T, Braun V, Weidmann M, Leukel P, Sauerborn M, Von Eichel-Streiber C. Transcription analysis of the genes tcdA-E of the pathogenicity locus of *Clostridium difficile*. Eur J Biochem. 1997;244:735-42.
- Dupuy B, Govind R, Antunes A, Matamouros S. *Clostridium difficile* toxin synthesis is negatively regulated by TcdC. J Med Microbiol. 2008;57(Pt 6):685-9.
- Kim SJ, Kim H, Seo Y, Yong D, Jeong SH, Chong Y, et al. Molecular characterization of toxin A-negative, toxin B-positive variant strains of *Clostridium difficile* isolated in Korea. Diagn Microbiol Infect Dis. 2010;67:198-201.
- Rupnik M, Wilcox MH, Gerding DN. *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. Nat Rev Microbiol. 2009;7:526-36.
- Na X, Kim H, Moyer MP, Pothoulakis C, LaMont JT. gp96 is a human colonocyte plasma membrane binding protein for *Clostridium difficile* toxin A. Infect Immun. 2008;76:2862-71.
- Biel FJ. Diarrea por *Clostridium difficile*. *Clostridium difficile*-associated diarrhea. Gastroenterol. Latinoam;2010;2:260-7.
- Kim K, Pickering LK, DuPont HL, Sullivan N, Wilkins T. *In vitro* and *in vivo* neutralizing activity of human colostrum and milk against purified toxins A and B of *Clostridium difficile*. J Infect Dis. 1984;150:57-62.
- Chang TW, Sullivan NM, Wilkins TD. Insusceptibility of fetal intestinal mucosa and fetal cells to *Clostridium difficile* toxins. Zhongguo Yao Li Xue Bao. 1986;7:448-53.
- Lyerly DM, Krivan HC, Wilkins TD. *Clostridium difficile*: its disease and toxins. Clin Microbiol Rev. 1988;1:1-18.
- Eglow R, Pothoulakis C, Itzkowitz S, Israel EJ, O'Keane CJ, Gong D, et al. Diminished *Clostridium difficile* toxin A sensitivity in newborn rabbit ileum is associated with decreased toxin A receptor. J Clin Invest. 1992;90:822-9.
- Pépin J, Valiquette L, Alary ME, Villemure P, Pelletier A, Forget K, et al. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity. CMAJ. 2004;171:466-72.
- Loo VG, Poirier L, Miller MA, Oughton M, Libman MD, Michaud S, et al. A predominantly clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality. N Engl J Med. 2005;353:2442-9.
- Labbé AC, Poirier L, Maccannell D, Louie T, Savoie M, Béliveau C, et al. *Clostridium difficile* infections in a Canadian tertiary care hospital before and during a regional epidemic associated with the BI/NAP1/027 strain. Antimicrob Agents Chemother. 2008;52:3180-7.
- Kuijper EJ, Coignard B, Tüll P; ESCMID Study Group for *Clostridium difficile*; EU Member States; European Centre for Disease Prevention and Control. Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe. Clin Microbiol Infect. 2006;12 Suppl 6:2-18.
- MacCannell DR, Louie TJ, Gregson DB, Laverdiere M, Labbe AC, Laing F, et al. Molecular analysis of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 isolates from Eastern and Western Canada. J Clin Microbiol. 2006;44:2147-52.
- Warny M, Pépin J, Fang A, Killgore G, Thompson A, Brazier J, et al. Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. Lancet. 2005;366:1079-84.

35. Stubbs S, Rupnik M, Gibert M, Brazier J, Duerden B, Popoff M. Production of actin-specific ADP-ribosyltransferase (binary toxin) by strains of *Clostridium difficile*. FEMS Microbiol Lett. 2000;186:307-12.
36. Carter GP, Lyras D, Allen DL, Mackin KE, Howarth PM, O'Connor JR, et al. Binary toxin production in *Clostridium difficile* is regulated by CdtR, a LytTR family response regulator. J Bacteriol. 2007;189:7290-301.
37. McDonald LC, Killgore GE, Thompson A, Owens RC Jr, Kazakova SV, Sambol SP, et al. An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. N Engl J Med. 2005;353:2433-41.
38. Kuijper EJ, Van den Berg RJ, Debast S, Visser CE, Veenendaal D, Troelstra A, et al. *Clostridium difficile* ribotype 027, toxinotype III, the Netherlands. Emerg Infect Dis. 2006;12:827-30.
39. Muto CA, Pokrywka M, Shutt K, Mendelsohn AB, Nouri K, Posey K, et al. A large outbreak of *Clostridium difficile*-associated disease with an unexpected proportion of deaths and colectomies at a teaching hospital following increased fluoroquinolone use. Infect Control Hosp Epidemiol. 2005;26:273-80.
40. Fawley WN, Underwood S, Freeman J, Baines SD, Saxton K, Stephenson K, et al. Efficacy of hospital cleaning agents and germicides against epidemic *Clostridium difficile* strains. Infect Control Hosp Epidemiol. 2007;28:920-5.
41. Kochanek KD, Xu J, Murphy SL, Miniño AM, Kung HC. Deaths: Preliminary data for 2009. National vital statistics reports; vol 59 no 4. Hyattsville, MD: National Center for Health Statistics. 2011.
42. Arnold A, Pope C, Bray S, Riley P, Breathnach A, Krishna S, et al. Prospective assessment of two-stage testing for *Clostridium difficile*. J Hosp Infect. 2010;76:18-22.
43. Cohen SH, Gerding DN, Johnson S, Kelly CP, Loo VG, McDonald LC, et al; Society for Healthcare Epidemiology of America; Infectious Diseases Society of America. Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults: 2010 update by the society for healthcare epidemiology of America (SHEA) and the infectious diseases society of America (IDSA). Infect Control Hosp Epidemiol. 2010;31:431-55.
44. Kim J, Smathers SA, Prasad P, Leckerman KH, Coffin S, Zaoutis T. Epidemiological features of *Clostridium difficile*-associated disease among inpatients at children's hospitals in the United States, 2001-2006. Pediatrics. 2008;122:1266-70.
45. McFarland LV. Update on the changing epidemiology of *Clostridium difficile*-associated disease. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol. 2008;5:40-8.
46. Stubbs SL, Brazier JS, O'Neill GL, Duerden BI. PCR targeted to the 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region of *Clostridium difficile* and construction of a library consisting of 116 different PCR ribotypes. J Clin Microbiol. 1999;37:461-3.
47. Borgmann S, Kist M, Jakobiak T, Reil M, Scholz E, Von Eichel-Streiber C, et al. Increased number of *Clostridium difficile* infections and prevalence of *Clostridium difficile* PCR ribotype 001 in southern Germany. Euro Surveill. 2008;13. pii: 19057.
48. Drudy D, Fanning S, Kyne L. Toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile*. Int J Infect Dis. 2007;11:5-10.
49. Goorhuis A, Legaria MC, Van den Berg RJ, Harmanus C, Klaassen CH, Brazier JS, et al. Application of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis to determine clonal spread of toxin A-negative *Clostridium difficile* in a general hospital in Buenos Aires, Argentina. Clin Microbiol Infect. 2009;15:1080-6.
50. Goorhuis A, Bakker D, Corver J, Debast SB, Harmanus C, Notermans DW, et al. Emergence of *Clostridium difficile* infection due to a new hypervirulent strain, polymerase chain reaction ribotype 078. Clin Infect Dis. 2008;47:1162-70.
51. Ruiz MA, Altamirano P, Rodríguez E, Gamboa MM. *Clostridium perfringens* y *Clostridium difficile* como agentes etiológicos de diarrea nosocomial asociada a antibióticos en niños costarricenses. Rev Biomed. 2007; 18:81-7
52. Zumbado-Salas R, Gamboa-Coronado Mdel M, Rodríguez-Cavallini E, Chaves-Olarte E. *Clostridium difficile* in adult patients with nosocomial diarrhea in a Costa Rican hospital. Am J Trop Med Hyg. 2008;79:164-5.
53. Quesada-Gómez C, Rodríguez C, Gamboa-Coronado Mdel M, Rodríguez-Cavallini E, Du T, Mulvey MR, et al. Emergence of *Clostridium difficile* NAP1 in Latin America. J Clin Microbiol. 2010;48:669-70.
54. Souza Dias MB, Yamashiro J, Borrasca VL, Stempluk VA, Araújo MR, Costa SF, et al. Pseudo-outbreak of *Clostridium difficile* associated diarrhea (CDAD) in a tertiary-care hospital. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2010;52:133-7.
55. Marcon AP, Gamba MA, Vianna LA. Nosocomial diarrhea in the intensive care unit. Braz J Infect Dis. 2006;10:384-9.
56. Balassiano IT, Dos Santos-Filho J, Vital-Brazil JM, Nouér SA, Souza CR, Brazier JS, et al. Detection of cross-infection associated to a Brazilian PCR-ribotype of *Clostridium difficile* in a university hospital in Rio de Janeiro, Brazil. Antonie Van Leeuwenhoek. 2011;99:249-55.
57. Balassiano IT, Dos Santos-Filho J, De Oliveira MP, Ramos MC, Japiassu AM, Dos Reis AM, et al. An outbreak case of *Clostridium difficile*-associated diarrhea among elderly inpatients of an intensive care unit of a tertiary hospital in Rio de Janeiro, Brazil. Diagn Microbiol Infect Dis. 2010;68:449-55.
58. Legaria MC, Lumelsky G, Rosetti S. *Clostridium difficile*-associated diarrhea from a general hospital in Argentina. Anaerobe. 2003;9:113-6.
59. Gardilic M, Fica A, Chang M, Llanos C, Luzoro A. Diarrea asociada a *Clostridium difficile* en un hospital de adultos. Estudio descriptivo. Rev Chil Infect. 2000. p. 307-12.
60. Grille P, Olano E, Bertullo H, Bagnulo H. Estudio sobre diarrea en una unidad de cuidados intensivos quirúrgica. Rev Med Urug. 2006. p. 136-42.
61. Willingham FF, Ticona Chavez E, Taylor DN, Bowen AB, Crane AR, Gottlieb AL, et al. Diarrhea and *Clostridium difficile* infection in Latin American patients with AIDS. Working Group on AIDS in Peru. Clin Infect Dis. 1998;27:487-93.
62. García C, Samalvides F, Vidal M, Gotuzzo E, Dupont HL. Epidemiology of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a Peruvian tertiary care hospital. Am J Trop Med Hyg. 2007;77:802-5.
63. William OR. Prevalencia de diferentes tipos de colitis en personas adultas mayores. En: González Angélica G-ZM, ed. Prevalence of different types of colitis among the elderly. Rev Col Gastroenterol. 2009. p. 272-8.
64. Becerra MG, Ospina S, Atehortúa SL, Berbesi DY. Factores de riesgo para la infección por *Clostridium difficile*. Infectio; 2011. p. 220-6.
65. Martin-Alva E. Asociación de *Clostridium difficile*, su toxina A y el daño histopatológico en pacientes con diarrea nosocomial. En: Chávez Flora MP, ed. Association of *Clostridium difficile*, its toxin A and histopathological damage in patients with nosocomial diarrhea. Rev Peru Boil. 2007. p. 287-90.
66. Dallal RM, Harbrecht BG, Boujoukas AJ, Sirio CA, Farkas LM, Lee KK, et al. Fulminant *Clostridium difficile*: an underappreciated and increasing cause of death and complications. Ann Surg. 2002;235:363-72.
67. Al-Abad YA, Gray EA, Rothnie ND. Outcomes of emergency colectomy for fulminant *Clostridium difficile* colitis. Surgeon. 2010;8:330-3.
68. Barbut F, Richard A, Hamadi K, Chomette V, Burghoffer B, Petit JC. Epidemiology of recurrences or reinfections of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. J Clin Microbiol. 2000;38:2386-8.
69. García-Lechuz JM, Hernangómez S, Juan RS, Peláez T, Alcalá L, Bouza E. Extra-intestinal infections caused by *Clostridium difficile*. Clin Microbiol Infect. 2001;7:453-7.
70. Lee NY, Huang YT, Hsueh PR, Ko WC. *Clostridium difficile* bacteremia, Taiwan. Emerg Infect Dis. 2010;16:1204-10.

71. Small JD. Fatal enterocolitis in hamsters given lincomycin hydrochloride. *Lab Anim Care*. 1968;18:411-20.
72. Bartlett JG, Onderdonk AB, Cisneros RL. Clindamycin-associated colitis in hamsters: protection with vancomycin. *Gastroenterology*. 1977;73(4 Pt 1):772-6.
73. Bartlett JG, Chang TW, Moon N, Onderdonk AB. Antibiotic-induced lethal enterocolitis in hamsters: studies with eleven agents and evidence to support the pathogenic role of toxin-producing Clostridia. *Am J Vet Res*. 1978;39:1525-30.
74. Allo M, Silva J Jr, Fekety R, Rifkin GD, Waskin H. Prevention of clindamycin-induced colitis in hamsters by *Clostridium sordellii* antitoxin. *Gastroenterology*. 1979;76:351-5.
75. Pierce PF Jr, Wilson R, Silva J Jr, Garagusi VF, Rifkin GD, Fekety R, et al. Antibiotic-associated pseudomembranous colitis: an epidemiologic investigation of a cluster of cases. *J Infect Dis*. 1982;145:269-74.
76. Rocca JM, Pieterse AS, Rowland R, Hecker R, Rich GE. *Clostridium difficile* colitis. *Aust N Z J Med*. 1984;14:606-10.
77. Silva J, Fekety R, Werk C, Ebright J, Cudmore M, Batts D, et al. Inciting and etiologic agents of colitis. *Rev Infect Dis*. 1984;6 Suppl 1:S214-21.
78. Warny M, Vaerman JP, Avesani V, Delmée M. Human antibody response to *Clostridium difficile* toxin A in relation to clinical course of infection. *Infect Immun*. 1994;62:384-9.
79. Kyne L, Warny M, Qamar A, Kelly CP. Asymptomatic carriage of *Clostridium difficile* and serum levels of IgG antibody against toxin A. *N Engl J Med*. 2000;342:390-7.
80. Kyne L, Warny M, Qamar A, Kelly CP. Association between antibody response to toxin A and protection against recurrent *Clostridium difficile* diarrhoea. *Lancet*. 2001;357:189-93.
81. Karas JA, Enoch DA, Aliyu SH. A review of mortality due to *Clostridium difficile* infection. *J Infect*. 2010;61:1-8.
82. McFarland LV, Mulligan ME, Kwok RY, Stamm WE. Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* infection. *N Engl J Med*. 1989;320:204-10.
83. Kaatz GW, Gitlin SD, Schaberg DR, Wilson KH, Kauffman CA, Seo SM, et al. Acquisition of *Clostridium difficile* from the hospital environment. *Am J Epidemiol*. 1988;127:1289-94.
84. Fekety R, Kim KH, Brown D, Batts DH, Cudmore M, Silva J Jr. Epidemiology of antibiotic-associated colitis; isolation of *Clostridium difficile* from the hospital environment. *Am J Med*. 1981;70:906-8.
85. Rupnik M. Is *Clostridium difficile*-associated infection a potentially zoonotic and foodborne disease? *Clin Microbiol Infect*. 2007;13:457-9.
86. Songer JG, Anderson MA. *Clostridium difficile*: an important pathogen of food animals. *Anaerobe*. 2006;12:1-4.
87. Rodríguez-Palacios A, Stämpfli HR, Duffield T, Peregrine AS, Trotz-Williams LA, Arroyo LG, et al. *Clostridium difficile* PCR ribotypes in calves, Canada. *Emerg Infect Dis*. 2006;12:1730-6.
88. Keel K, Brazier JS, Post KW, Weese S, Songer JG. Prevalence of PCR ribotypes among *Clostridium difficile* isolates from pigs, calves, and other species. *J Clin Microbiol*. 2007;45:1963-4.
89. Wren M. *Clostridium difficile* isolation and culture techniques. *Methods Mol Biol*. 2010;646:39-52.
90. Tichota-Lee J, Jaqua-Stewart MJ, Benfield D, Simmons JL, Jaqua RA. Effect of age on the sensitivity of cell cultures to *Clostridium difficile* toxin. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1987;8:203-14.
91. George WL, Sutter VL, Citron D, Finegold SM. Selective and differential medium for isolation of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol*. 1979;9:214-9.
92. Jousimies HR, Summanen P, Baron EJ, Citron DM, Wexler HM, Finegold SM. *Wadsworth-KTL anaerobic bacteriology manual*. 6th ed. Belmont, CA: Star Publishing, 2002..
93. Mundy LS, Shanholtzer CJ, Willard KE, Gerding DN, Peterson LR. Laboratory detection of *Clostridium difficile*. A comparison of media and incubation systems. *Am J Clin Pathol*. 1995;103:52-6.
94. Laughon BE, Viscidi RP, Gdovin SL, Yolken RH, Bartlett JG. Enzyme immunoassays for detection of *Clostridium difficile* toxins A and B in fecal specimens. *J Infect Dis*. 1984;149:781-8.
95. Aronsson B, Granström M, Möllby R, Nord CE. Enzyme immunoassay for detection of *Clostridium difficile* toxins A and B in patients with antibiotic-associated diarrhoea and colitis. *Eur J Clin Microbiol*. 1985;4:102-7.
96. Herrera-Cáceres JO, Camacho-Ortiz A, Galindo-Fraga A, Hernández-Durán M, Cordero-Rangel A, Hernández-Cruz A, et al. Concordance between two enzyme immunoassays for the detection of *Clostridium difficile* toxins. *Arch Med Res*. 2010;41:92-6.
97. Lyerly DM, Wilkins TD. Commercial latex test for *Clostridium difficile* toxin A does not detect toxin A. *J Clin Microbiol*. 1986;23:622-3.
98. Lyerly DM, Barroso LA, Wilkins TD. Identification of the latex test-reactive protein of *Clostridium difficile* as glutamate dehydrogenase. *J Clin Microbiol*. 1991;29:2639-42.
99. Kato N, Ou CY, Kato H, Bartley SL, Brown VK, Dowell VR Jr, et al. Identification of toxigenic *Clostridium difficile* by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1991;29:33-7.
100. McMillin DE, Muldrow LL, Lagette SJ. Simultaneous detection of toxin A and toxin B genetic determinants of *Clostridium difficile* using the multiplex polymerase chain reaction. *Can J Microbiol*. 1992;38:81-3.
101. Wren B, Clayton C, Tabaqchali S. Rapid identification of toxigenic *Clostridium difficile* by polymerase chain reaction. *Lancet*. 1990;335:423.
102. Gal M, Northey G, Brazier JS. A modified pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) protocol for subtyping previously non-PFGE typeable isolates of *Clostridium difficile* polymerase chain reaction ribotype 001. *J Hosp Infect*. 2005;61:231-6.
103. Janezic S, Rupnik M. Molecular typing methods for *Clostridium difficile*: pulsed-field gel electrophoresis and PCR ribotyping. *Methods Mol Biol*. 2010;646:55-65.
104. Clabots CR, Johnson S, Bettin KM, Mathie PA, Mulligan ME, Schaberg DR, et al. Development of a rapid and efficient restriction endonuclease analysis typing system for *Clostridium difficile* and correlation with other typing systems. *J Clin Microbiol*. 1993;31:1870-5.
105. Rupnik M, Avesani V, Janc M, Von Eichel-Streiber C, Delmée M. A novel toxinotyping scheme and correlation of toxinotypes with serogroups of *Clostridium difficile* isolates. *J Clin Microbiol*. 1998;36:2240-7.
106. Marsh JW, O'Leary MM, Shutt KA, Sambol SP, Johnson S, Gerding DN, et al. Multilocus variable-number tandem-repeat analysis and multilocus sequence typing reveal genetic relationships among *Clostridium difficile* isolates genotyped by restriction endonuclease analysis. *J Clin Microbiol*. 2010;48:412-8.
107. Huang H, Wu S, Wang M, Zhang Y, Fang H, Palmgren AC, et al. *Clostridium difficile* infections in a Shanghai hospital: antimicrobial resistance, toxin profiles and ribotypes. *Int J Antimicrob Agents*. 2009;33:339-42.
108. Goldenberg SD, Dieringer T, French GL. Detection of toxigenic *Clostridium difficile* in diarrheal stools by rapid real-time polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010;67:304-7.
109. De Boer RF, Wijma JJ, Schuurman T, Moedt J, Dijk-Alberts BG, Ott A, et al. Evaluation of a rapid molecular screening approach for the detection of toxigenic *Clostridium difficile* in general and subsequent identification of the tcdC  $\Delta$ 117 mutation in human stools. *J Microbiol Methods*. 2010;83:59-65.
110. Bidet P, Lalande V, Salauze B, Burghoffer B, Avesani V, Delmée M, et al. Comparison of PCR-ribotyping, arbitrarily primed PCR, and pulsed-field gel electrophoresis for typing *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol*. 2000;38:2484-7.
111. Killgore G, Thompson A, Johnson S, Brazier J, Kuijper E, Pépin J, et al. Comparison of seven techniques for typing international epidemic strains of *Clostridium difficile*: restriction

- endonuclease analysis, pulsed-field gel electrophoresis, PCR-ribotyping, multilocus sequence typing, multilocus variable-number tandem-repeat analysis, amplified fragment length polymorphism, and surface layer protein A gene sequence typing. *J Clin Microbiol.* 2008;46:431-7.
112. Kujper EJ, Van den Berg RJ, Brazier JS. Comparison of molecular typing methods applied to *Clostridium difficile*. *Methods Mol Biol.* 2009;551:159-71.
113. Kujper EJ, Oudbier JH, Stuijbergen WN, Jansz A, Zanen HC. Application of whole-cell DNA restriction endonuclease profiles to the epidemiology of *Clostridium difficile*-induced diarrhea. *J Clin Microbiol.* 1987;25:751-3.
114. Marsh JW, O'Leary MM, Shutt KA, Pasculle AW, Johnson S, Gerding DN, et al. Multilocus variable-number tandem-repeat analysis for investigation of *Clostridium difficile* transmission in hospitals. *J Clin Microbiol.* 2006;44:2558-66.
115. Bidet P, Barbut F, Lalande V, Burghoffer B, Petit JC. Development of a new PCR-ribotyping method for *Clostridium difficile* based on ribosomal RNA gene sequencing. *FEMS Microbiol Lett.* 1999;175:261-6.
116. Burdon DW, Brown JD, Youngs DJ, Arabi Y, Shinagawa N, Alexander-Williams J, et al. Antibiotic susceptibility of *Clostridium difficile*. *J Antimicrob Chemother.* 1979;5:307-10.
117. Fekety R, Silva J, Armstrong J, Allo M, Browne R, Ebright J, et al. Treatment of antibiotic-associated enterocolitis with vancomycin. *Rev Infect Dis.* 1981;3 suppl:5273-81.
118. Teasley DG, Gerding DN, Olson MM, Peterson LR, Gebhard RL, Schwartz MJ, et al. Prospective randomized trial of metronidazole versus vancomycin for *Clostridium difficile*-associated diarrhoea and colitis. *Lancet.* 1983;2:1043-6.
119. Bolton RP, Culshaw MA. Faecal metronidazole concentrations during oral and intravenous therapy for antibiotic associated colitis due to *Clostridium difficile*. *Gut.* 1986;27:1169-72.
120. Aas J, Gessert CE, Bakken JS. Recurrent *Clostridium difficile* colitis: case series involving 18 patients treated with donor stool administered via a nasogastric tube. *Clin Infect Dis.* 2003;36:580-5.
121. Lamontagne F, Labbé AC, Haecck O, Lesur O, Lalancette M, Patiño C, et al. Impact of emergency colectomy on survival of patients with fulminant *Clostridium difficile* colitis during an epidemic caused by a hypervirulent strain. *Ann Surg.* 2007;245:267-72.
122. John R, Brazier JS. Antimicrobial susceptibility of polymerase chain reaction ribotypes of *Clostridium difficile* commonly isolated from symptomatic hospital patients in the UK. *J Hosp Infect.* 2005;61:11-4.
123. Huang H, Weintraub A, Fang H, Wu S, Zhang Y, Nord CE. Antimicrobial susceptibility and heteroresistance in Chinese *Clostridium difficile* strains. *Anaerobe.* 2010;16:633-5.
124. Sánchez AL, Otero W, Caminos JE. Enfermedad asociada a *Clostridium difficile*: nuevas amenazas de un viejo enemigo. *Gastroenterología.* 2009;181.