

## **Epidemiología y perfil de susceptibilidad de *Clostridium difficile* aislado de pacientes hospitalizados con Enfermedad Asociada a *Clostridium difficile* (EACD) en una Clínica de tercer nivel de Medellín**

Zea-Mazo JW<sup>1</sup>, Molina-Colorado DY<sup>1</sup>, Sierra-Viana PM<sup>1,2</sup>, Salazar-González CL<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Grupo de Investigación en Bacterias Anaerobias y Aerobias de Importancia Clínica, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

<sup>2</sup> IPS Universitaria, Medellín, Colombia.

### **RESUMEN**

**Introducción:** *C. difficile* es un bacilo gram positivo anaerobio capaz de formar esporas que le permiten sobrevivir en aguas, suelos y en ambientes hospitalarios. Su transmisión por vía fecal-oral convierte al personal de la salud, objetos médicos y superficies infectadas en una importante fuente de infección intrahospitalaria.

**Metodología:** estudio transversal, que incluyó 133 pacientes con sospecha clínica de EACD, hospitalizados en la IPS Universitaria Clínica León XIII de Medellín, a los cuales se les examinó la materia fecal para detección de toxinas A&B, cultivo anaerobio y pruebas de sensibilidad a *C. difficile*. Para la comparación de estos resultados con las variables demográficas y clínicas del estudio se emplearon análisis univariados a través de medidas de frecuencias y de resumen, mientras que para el análisis bivariado se emplearon chi cuadrado o test exacto de Fischer y prueba U de Mann Whitney, con un nivel de significación del 0,05.

**Resultados:** de los 133 pacientes evaluados se encontraron 14 (10,5%) positivos para *C. difficile* por toxina A&B, mientras que 12 (9,0%) fueron positivos para cultivo; sólo 7 (5,25%) fueron positivos por ambas técnicas. Con respecto a la toxina se encontraron diferencias estadísticamente significativas con el tratamiento durante la estancia hospitalaria con Metronidazol. En cuanto al resultado del cultivo anaerobio para *C. difficile*, se encontraron diferencias estadísticamente significativas con el tratamiento durante la estancia hospitalaria con glicopéptidos, implementación de enema y tratamiento con quino/fluoroquinolonas y lincosamidas en la hospitalización previa en la Institución.

Los aislamientos de *C. difficile* fueron sensibles a Metronidazol y Vancomicina, con una MIC de 0,064 - 2,0 ug/mL y 0,125 - 1,0 ug/mL, respectivamente.

**Conclusiones:** se observó una baja frecuencia de EACD mediante toxina A&B y cultivo en comparación con otros estudios, además se encontraron diferencias estadísticamente significativas con antibióticos como metronidazol, glicopéptidos, quino/fluoroquinolonas y lincosamidas, e implementación de enema. Es necesario continuar evaluando la frecuencia de la enfermedad en Colombia y complementar con un análisis molecular que permita identificar los genes y el ribotipo circulante.

**Palabras claves:** *Clostridium difficile*, Enfermedad Asociada a *Clostridium difficile*, diarrea asociada a *Clostridium difficile*, colitis pseudomembranosa, diarrea asociada al cuidado de la salud.

## INTRODUCCIÓN

*Clostridium difficile* es un bacilo gram positivo, anaerobio estricto, algunas cepas no patógenas pueden hacer parte de la microbiota fecal humana, tiene la capacidad de formar esporas que le permiten su supervivencia en aguas, suelos y en ambientes hospitalarios, donde puede permanecer viables hasta por varios años (1, 2). Su transmisión por vía fecal-oral convierte al personal de la salud, objetos médicos y superficies contaminadas en una importante fuente de infección intrahospitalaria (1, 2).

Una vez *C. difficile* se establece a nivel del colon, previa alteración del nicho intestinal por antibióticos, las esporas comienzan a germinar y las formas vegetativas expresan el principal factor de virulencia que es la producción de dos clases de toxinas; una enterotoxina TcdA y una citotoxina TcdB, que en general pueden causar permeabilidad vascular, acumulación de líquidos y de células inflamatorias a través de la activación de la respuesta inmune, hemorragia y destrucción del enterocito (3-5) llevando a un espectro de enfermedades intestinales que van desde diarrea, colitis pseudomembranosa y megacolon tóxico; para referirse a alguna de ellas es frecuente utilizar la expresión Enfermedad Asociada a *Clostridium difficile* EACD. Cabe aclarar que las cepas de *C. difficile* que no producen toxinas no son patógenas (6) y que no todos los pacientes colonizados desarrollan EACD, de hecho, algunos adultos sanos son usualmente resistentes a la colonización por cepas tóxicas (7).

Aproximadamente el 20-30% de todos los casos de diarrea asociada a antibióticos han sido atribuidos a *C. difficile*, siendo considerado el principal agente infeccioso de la diarrea asociada al cuidado de la salud (8). Además se considera responsable del 90 a 100% de casos de colitis pseudomembranosa (CSM), donde la población más susceptible son los ancianos mayores de 65 años (9-11). Según el Centro para el Control de Enfermedades (CDC) de Atlanta, en el 2009 este tipo de enterocolitis fue la causa número 19 de muerte en la población mayor de 65 años, con una tasa de mortalidad ajustada a la edad de 2.2 (4.3%) por 100.000 personas (12).

El principal factor de riesgo relacionado con la enfermedad asociada a *C. difficile* (EACD) es la terapia prolongada con antibióticos de amplio espectro, como betalactámicos, aminoglicósidos y quinolonas, los cuales eliminan la microbiota residente endógena y permiten la selección de los agentes patógenos (13, 14). Otros factores de riesgo se encuentran también relacionados con el desarrollo de EACD, como la edad mayor a 65 años, estancia prolongada en hospitales, inmunosupresión, entre otros estados donde el sistema inmune se encuentra comprometido y con dificultades para responder a la acción de las toxinas de *C. difficile* (1, 5, 7, 10).

A partir del 2002, se empezó a reportar un aumento significativo de casos de EACD en América del norte y posteriormente en Europa, causado por una cepa *C. difficile* denominada BI/NAP1/027/toxinotipo III, la cual presenta mayor producción de toxinas y resistencia a las fluoroquinolonas (2, 15-19). 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 (20). En Latinoamérica, la cepa NAP1 ha sido encontrada sólo en Costa Rica, en un centro hospitalario de este país con una prevalencia del 54% del total de los aislamientos (21, 22).

En Colombia se han publicado solamente tres estudios acerca de este tema, Becerra MG, *et al.* 2011, estudió los principales factores clínicos y epidemiológicos asociados al desarrollo de EACD en el Hospital Universitario de San Vicente Fundación (23), mientras que en el 2008 Otero-Rengino W., actualizó sobre la epidemiología, patogénesis y tratamiento de la infección por *C. difficile* (24), y en el 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 (25).

La resistencia de *C. difficile* a los antimicrobianos varía entre países, siendo más frecuentes la resistencia a clindamicina, eritromicina y a las fluoroquinolonas principalmente (26, 27); se ha reportado que la mayoría de los aislamientos son susceptibles Metronidazol y vancomicina (28), sin embargo, Brazier JS. *et al.* (2001), ha reportado resistencia de *C. difficile* a Metronidazol en el Reino Unido (29).

En Colombia se emplea como tratamiento antimicrobiano estándar el metronidazol y la vancomicina; sin embargo, se desconoce el comportamiento de estos agentes frente a las cepas de *C. difficile* que circulan actualmente en el país.

Considerando la falta de información y la importancia de caracterizar las cepas de *C. difficile* circulantes en el medio, en la presente investigación se evaluó la frecuencia del microorganismo tanto por la determinación de sus toxinas como por el cultivo anaerobio, el perfil de susceptibilidad, y su comparación con los determinantes demográficos y clínicos de los pacientes hospitalizados con EACD en la IPS Universitaria Clínica León XIII durante agosto de 2011 a agosto de 2012.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Evaluar la frecuencia de *C. difficile* tanto por la determinación de sus toxinas como por el cultivo anaerobio, el perfil de susceptibilidad, y su comparación con los determinantes demográficos y clínicos de los pacientes hospitalizados en una clínica de tercer nivel de Medellín.

### **Objetivos específicos**

1. Describir las características demográficas y clínicas de los pacientes en estudio.
2. Establecer la frecuencia de *C. difficile* en el grupo de estudio.
3. Comparar los factores de riesgo para EACD descritos en la literatura con los resultados de los pacientes positivos para *C. difficile*.
4. Evaluar el perfil de resistencia al Metronidazol y a Vancomicina de las cepas de *C. difficile* aisladas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Tipo de estudio:** estudio transversal

**Población de Estudio:** pacientes hospitalizados en la IPS Universitaria Clínica León XIII de Medellín, durante agosto de 2011 y agosto de 2012, con sospecha clínica de EACD (8) a quienes el médico ordenó la detección de toxina A&B en materia fecal. La institución es una clínica de alto nivel de complejidad que cuenta con un aproximado de 635 camas.

**Criterios de inclusión:** se incluyeron en el estudio pacientes que cumplieran con los siguientes criterios (9): pacientes mayores de 18 años, con sospecha clínica de EACD (diarrea, colitis pseudomembranosa o colitis fulminante), que los signos y síntomas se hayan presentado 48 horas después del ingreso a la institución y cuyo tratamiento durante su hospitalización haya sido con al menos un antibiótico.

**Criterios de exclusión:** fueron excluidos del estudio los pacientes que presentaron recurrencias de EACD después de haber sido captado inicialmente en el estudio, pacientes remitidos de otras instituciones y pacientes cuyas muestras no cumplieran con los requisitos de recolección y transporte adecuados.

**Tamaño muestral y muestreo:** mediante EPIDAT versión 3.0 el tamaño de la muestra fue 133 pacientes, considerando el número de toxinas A&B de *C. difficile* anteriormente ordenadas durante el año 2010 en la IPS Universitaria Clínica León XIII (total = 175 pacientes), una proporción del evento esperada del 50%, una precisión del 5%, un nivel de confianza del 95% y un margen de seguridad del 10% por posibles pérdidas. Se realizó un muestreo no probabilístico por conveniencia, entre agosto de 2011 y agosto de 2012.

**Recolección y transporte de muestras:** las muestras de materia fecal fueron recolectadas y transportadas inmediatamente al laboratorio de bacteriología anaerobia en un recipiente tapa rosca y de boca ancha, aceptando una cantidad mínima de 1mg para heces sólidas y 1mL para heces líquidas o semisólidas. En caso de no haber sido procesadas inmediatamente para el cultivo anaerobio fueron conservadas hasta 3 días a 2 - 8°C, o -25 ± 6°C durante un mes.

**Cultivo anaerobio e identificación de *C. difficile*:** para el cultivo de la materia fecal y el aislamiento de *C. difficile* se utilizó el medio selectivo fructosa-cicloserina-cefoxitin (CCFA), la siembra se realizó por el método cuantitativo en diluciones seriadas 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-3</sup> y 10<sup>-5</sup> utilizando como diluyente una solución de extracto de levadura al 0,05% e incubando en atmósfera de anaerobiosis a 35°C hasta por 5 días, según el protocolo descrito en el manual de bacteriología anaerobia Waswort-KTL (30). Los cultivos fueron examinados diariamente para observar colonias presuntivas de *C. difficile* con características macroscópicas como fluorescencia verde amarilla bajo la luz ultravioleta, textura mate, planas,

grandes e irregulares y con olor a “establo de caballo”. La identificación confirmatoria se realizó mediante pruebas de indol negativo, L-prolina-aminopeptidasa positiva, tinción de Gram y métodos comerciales de identificación para cepas dudosas (API 20 A® BioMerieux, France) (30). Los cultivos sin crecimiento de *C. difficile* permanecieron en incubación hasta un máximo de 5 días.

**Detección de toxinas A y B de *C. difficile*:** se realizó mediante la prueba ImmunoCard® Toxins A&B (Meridian Bioscience), ensayo inmunoenzimático (EIA) de flujo horizontal que permite la detección de las toxinas A y B de *Clostridium difficile* en materia fecal humana, siguiendo las instrucciones del fabricante. Como control de calidad, el kit emplea un control interno de la prueba que se corre por cada muestra procesada.

**Pruebas de susceptibilidad:** se determinó la concentración Inhibitoria mínima (MIC) de vancomicina y metronidazol mediante la técnica dilución en agar (31). Para la interpretación de la MIC de Metronidazol y Vancomicina, se emplearon los puntos de corte establecidos en la CLSI (32) y en el EUCAST (33), respectivamente. Como control de calidad para el cultivo y las pruebas de susceptibilidad se utilizó la cepa de *C. difficile* ATCC 700057.

**Variables clínicas y demográficas:** se recolectaron variables demográficas como edad, sexo y sistema de afiliación. Dentro de las variables clínicas más relevantes para el estudio, se encuentran el diagnóstico al momento del ingreso a la institución, diagnósticos posteriores al ingreso, fecha de ingreso, fecha y motivo de egreso, días de estancia hospitalaria, hospitalización en UCI, número y nombre de antimicrobianos recibidos, otros factores predisponentes para el desarrollo de EACD, datos de la última hospitalización en la institución, datos de la EACD que presenta el paciente y resultados microbiológicos del análisis de la materia fecal.

**Plan de recolección de la información demográfica y clínica:** la recolección de los datos se realizó a través de la revisión de historias clínicas y posterior diligenciamiento de la ficha de recolección de información, previa autorización por el comité de bioética de la clínica. Los datos recolectados fueron ingresados en una base de datos en Microsoft Excel (Microsoft Office 2007).

**Plan de análisis:** se determinaron frecuencias absolutas y relativas para las variables cualitativas y medidas de resumen para las variables cuantitativas. Para el análisis entre variables cualitativas se estimaron los intervalos de confianza, chi cuadrado o test exacto de Fischer, para el análisis entre variables cualitativas y cuantitativas se utilizó Prueba U de Mann Whitney según el cumplimiento del supuesto de normalidad determinado con la prueba de Kolmogorov-Smirnov o Shapiro-Wilks. El análisis estadístico se evaluó con un nivel de significación del 0,05. El análisis de la información se realizó en el programa SPSS® versión 19.0 para Windows (SPSS Inc.-Chicago, ILL).

## RESULTADOS

### Descripción de la población de estudio

En la tabla 1 se describen las principales características demográficas y clínicas los 133 pacientes con sospecha clínica de EACD.

Tabla 1. Variables demográficas y clínicas de pacientes con sospecha de EACD	
Sexo	51,1% hombres (n= 68)
Me edad	70 años (RI 57 - 81)
Me estancia hospitalaria	23 días (RI 13 - 43)
Me estancia hospitalaria antes de la recolección de la muestra	10 días (RI 5 - 20)
Estancia en UCI	16,7% (n= 22)
Me estancia en UCI	11 días (RI 5 - 30)
Me estancia en UCI antes de la recolección de la muestra	5,5 días (RI 3,25 – 12,5)
Causa de egreso	Mejoría 77,9%
	Muerte 18,3%

De esos 133 pacientes evaluados, el 82,7% (n= 110) de ellos desarrollaron colitis simple, de los cuales el 78,2% (n= 104) presento EACD tipo diarrea aguda. Por laboratorio se encontraron 14 (10,5%) pacientes con toxina A&B positiva, mientras que 12 (9,0%) pacientes con cultivo positivo para *C. difficile*; sólo 7 (5,25%) pacientes fueron positivos para *C. difficile* por ambas técnicas (tabla 2).

Tabla 2. Resultados de Toxina A&B y cultivo anaerobio para *C. difficile*

		Cultivo		Total
		Positivo	Negativo	
Toxina A&B	Positivo	7	7	14
	Negativo	5	114	119
Total		12	121	133

Las principales características demográficas y clínicas de los pacientes positivos para *C. difficile* (19/133) ya sea por determinación de toxina A&B como por cultivo anaerobio se describen en la tabla 3.

Tabla 3. Características demográficas y clínicas de los pacientes positivos para <i>C. difficile</i>		
Sexo		63,2 % hombres (n= 12)
Edad		78 (RI 58 - 82,5)
Diagnostico al ingreso	Enfermedad Intestinal	6 (31,6%)
	Enfermedad Infecciosa	3 (15,8%)
	Enfermedad Cerebro-vascular	3 (15,8%)
Causas de egreso	Mejoría	68,4% (n= 13)
	Muerte	21,0% (n= 4)
Me estancia hospitalaria		30 días (RI 13 - 47,5)
Me estancia hospitalaria antes de la recolección de la muestra		11 días (RI 2,5 - 37,5)
Estancia en UCI		15,8% (n= 3)
Me estancia en UCI		12 días (RI 8,5 - 20)
Me estancia en UCI antes de la recolección de la muestra		12 días (RI 8,5 - 19,5)
Numero de antimicrobianos recibidos	Dos antimicrobianos	42,1% (n=8)
	Más de 2 antimicrobianos	52,6% (n=10)
Antimicrobianos	Betalactámicos/Inhibidores	78,9% (n= 15)
	Glicopéptidos	36,8% (n= 7)
	Quino/fluoroquinolonas	36,8% (n= 7)
	Carbapenem	31,6% (n= 6)
	Metronidazol	31,6% (n= 6)
Factores de riesgo descritos en la literatura	Tratamiento con inhibidores de bomba de protones	63,2% (n= 12)
	Intubación nasogástrica	47,4% (n= 9)
	Enemas	21,0% (n= 4)
	Colonoscopia	21,0% (n= 4)
	Tratamiento esteroideo o inmunosupresor	21,0% (n= 4)
Tipo de inmunosupresión	Diabetes	31,6% (n= 6)
	Cáncer	15,8% (n= 3)
Hospitalización previa en la institución (antes de 1 año)		47,4% (n= 9)
Tratamiento con antimicrobianos en la hospitalización previa		31,6% (n= 6)
Antimicrobianos recibidos en la hospitalización previa	Quino/fluoroquinolonas	21,0% (n= 4)
	Betalactámicos/Inhibidores	15,8% (n= 3)

### **Análisis de factores relacionados al desarrollo de EACD**

Al comparar el resultado de la toxina A&B con las diferentes variables demográficas y clínicas analizadas en el presente estudio, se encontraron diferencias estadísticamente significativas con el tratamiento durante la estancia



hospitalaria con Metronidazol. En cuanto al resultado del cultivo anaerobio para *C. difficile*, se encontraron diferencias estadísticamente significativas con tratamiento durante la estancia hospitalaria con Glicopéptidos, implementación de enema y tratamiento con antibióticos en la última hospitalización previa en la Institución, tales como quino/fluoroquinolonas y lincosamidas (tabla 4).

Tabla 4. Análisis bivariado entre variables demográficas y clínicas y resultados microbiológicos							
Variable		Toxina A & B		$\rho$ .	Cultivo		$\rho$ .
		Positiva Frecuencia	Negativa Frecuencia		Positiva Frecuencia	Negativa Frecuencia	
Antibiótico durante la hospitalización	Cefalosporinas 4° generación	2	2	0,05¶	1	3	0,32¶
	Metronidazol	6	21	0,02*†	2	25	1,0¶
	Glicopéptido	4	30	0,75¶	6	28	0,04*†
Factores predisponentes para EACD	Sonda nasogástrica	8	40	0,08†	5	43	0,75¶
	Enema	3	7	0,07¶	3	7	0,04*¶
	Colonoscopia	4	13	0,08¶	2	15	0,65¶
Antibióticos en la hospitalización previa	Quino/Fluoroquinolonas	3	7	0,09¶	3	7	0,03*¶
	Lincosamidas	1	0	0,05¶	1	0	0,03*¶

\* Diferencias estadísticamente significativas ( $p$ . <0,05); † Chi cuadrado; ¶ Fischer

En cuanto a las variables mencionadas anteriormente, se determinó para cada una la razón de prevalencia (RP) con el fin de determinar la relación que tienen con los pacientes expuestos y no expuestos del estudio (tabla 5). Entre los resultados más importantes se encontró que pacientes con implementación de sonda nasogástrica tienen 2,36 (0,87-6,4) veces más toxina positiva que los que no reciben este tipo de alimentación, paciente con enema tiene 3,35 (1,11-10,09) veces más toxina positiva y 4,1 (1,31-12,7) veces más cultivo positivo que los pacientes que no son tratados con enemas, colonoscopia 2,72 (0,96-7,73) veces más toxina positiva que los pacientes a los cuales no se les realiza colonoscopia.

En cuanto al tratamiento con antibióticos durante la hospitalización y antes de la toma de la muestra, se encontró que los pacientes que son tratados con cefalosporinas de cuarta generación tienen 5,37 (1,76-16,4) y con metronidazol tienen 2,94 (1,11-7,77) veces más toxina positiva que los que no son tratados, y los que son tratados con glicopéptidos tienen 2,91 (1,0-8,4) veces más cultivo positivo que los que no son tratados con vancomicina.

El tratamiento con antibióticos en la hospitalización previa en esta institución antes de un año, se encontró que pacientes tratados con quino/fluoroquinolonas tienen 3,45 (0,91-13,06) veces más de toxina positiva y 6,9 (1,32-36,04) veces más de cultivo positivo, y tratados con lincosamidas tienen 5,42 (1,88-15,6) veces más de

toxina positiva y 7,6 (2,38-24,19) veces más de cultivo positivo en comparación con los pacientes que no son tratados con estos antibióticos.

Variable		Toxina A&B		Cultivo	
		p.	RP (IC)	p.	RP (IC)
Antibiótico durante la hospitalización	Cefalosporinas de cuarta generación	0,05¶	5,37 (1,76-16,4)	0,32¶	2,93 (0,49-17,5)
	Metronidazol	0,02*†	2,94 (1,11 - 7,77)	1,0¶	0,78 (0,18-3,37)
	Glicopéptidos	0,75¶	1,16 (0,39 - 3,47)	0,04*†	2,91 (1,0 - 8,4)
Factores predisponentes para EACD	Sonda nasogástrica	0,08†	2,36 (0,87 - 6,4)	0,75¶	1,17 (0,57 - 2,38)
	Enema	0,07¶	3,35 (1,11 - 10,09)	0,04*¶	4,1 (1,31 - 12,7)
	Colonoscopia	0,08¶	2,72 (0,96 - 7,73)	0,65¶	1,36 (0,32 - 5,7)
Antibióticos en la hospitalización previa	Quino/ Fluoroquinolonas	0,09¶	3,45 (0,91 - 13,06)	0,03*¶	6,9 (1,32 - 36,04)
	Lincosamidas	0,05¶	5,42 (1,88 - 15,6)	0,03*¶	7,6 (2,38 - 24,19)

\* Diferencias estadísticamente significativas ( $p. <0,05$ ); RP Razón de prevalencia; † Chi cuadrado; ¶ Fischer; IC intervalo de confianza 95%

## Pruebas de sensibilidad

Los 12 aislamientos fueron sensibles a metronidazol y vancomicina, con un rango de concentración inhibitoria mínima (MIC) entre 0,064 – 2,0 ug/mL y 0,125 y 1,0 ug/mL, respectivamente (tabla 6).

# Cepa	Resultado Toxina	Metronidazol <sup>1</sup>		Vancomicina <sup>2</sup>	
		MIC (µg/mL)	Interpretación	MIC (µg/mL)	Interpretación
1	Negativa	0,25	Sensible	1,0	Sensible
2	Negativa	0,5	Sensible	0,5	Sensible
3	negativa	0,5	Sensible	0,5	Sensible
4	Positiva	1,0	Sensible	0,25	Sensible
5	Positiva	0,25	Sensible	0,5	Sensible
6	Positiva	2,0	Sensible	1,0	Sensible
7	Negativa	0,064	Sensible	0,125	Sensible
8	Positiva	0,125	Sensible	0,25	Sensible
9	Positiva	0,25	Sensible	0,5	Sensible
10	Positiva	0,125	Sensible	1,0	Sensible
11	Negativa	0,25	Sensible	1,0	Sensible
12	Positiva	0,5	Sensible	1,0	Sensible

1 Punto de corte CLSI para metronidazol S ≤ 8, I 16, R ≥32

2 Punto de corte EUCAST para vancomicina S ≤ 2, R >2

## DISCUSIÓN

En condiciones normales, el tracto gastrointestinal (TGI) del humano posee una microbiota residente, que entre diversas funciones, es responsable resistencia a la colonización por agentes patógenos (34). Sin embargo con el tratamiento con antibióticos de amplio espectro se pueden ocasionar una alteración de esta microbiota, permitiendo que *C. difficile* se multiplique y cause daño a través de la producción de sus toxinas. A nivel mundial se han encontrado relacionados al desarrollo de la EACD antibióticos de amplio espectro como betalactámicos, quinolonas y fluoroquinolonas, y clindamicina (35). Becerra MG, *et al.* (2011), encontró relación con el uso previo de cefalosporinas de tercera generación (23). En el caso del metronidazol, a nivel hospitalario uno de sus usos es para el tratamiento de enfermedades intestinales de presunto origen infeccioso, incluyendo la EACD, por lo cual es evidente la relación de este antibiótico con los pacientes positivos para *C. difficile* en el presente estudio.

Según la literatura, otros factores de riesgo además de los antibióticos estarían relacionados al desarrollo de EACD, tales como la edad mayor a 65 años (10, 11), la estancia prolongada en hospitales, especialmente en centros para personas de tercera edad y en las unidades de cuidados intensivos (UCI), pacientes con enfermedades crónicas severas (renales y hepáticas), estados de inmunosupresión y quimio/radioterapia, drogas citotóxicas, antiácidos, cirugías gastrointestinales y otros procedimientos invasivos en el tracto gastrointestinal (TGI) (1, 5, 10). En la única investigación realizada previamente en Colombia, Becerra MG, *et al.* (2011), obtuvo una relación de la EACD determinada por toxina A y B con factores de riesgo como: edad mayor de 65 años ( $p=0,05$ ), la estancia en UCI ( $p=0,02$ ) y el uso de inhibidores de la bomba de protones ( $p<0,05$ ) (23).

En el presente estudio sólo se encontró relación estadísticamente significativa entre el cultivo positivo para *C. difficile* y la implementación de enema. Sin embargo algunos de estos factores presentaron una significación menor al 0,1 por lo que podrían ser considerados importantes para predecir el desarrollo de la EACD desde el punto de vista teórico: sonda nasogástrica ( $p. 0,08$ ) y colonoscopia ( $p. 0,08$ ). La diferencia entre los resultados encontrados y los esperados, podría deberse a la baja prevalencia de la EACD encontrada, sumada a la amplia variedad de características demográficas y clínicas de los pacientes que son tratados en esta institución e incluidos en el presente estudio.

Los resultados microbiológicos de este estudio muestran una prevalencia de la enfermedad por toxina A&B del 10,5% (14 pacientes), mientras que los cultivos positivos para *C. difficile* fueron el 9,0% (12 pacientes). Estos resultados de prevalencia son menores a los encontrados en otros estudios realizados en Colombia: en el 2008 Otero-Rengino W determinó mediante un estudio observacional la prevalencia y la causa de colitis en adultos mayores, atribuyéndole a este microorganismo el 40% de las causas infecciosas de la

enfermedad (25). El Grupo de Investigación en Bacterias Anaerobias y Aerobias de Importancia Clínica de la Universidad de Antioquia (2011), encontró por ensayo inmunoenzimático (EIA), 16,7% muestras positivas para toxina y cultivo para *C. difficile* en la IPS Universitaria Clínica León XIII” (estudio no publicado).

La prevalencia de EACD en Suramérica varía entre un 20-40% aproximadamente: en un estudio de casos y controles se determinó por un EIA 44,9% casos de EACD (36). Balassiano *et al.* (2011) través de EIA encontró una prevalencia de 27.1% (37), y en el 2010 el mismo autor ya había descrito la prevalencia de infección por *C. difficile* en un grupo de pacientes hospitalizados en una UCI en Rio de Janeiro, encontrando 19.7% pacientes con EACD (38). 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 (39). En Uruguay evaluaron 78 pacientes de UCI con diarrea por aglutinación en látex y EIA, encontrando una prevalencia del 26% (40), mientras que García *et al.* (2007) reportaron 156 pacientes de un hospital de Lima con diarrea nosocomial, 55 (35.2%) de ellos diagnosticados con EACD por medio de un EIA (41).

En el presente estudio se esperaba encontrar una prevalencia entre el 20-30% según lo reportado a nivel mundial (8), sin embargo la prevalencia encontrada cercana al 10% podría ser explicada por la población estudio evaluada en la institución, sus características clínicas y a los diversos factores de riesgo a los cuales se pudieron ver sometidos; se debe tener en cuenta que muestras de materia fecal que no cumplieran en la fase pre-analítica con las condiciones recomendadas en el presente estudio pudieron afectar la positividad de las diferentes técnicas empleadas.

En cuanto a las dos técnicas evaluadas en el presente estudio, el cultivo anaerobio para *C. difficile* tiene una sensibilidad aproximada del 100% y una especificidad del 93-96% (42); la disminución en la especificidad se puede explicar por la capacidad de cepas no toxigénicas de crecer en el cultivo, por tanto los resultados deber estar acompañados de un test que mida el papel toxigénico de la cepa aislada o ser interpretados según la sintomatología del paciente.

Los EIA que detectan las toxinas A&B tiene una sensibilidad del 53-77% y una especificidad del 95-100%. Estos ensayos tienen una muy buena especificidad, aunque puede tener reacciones cruzadas con las toxinas de *Clostridium sordellii* (42), sin embargo su sensibilidad no es tan buena, y por tanto la implementación de otra técnica diagnóstica como el cultivo anaerobio o tres muestras seriadas para determinación por EIA de las toxinas, puede aumentar esta sensibilidad.

De los 14 casos de Toxina A&B positiva, solamente el 50% de estos tuvieron cultivo positivo, y de los 12 casos de cultivo anaerobio para *C. difficile* positivo, el 58,3% tuvieron Toxina A&B positiva.

Para el caso de cultivo positivo y toxina negativa, hay varios factores que pueden afectar la detección de la toxina *in vitro*:

- a) Presencia de cepas no toxigénicas que aunque se puedan aislar en el cultivo la toxina continúa siendo negativa.
- b) La frecuencia de la diarrea y el nivel de expresión de la toxina al momento de la toma de la muestra.
- c) El estado de la bacteria al momento de la evaluación por el EIA; cuando esta se encuentra en escasez de nutrientes a nivel del colón, a veces debe adoptar formar esporuladas en lugar de la producción de toxinas con el fin de sobrevivir en el medio (43).
- d) Degradación de la toxina a nivel del intestino por enzimas digestivas proteolíticas (43).
- e) Competencia a nivel del colón con la microbiota acompañante que evita la colonización y la sobre-expresión del bacilo y sus toxinas.

Por otro lado, los casos de toxina positiva y cultivo negativo se podrían explicar por diversos factores, entre los cuales están:

- a) Como enfermedad asociada a la atención en salud, especialmente ligada al tratamiento con antibióticos de amplio espectro, todos los pacientes del presente estudio recibieron por lo menos un antibiótico antes de la toma de la muestra para el tratamiento de las diferentes patologías de ingreso. En general, para estos 7 pacientes con toxina positiva y cultivo negativo, el tratamiento previo fue con piperacilina/tazobactam, cefalosporinas de tercera y cuarta generación, algún carbapenem, macrólidos, quino/fluoroquinolonas, metronidazol, vancomicina, entre otros antibióticos, los cuales podrían afectar la viabilidad del bacilo en el intestino y el posterior cultivo negativo.
- b) *C. difficile* necesita para su crecimiento, además de un ambiente estrictamente anaerobio, un medio de cultivo que supla sus requerimientos nutricionales pero que también logre inhibir al máximo la microbiota acompañante, que en la materia fecal y en el cultivo puede interferir con su visualización en el agar.
- c) Como mecanismo de resistencia de *C. difficile* a las condiciones adversas del medio ambiente y del intestino, el bacilo puede adoptar su forma esporulada, y por tanto dificultar su crecimiento a partir de la muestra de materia fecal.

La resistencia a *C. difficile* ha sido descrita para antibióticos como clindamicina, eritromicina, tetraciclina, ciprofloxacina, moxifloxacina, levofloxacina, rifampicina, ácido fusídico, entre otros. El mecanismo implicado en estas resistencias va desde la adquisición y expresión del gen *ermB* que va a causar una metilación del ribosoma bacteriano y por tanto la resistencia a eritromicina, clindamicina y estreptograminas; expresión del gen *tetM* que origina una protección ribosomal y la resistencia a tetraciclina; sustitución en los genes *gyrA*, *rpoB* y *fusA* que van a alterar la acción sobre el sitio blanco de la moxifloxacina, rifampicina y ácido fusídico respectivamente (26, 27, 44-47).

En Latinoamérica se han realizado también estudios que evalúan la resistencia de *C. difficile* a varios antibióticos; Quesada-Gómez *et al.* (2010) describieron por E-test en Costa Rica varios aislamientos resistentes a Clindamicina, moxifloxacina y

ciprofloxacina (22). Goorhuis A. *et al.* (2009), encontraron en Argentina que el 90% de los ribotipos 017 aislados tienen alto nivel de resistencia a clindamicina y eritromicina, determinada por presencia del gen *ermB* (48).

En caso de ser necesario el tratamiento antibiótico para la EACD, en Colombia se emplea metronidazol y en casos severos vancomicina. El metronidazol es más utilizado porque es más económico y no permite que se desarrollen cepas de otras bacterias gram positivas resistentes a vancomicina, sin que esto implique que sea mejor terapia. En cuanto a la resistencia y los mecanismos de resistencia de *C. difficile* al metronidazol son pocos los reportes a nivel mundial. Brazier *et al.* (2001) reportó una cepa resistente entre 1.000 aislamientos en el Reino Unido (29). Peláez *et al.* en 1994, 2002 y 2008 reportó en España tres estudios con cepas de *C. difficile* resistentes al metronidazol con tasas de resistencia de 7,7%, 6,3% y 12% respectivamente (26, 49, 50). El mecanismo por el cual se presenta esta resistencia aún no está claro. Se ha planteado la posibilidad que esta resistencia sea por defectos en la captación del metronidazol y a una reducida actividad de la enzima nitroreductasa (26). En el presente estudio, no se esperaba encontrar algún tipo de resistencia a este antibiótico y se encontró un buen rango de sensibilidad (entre 0,064 – 2,0 ug/mL).

Con respecto a la vancomicina, sólo se ha reportado un caso de resistencia en Polonia en 1991 utilizando un método de difusión en disco (51); sin embargo la sensibilidad disminuida a la vancomicina ha sido descrita en varios estudios en los cuales empleaban unos puntos de corte diferentes a los empleados en este estudio: Peláez *et al.* (2002) reportó en España 13 aislamientos con altos niveles de MIC para vancomicina (8-16 mg/L) (49), y Mutlu *et al.* (2007) en Escocia reportó un aumento en el número de aislamientos de *C. difficile* con MIC de 4 mg/L para vancomicina de 2,7% en el 2000 a 21,6% en el 2005 (52). Sin embargo no se han reportado más datos de resistencia al respecto, desconociendo el posible mecanismo de resistencia o de disminución de sensibilidad con respecto a este glicopéptido. En el presente estudio las MIC obtenidas son  $\leq 1$   $\mu\text{g/mL}$ , siendo el punto de corte epidemiológico (ECOFFs) según el EUCAST  $\leq 2$   $\mu\text{g/mL}$ .

Este estudio presentó limitaciones desde el diseño metodológico, el cual sólo permitió captar los pacientes que los médicos sospecharan de EACD y remitieran la toxina al laboratorio, sin poder definir un caso de EACD o revisar activamente las características clínicas y demográficas que se pretendían evaluar.

Como aspectos a complementar en el estudio, es necesaria la realización de técnicas de laboratorio que permitan la caracterización molecular de las cepas aisladas, con el fin de establecer claramente su papel toxigénico y el ribotipo circulante en el medio. También se ve la necesidad de realizar un ensayo de neutralización de la citotoxina como prueba de referencia y compararla con las técnicas diagnósticas que se encuentran en el medio.

## CONCLUSIONES

En la presente investigación, y como primer estudio de prevalencia de *C. difficile* en Colombia, se encontró una baja frecuencia de EACD por toxina A&B y cultivo anaerobio para *C. difficile*, en comparación con los resultados obtenidos en otros estudios a nivel mundial, e incluso al compararlo con las prevalencias de otros países de Latinoamérica.

La positividad de la toxina A&B o del cultivo anaerobio para *C. difficile* se encontró relacionado con variables como: tratamiento durante la estancia hospitalaria con metronidazol, glicopéptidos, quinolonas y fluoroquinolonas y lincosamidas, y la implementación de enemas.

Otros factores predisponentes se encontraron con una significación estadística menor al 0.1 y según lo reportado en la literatura podrían ser determinantes para el desarrollo de la EACD: tratamiento antibiótico durante la hospitalización con cefalosporinas de cuarta generación, implementación de sonda nasogástrica y colonoscopia.

Como se esperaba, todos los aislamientos de *C. difficile* evaluados fueron sensibles al metronidazol y a la vancomicina; sin embargo es necesario continuar evaluando la frecuencia de la enfermedad en Colombia y complementar con un análisis molecular que permita identificar los genes presentes en las cepas aisladas y el ribotipo circulante.

## REFERENCIAS

1. 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.
2. 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(5):315-8.
3. 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(5):2004-11.
4. Hurley BW, Nguyen CC. The spectrum of pseudomembranous enterocolitis and antibiotic-associated diarrhea. Arch Intern Med. 2002;162(19):2177-84.
5. Biel FJ. Diarrea por *Clostridium difficile*. *Clostridium difficile*-associated diarrhea. Gastroenterol. latinoam. 2010;21(2):260-7.
6. Hurley BW, Nguyen CC. The spectrum of pseudomembranous enterocolitis and antibiotic-associated diarrhea. Arch Intern Med. 2002;162(19):2177-84.
7. Poutanen SM, Simor AE. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults. CMAJ. 2004;171(1):51-8.
8. Cohen SH, Gerding DN, Johnson S, Kelly CP, Loo VG, McDonald LC, et al. 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(5):431-55.
9. 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(13):1449-54.
10. 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(8):2785-91.
11. 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(2):388-96.
12. Kochanek KD, Xu J, Murphy SL, Miniño AM, Kung HC. Deaths: Preliminary data for 2009. National vital statistics reports. National Center for Health Statistics. 2011;59(4).
13. Donskey CJ. The role of the intestinal tract as a reservoir and source for transmission of nosocomial pathogens. Clin Infect Dis. 2004;39(2):219-26.
14. Owens RC, Donskey CJ, Gaynes RP, Loo VG, Muto CA. Antimicrobial-associated risk factors for *Clostridium difficile* infection. Clin Infect Dis. 2008;46 Suppl 1:S19-31.
15. Warny M, Pepin 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(9491):1079-84.
16. Dupuy B, Govind R, Antunes A, Matamouros S. *Clostridium difficile* toxin synthesis is negatively regulated by TcdC. J Med Microbiol. 2008;57(6):685-9.
17. McDonald LC, Killgore GE, Thompson A, Owens RC, Kazakova SV, Sambol SP, et al. An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. N Engl J Med. 2005;353(23):2433-41.



18. 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(23):2442-9.
19. 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(5):827-30.
20. McFarland LV. Update on the changing epidemiology of *Clostridium difficile*-associated disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2008;5(1):40-8.
21. Balassiano IT, Yates EA, Domingues RM, Ferreira EO. *Clostridium difficile*: a problem of concern in developed countries and still a mystery in Latin America. *J Med Microbiol*. 2012;61(2):169-79.
22. Quesada-Gómez C, Rodríguez C, Gamboa-Coronado MeM, Rodríguez-Cavallini E, Du T, Mulvey MR, et al. Emergence of *Clostridium difficile* NAP1 in Latin America. *J Clin Microbiol*. 2010;48(2):669-70.
23. Becerra MG, Ospina S, Atehortúa SL, Berbesi DY. Factores de riesgo para la infección por *Clostridium difficile*. *Infectio*. 2011;15(4):220-26.
24. Sánchez AN, Otero W, Caminos JE. Enfermedad asociada a *Clostridium difficile*: nuevas amenazas de un viejo enemigo. *Rev Col Gastroenterol*. 2008;24(3):142-59.
25. Otero W, González A, Gómez M. Prevalencia de diferentes tipos de colitis en personas adultas mayores. *Rev Col Gastroenterol*. 2009;24(3):272-8.26.
26. Huang H, Weintraub A, Fang H, Nord CE. Antimicrobial resistance in *Clostridium difficile*. *Int J Antimicrob Agents*. 2009;(34):516-22.
27. Spigaglia P, Barbanti F, Louie T, Barbut F, Mastrantonio P. Molecular analysis of the *gyrA* and *gyrB* quinolone resistance-determining regions of fluoroquinolone-resistant *Clostridium difficile* mutants selected in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(6):2463-8.
28. Goldstein E, Citron D. Resistance Trends in Antimicrobial Susceptibility of Anaerobic Bacteria, Part I. *Clinical Microbiology Newsletter*. 2011;33(1):1-8.
29. Brazier JS, Fawley W, Freeman J, Wilcox MH. Reduced susceptibility of *Clostridium difficile* to metronidazole. *J Antimicrob Chemother*. 2001;48(5):741-2.
30. Jousimies HR, Summanen P, Baron EJ, Citron DM, Wexler HM, Finegold SM. *Wadsworth-KTL anaerobic bacteriology manual*. 6th ed. Belmont, CA: Star Publishing, 2002.
31. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria; approved standard – seventh edition. CLSI document M11-A7. *Clinical and Laboratory Standards Institute*; 2007;27(2).
32. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-second informational supplement. CLSI document M100-S22. *Clinical and Laboratory Standards Institute*; 2012;32(3).
33. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 2.0. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*. 2012.
34. Donskey CJ. The role of the intestinal tract as a reservoir and source for transmission of nosocomial pathogens. *Clin Infect Dis*. 2004;39(2):219-26.
35. Johnson S, Gerding DN. *Clostridium difficile*--associated diarrhea. *Clin Infect Dis*. 1998;26(5):1027-34.
36. Marcon AP, Gamba MA, Vianna LA. Nosocomial diarrhea in the intensive care unit. *Braz J Infect Dis*. 2006;10(6):384-9.
37. 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(2):249-55.
38. 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(4):449-55.
  39. Legaria MC, Lumelsky G, Rosetti S. *Clostridium difficile*-associated diarrhea from a general hospital in Argentina. *Anaerobe*. 2003;9(3):113-6.
  40. Grille P, Olano E, Bertullo H, Bagnulo H. Estudio sobre diarrea en una unidad de cuidados intensivos quirúrgica. *Rev Med Urug*; 2006;22:136-42.
  41. Garcia 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(5):802-5.
  42. Humphries R. Laboratory Tests for the Diagnosis of *Clostridium difficile* Infections. *Clinical Microbiology Newsletter*. 2012;34(19):151-7.
  43. Akerlund T, Svenungsson B, Lagergren A, Burman LG. Correlation of disease severity with fecal toxin levels in patients with *Clostridium difficile*-associated diarrhea and distribution of PCR ribotypes and toxin yields in vitro of corresponding isolates. *J Clin Microbiol*. 2006;44(2):353-8.
  44. Curry SR, Marsh JW, Shutt KA, Muto CA, O'Leary MM, Saul MI, et al. High frequency of rifampin resistance identified in an epidemic *Clostridium difficile* clone from a large teaching hospital. *Clin Infect Dis*. 2009;48(4):425-9.
  45. Noren T, Akerlund T, Wullt M, Burman LG, Unemo M. Mutations in *fusA* associated with posttherapy fusidic acid resistance in *Clostridium difficile*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(5):1840-3.
  46. Spigaglia P, Barbanti F, Mastrantonio P. New variants of the *tet(M)* gene in *Clostridium difficile* clinical isolates harbouring Tn916-like elements. *J Antimicrob Chemother*. 2006;57:1205-9.
  47. Schmidt C, Loffler B, Ackermann G. Antimicrobial phenotypes and molecular basis in clinical strains of *Clostridium difficile*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007;59(1):1-5.
  48. 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.
  49. Pelaez T, Alcalá L, Alonso R, Rodríguez-Creixems M, García-Lechuz JM, Bouza E. Reassessment of *Clostridium difficile* susceptibility to metronidazole and vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(6):1647-50.
  50. Pelaez T, Cercenado E, Alcalá L, Marin M, Martín-López A, Martínez-Alarcón J, et al. Metronidazole resistance in *Clostridium difficile* is heterogeneous. *J Clin Microbiol*. 2008;46(9):3028-32.
  51. Dworzynski A, Sokol B, Meisel-Mikolajczyk F. Antibiotic resistance of *Clostridium difficile* isolates. *Cytobios*. 1991;65(262-263):149-53.
  52. Mutlu E, Wroe AJ, Sanchez-Hurtado K, Brazier JS, Poxton IR. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility patterns of *Clostridium difficile* strains isolated from hospitals in south-east Scotland. *J Med Microbiol*. 2007;(56):921-9.