

Artículo Original/ Original Article

[10.18004/mem.iics/1812-9528/2023.e21122305](https://doi.org/10.18004/mem.iics/1812-9528/2023.e21122305)

Caracterización epidemio-molecular de la infección por *Clostridioides difficile* en pacientes hospitalizados con cuadro diarreico en instituciones de salud. 2019

María Verónica Orrego-Miranda¹ , *Natalie Weiler¹ , Mario Martínez-Mora³ , Aníbal Kawabata² , María Enilda Bogado³ , Evelyn Rosa López-Mora⁴ 

¹Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social, Laboratorio Central de Salud Pública. Avenida Venezuela y Teniente Ecurra. Asunción, Paraguay

²Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social, Hospital de Trauma. Asunción, Paraguay

³Instituto de Previsión Social, Asunción, Paraguay.

⁴Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social, Hospital de Itauguá. Paraguay

Cómo referenciar este artículo/
How to reference this article:

Orrego M, Weiler N, Martínez M, Kawabata A, Espínola S, Bogado ME, López E. Caracterización epidemio-molecular de la infección por *Clostridioides difficile* en pacientes hospitalizados con cuadro diarreico en instituciones de salud. Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud. 2019. 2023; 21(1): e21122305.

RESUMEN

La infección por *Clostridioides difficile* es una de las principales causas de diarrea nosocomial en hospitales del mundo, asociada a antibióticos de amplio espectro. Estudio descriptivo, retrospectivo, de corte transversal, de tipo censal. Se estudiaron 281 muestras de pacientes hospitalizados con la infección, se analizaron características socio-demográficas, clínicas y se caracterizó molecularmente al patógeno. Como resultado, se obtuvieron pacientes con la infección con una mediana de edad de 64 años siendo el 61,5 % del sexo masculino. El promedio de presentación del cuadro diarreico fue de 5 días, con tratamiento antimicrobiano de 8 días e internación de 15 días. El 94% tuvo tratamiento antimicrobiano previo, y el 6% estuvo expuesto a algún factor de riesgo. Los antimicrobianos más utilizados solos o en combinación fueron betalactámicos, fluoroquinolonas, vancomicina y carbapenémicos. Las áreas de internación con mayor frecuencia de presentación de la infección fueron las unidades de Clínica Médica, Traumatología, Geriátrica y Unidad de Terapia Intensiva. La prevalencia de *C. difficile* toxigénico fue de 14%, y de esta frecuencia el 100% presentó toxinas TcdA y TcdB, con ausencia de toxinas binarias y delección del gen *tcdC*. Se constató la presencia de grupos clonales en la misma unidad de internación y misma institución de salud. El 100% de las cepas resultaron susceptibles a los antibióticos de elección para la infección. La prevalencia de la infección y presencia de perfiles clonales detectadas revelan la necesidad de un mejoramiento en el sistema de control de infecciones, así como del fortalecimiento y vigilancia de la resistencia antimicrobiana.

Palabras clave: *Clostridioides difficile*, infección, epidemiología, antimicrobianos, cepas clonales.

Fecha de recepción: 20 de octubre de 2022. **Fecha de aceptación:** 04 de abril de 2023

***Autor correspondiente:** Dra. Natalie Weiler. Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social, Laboratorio Central de Salud Pública. Avenida Venezuela y Teniente Ecurra. Asunción, Paraguay
Teléfono personal: +595971295230. Teléfono Institucional: +59521292653

Email: natalieweiler@gmail.com, enteropatogeno.lcsp@mspbs.gov.py



Este es un artículo publicado en acceso abierto bajo una Licencia Creative Commons

Epidemio-molecular characterization of *Clostridioides difficile* infection in hospitalized patients with diarrhea in health institutions. 2019

ABSTRACT

Clostridioides difficile infection is one of the main causes of nosocomial diarrhea in hospitals worldwide, associated with broad-spectrum antibiotics. Descriptive, retrospective, cross-sectional, census-type study. Two hundred eighty-one samples from patients hospitalized with the infection were studied, sociodemographic and clinical characteristics were analyzed and the pathogen was characterized molecularly. As a result, patients with the infection had a median age of 64 years and 61.5% male. The average presentation of diarrhea was 5 days, antimicrobial treatment 8 days and hospitalization 15 days. Ninety four percent had previous antimicrobial treatment, and 6% were exposed to some risk factor. The most commonly used antimicrobials alone or in combination were beta-lactams, fluoroquinolones, vancomycin, and carbapenems. The hospitalization areas with the highest frequency of presentation of the infection were the Clinical Medicine, Traumatology, Geriatrics and Intensive Care Unit units. The prevalence of toxigenic *C. difficile* was 14%, and of this frequency, 100% presented TcdA and TcdB toxins, with the absence of binary toxins and deletion of the *tcdC* gene. The presence of clonal groups was verified in the same hospitalization unit and the same health institution. All the strains were susceptible to the antibiotics of choice for the infection. The prevalence of infection and the presence of clonal profiles detected reveal the need for improvement of the infection control system, as well as of the strengthening and surveillance of antimicrobial resistance.

Keywords: *Clostridioides difficile*, infection, epidemiology, antimicrobials, clonal strains.

INTRODUCCIÓN

La infección por *C. difficile* es una de las principales causas de diarrea nosocomial en los hospitales del mundo, relacionada a la colitis pseudomembranosa asociada al uso de antibióticos de amplio espectro^(1,2). La epidemiología de la infección por *C. difficile* (ICD) ha cambiado durante este milenio, así como la presentación clínica, la aparición de la infección en pacientes con bajo riesgo, y la respuesta al tratamiento antimicrobiano^(1,3). El espectro de la enfermedad va desde cuadros discretos de diarrea hasta la formación de pseudomembranas y megacolon tóxico. Estos cuadros clínicos se deben a los factores de virulencia que presenta este patógeno, principalmente la toxina A y toxina B que son responsables de la patogenicidad⁽⁴⁻⁶⁾.

La presencia de esporas en la estructura de *C. difficile* lo hacen resistentes a los cambios físicos, altas temperaturas, luz ultravioleta y desinfectantes. Se transmite por la vía fecal-oral, pudiendo propagarse por las manos de pacientes infectados y trabajadores de la salud y hasta después de su egreso hospitalario, lo que podría generar brotes en hospitales y comunidad. Esto último, alerta a los centros de control de infecciones de los hospitales generando estrategias de prevención en los mismos^(6,7). El diagnóstico rápido y preciso es esencial para mejorar los resultados de pacientes con ICD y para reducir la transmisión horizontal en las instalaciones de salud^(7,8).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se han propuesto en los últimos años como método de elección para la detección de los genes que codifican la expresión de las toxinas A y B, así como también otros genes de importancia, por la facilidad y rapidez de la técnica, junto a la alta sensibilidad y especificidad^(9,10).

La caracterización molecular como la electroforesis de campo pulsado (PFGE) se ha utilizado como uno de los métodos genotípicos claves para subtipificar *C. difficile* encontrándose que es altamente discriminatoria, reproducible y ha permitido el seguimiento, la identificación de brotes y diseminación epidémica de cepas^(10,11). El

método de *Multilocus sequence Typing* (MLST), es también recomendado por su relativa heterogeneidad genética, identificando 7 genes (*aroE*, *ddl*, *dutA*, *tpi*, *recA*, *gmk*, *sodA*) para analizar un grupo de aislados de *C. difficile*^(11,12).

En este estudio, se caracterizaron los aislamientos de *C. difficile* toxigénico, por métodos moleculares, susceptibilidad antimicrobiana y un estudio descriptivo de la caracterización epidemiológica del mismo año de estudio.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Se realizó un estudio retrospectivo de corte transversal, descriptivo tomando como periodo de estudio de enero a diciembre del 2019. Se incluyeron diferentes instituciones de salud del departamento Central y Capital. El muestreo realizado fue no probabilístico de casos consecutivos, como criterio de inclusión se consideraron pacientes hospitalizados de ambos sexos, de todos los rangos de edad, con presentación de síndrome diarreico postratamiento antimicrobiano, o recurrente de la infección por *C. difficile* o que presentaron alguno de los siguientes factores de riesgo: tratamiento inmunosupresor, enfermedades crónicas severas (renales y hepáticas), tratamiento con antiácidos, inhibidores de la bomba de protones, trasplantes, cirugías gastrointestinales y otros procedimientos invasivos en el tracto gastrointestinal, con fichas epidemiológicas completas y en los que se descartó que el síndrome diarreico sea de etiología bacteriana o viral.

Se realizó inicialmente un análisis epidemiológico de los datos demográficos y clínicos de los pacientes con la infección de *C. difficile*. La extracción de ADN se realizó a partir de muestras de heces, con un pretratamiento con Buffer TE o Buffer S.T.A.R., y centrifugación, seguido por el método de perlas magnéticas con equipo de extracción de ADN automatizado de la marca Magpurix de procedencia Taiwán. La detección de *C. difficile* toxigénico se realizó por PCR en tiempo real, se utilizó el kit comercial de RIDA© que permite detectar el gen *tcdA* y *tcdB* juntos. El equipo utilizado fue Agilent Techn Mx3005P y la detección de los demás genes *cdtA*, *cdtB*, *tcdE*, *tcdR*, delección del gen *tcdC*, se realizó por PCR en tiempo final, según el protocolo de Persson *et al.*, 2008⁽¹³⁾. En las PCR se utilizó como control positivo la cepa patrón *C. difficile* ATCC® 9689. Para las técnicas de PFGE y MLST se procedió según los protocolos de CDC 2014⁽¹⁴⁾ y Griffiths *et al.*, 2018⁽¹²⁾ respectivamente.

Las muestras positivas, se sometieron a siembra para la recuperación de las cepas bacterianas, se realizó un pretratamiento con alcohol etílico al 100% y posteriormente siembra en Agar Cefoxitina-Cicloserina-Fructosa (CCFA), e incubación en ambiente anaeróbico estricto por 48 a 72 horas a 37 °C. Para las pruebas de sensibilidad antimicrobiana, se evaluaron las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) por el método epsilométrico de las drogas vancomicina y metronidazol, utilizando tiras de E-test para ambas drogas y la interpretación según criterios del Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) documento M11-A7 2007⁽¹⁵⁾. Para esta prueba se utilizó la cepa control *Clostridium difficile* ATCC® 9689.

El análisis estadístico se realizó por Epi Info versión 7 utilizando frecuencias con un índice de confianza de 95% (IC95), proporciones, medidas de tendencia central como: los promedios y medianas con rangos intercuartiles. Se tomaron en cuenta las normas éticas referentes a los estudios poblacionales, el protocolo fue aprobado por el Comité de Ética del Laboratorio de Salud Pública del Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social según dictamen Nro. 162/2021.

RESULTADOS

De las 281 muestras estudiadas, la prevalencia de *C. difficile* toxigénico fue del 14% (IC 95%, 10-19%). Así mismo, el 86% (241/281) fueron muestras negativas y/o muestras positivas para *C. difficile* no toxigénico, que no presenta relevancia clínica.

La mediana de la edad de la población afectada con la ICD fue de 64 años con un rango de edad más prevalente de 51 a 70 años. El 60% de la población afectada fue del sexo masculino.

Las características clínicas en pacientes con ICD evaluadas más relevantes fueron en promedio: de 15 días de estancia hospitalaria, 5 días de síndrome diarreico y exposición previa a los antimicrobianos de 8 días.

Las áreas de internación más reportadas con pacientes con ICD fueron clínica médica, unidad de terapia intensiva, traumatología y geriatría.

El 94% (37/40) de los pacientes tuvieron tratamiento previo con antimicrobianos. Entre los antimicrobianos más utilizados se destacó a los betalactámicos en un 74%, dentro de estos el uso de cefalosporinas, carbapenémicos y betalactámicos con inhibidores de betalactamasas; vancomicina 28,8%, fluoroquinolonas 26% y clindamicina 15%. El 6% (3/40) restante correspondía a pacientes que presentaban algún tipo de inmunosupresión como casos oncológicos, quemados u hospitalización prolongada más de 15 días de internación.

Tabla 1. Frecuencia de cepas de *Clostridioides difficile* toxigénico según la presencia de toxinas.

Toxinas	Frecuencia (n: 40)	Porcentaje % (IC 95)
Variantes de toxinas		
<i>tcdA+</i> / <i>tcdB+</i>	40	100 (91,1 - 100)
<i>tcdA+</i> / <i>tcdB-</i>	< 1	-
<i>tcdA-</i> / <i>tcdB+</i>	< 1	-
Toxina Binaria		
<i>cdtA+</i> / <i>cdtB+</i>	< 1	-
<i>cdtA+</i> / <i>cdtB-</i>	< 1	-
<i>cdtA-</i> / <i>cdtB+</i>	< 1	-
Delección <i>tcdC</i>		
<i>tcdR</i>	40	100 (91,1 - 100)
<i>tcdE</i>	40	100 (91,1 - 100)

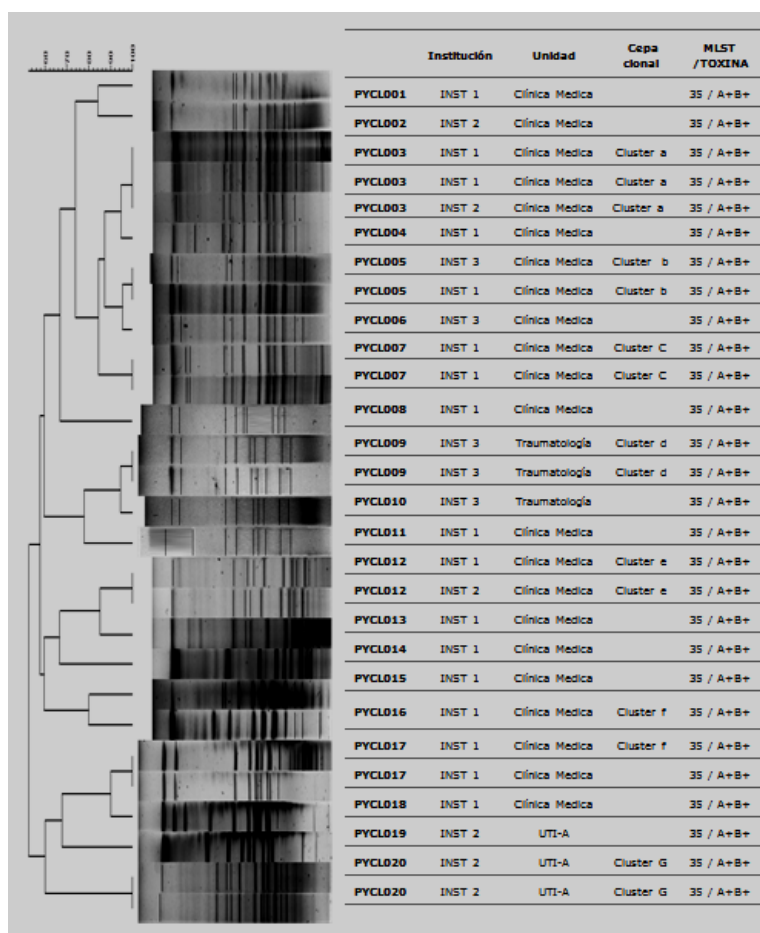
Se pudo observar que de las cepas positivas de *C. difficile* toxigénico (40/40) presentaron la toxina A (*tcdA*) y toxina B (*tcdB*), *tcdR* y *tcdE*. Así mismo, ninguna de las cepas positivas presentó la toxina binaria (*cdtA* y *cdtB*) y tampoco mutación del gen *tcdC* (Tabla 1).

Tabla 2. Susceptibilidad antimicrobiana para aislamiento de *C. difficile* (n: 40).

Antimicrobiano	Rango CIM (mg/L)	Puntos de corte CIM (mg/L)*			Frecuencia (%)		
		S	I	R	S	I	R
Vancomicina	0.125-0.5	≤ 2	-	≥ 4	40 (100)	-	0 (0)
Metronidazol	0.016-256	≤ 8	16	≥ 32	40 (100)	0 (0)	0 (0)

*Valores de punto de corte de CLSI CIM para anaerobios. CLSI, Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio. CIM, concentración inhibitoria mínima; S, sensible; I, intermedio; R, resistente

De los resultados obtenidos, se pudo observar que las 40 cepas positivas para *C. difficile* toxigénico, el 100% presentó sensibilidad a ambas drogas.



Comparación del pulsotipo, secuenciotipo, toxinas presentes, instituciones de salud, salas de internación y presencia de cluster.

Figura 1. Diversidad genética de las cepas de *C. difficile* toxigénico mediante Electroforesis de Campo Pulsado (PFGE).

De 28 cepas, 19 presentaron perfiles únicos o perfiles genéticos que diferían entre sí. Al mismo tiempo, se pudieron detectar 7 perfiles clonales o *clusters* con un 90 - 100% de similitud. Se pudo constatar que las cepas clonales provenían de las mismas instituciones y correspondían a la misma unidad de internación. Esta comparación podría proponer la presencia y trasmisión de cepas clonales entre pacientes y mediada al mismo tiempo por el personal de salud. En cuanto al análisis del secuenciotipo, se encontró que la totalidad de cepas correspondían al ST35.

DISCUSIÓN

Se observó concordancia con la edad de la población afectada y otros estudios. Álvarez *et al.* encontraron que los pacientes presentaban una edad media de 63,4 años. Gardilicic *et al.* informaron que la mayoría de los pacientes afectados eran mayores de 65 años (77,7%). Fernández *et al.* describieron un estudio donde la edad media de los casos positivos fue de 72,9 años (edades comprendidas entre 47 a 88 años). Legaria *et al.* en un estudio realizado con pacientes sintomáticos observaron que las edades de los pacientes estaban entre 26 y 87 años, el 52% de ellos mayores de 64 años. Orrego *et al.* en un estudio realizado, observaron en 901 muestras una mediana de 68 años⁽¹⁶⁻²⁰⁾.

Respecto a las características sociodemográficas se observó concordancia con la mayoría de los estudios^(16, 21-25). La diferencia de la composición de la microbiota intestinal en personas mayores de 60 años predispone a agravar enfermedades crónicas de base, sumando a esto, el uso de antibióticos, hospitalizaciones prolongadas, etc.

Las características clínicas evaluadas, la mayoría de los estudios realizados, reportan la estancia hospitalaria prolongada, exposición a antimicrobianos prolongado, y la presencia de diarreas nosocomiales, como factores de riesgo clínicos presentes en la infección^(18,21, 26-28). Respecto a las áreas de internación, se reportó una mayor concurrencia en las áreas de clínica médica, unidad de cuidados intensivos, geriatría, y traumatología. Esta alta concurrencia, se podría explicar, teniendo en cuenta, que estas áreas albergan pacientes con enfermedad crónica, además de hospitalización prolongada, tratamiento antimicrobiano extenso, pacientes inmunosuprimidos, de edad avanzada. Las diarreas nosocomiales por el uso de medicamentos son un factor de riesgo para la trasmisión intrahospitalaria de *C. difficile* y otros agentes microbianos. Esto explica las infecciones asociadas a la atención en salud entre pacientes de la misma unidad de servicio^(17, 26,29).

El uso de antimicrobianos como vancomicina, carbapenémicos, fluoroquinolonas, cefalosporinas y piperacilina-tazobactam son los más utilizados tal como lo reportan diversos estudios^(16,23,24,30-32). Así mismo, se pudo observar un porcentaje de pacientes que no recibieron tratamiento antimicrobiano. Estos pacientes, eran inmunosuprimidos, por tratamiento quimioterápico, trasplantados o pacientes con quemaduras graves. Está descrito en la literatura que la inmunosupresión es un factor de riesgo para la aparición de ICD. Las manifestaciones clínicas más frecuentes en pacientes inmunosuprimidos son la diarrea de diversa gravedad y duración, sin embargo, no se presenta la característica de formación de pseudomembranas.

La presentación de las toxinas tcdE, tcdR, tcdA y tcdB coincide con los estudios realizados por Ferreira *et al.*, Loo *et al.*, Putsathit *et al.*, Tian *et al.*^(20, 32-34).

En cuanto a la sensibilidad antimicrobiana reportada respecto a las drogas de elección para el tratamiento, se encontró concordancia con otros estudios,^(17, 32, 35,36). Así mismo, se pudo observar, en el estudio de Pelaez *et al.*⁽³⁷⁾, respecto a la droga metronidazol, una alta sensibilidad antimicrobiana en la mayoría de los países del mundo con excepción de Israel que, en el 2017, reportó una resistencia de 20,25% a este antimicrobiano, y a vancomicina, se observó un incremento de la resistencia en países como Estados Unidos, Polonia, Israel y Brasil, desde el 2011. Se destaca también que, en la mayoría de estos estudios citados, se presentan resistencias a otros antimicrobianos como clindamicina, fluoroquinolonas, entre otros, por lo que, sería interesante, realizar pruebas de sensibilidad a estas drogas para conocer la situación de la resistencia antimicrobiana respecto a estos antimicrobianos.

Los estudios de epidemiología molecular muestran en este trabajo, la presencia de varios perfiles electroforéticos únicos corroborando la circulación de varias clonas en los distintos hospitales. Así mismo la presencia de diferentes perfiles clonales circulando en la misma sala e institución que alerta la posibilidad de brotes en los distintos nosocomios. Varios estudios, han reportado, utilizar esta técnica, para el control de brotes y el reconocimiento de perfiles genéticos^(29, 38,39).

Las técnicas utilizadas nos permitieron caracterizar este patógeno, determinando sus toxinas principales, además de la relación genética de las cepas asociadas a sus datos epidemiológicos. Los datos obtenidos revelan la necesidad de un mejoramiento en el sistema de control de infecciones, además, del fortalecimiento del sistema de vigilancia de la resistencia antimicrobiana para de esta manera evitar que surjan resistencias a los antimicrobianos que se utilizan actualmente.

Es de gran importancia extender el estudio a pacientes de la comunidad y establecer su relación con cepas hospitalarias a través de estudios filogenéticos, además, de profundizar el estudio de otros factores de virulencia que pudieran tener impacto en el establecimiento de la enfermedad y el perfil de resistencia a otras drogas no estudiadas.

AGRADECIMIENTOS

La realización de este trabajo fue apoyada por subvenciones del Fondo para la convergencia estructural del Mercosur (FOCEM)-Mercosur, convenio FOCEM

Nº03/11 Proyecto "Investigación, Educación y Biotecnologías Aplicadas a la Salud (COF 03/11).

A la Dra. Margarita Samudio, por el apoyo técnico y metodológico en el marco de la Maestría de Salud Pública de la Universidad Iberoamericana de Asunción.

Contribución de autores: **Verónica Orrego.** Autora principal, Elaboración del protocolo, recolección y análisis de las muestras. Presentación de resultados. Redacción del manuscrito. **Natalie Weiler.** Revisión del protocolo. Asesoría técnica. Revisión del manuscrito. **Mario Martínez Mora.** Recolección de muestras, Revisión del manuscrito. **Aníbal Kawabata.** Recolección de muestras, Análisis de datos, Revisión del manuscrito. **María Enilda Bogado.** Recolección de muestras, Análisis de datos, Revisión del manuscrito. Silvia Espínola: Recolección de muestras. Análisis de datos. Revisión del manuscrito. Evelyn Rosa López Mora: Recolección de muestras. Análisis de datos. Revisión del manuscrito.

Conflicto de interés: Ninguno.

Financiamiento: Fondo para la convergencia estructural del Mercosur (FOCEM)-Mercosur, convenio FOCEM Nº03/11 Proyecto "Investigación, Educación y Biotecnologías Aplicadas a la Salud (COF 03/11).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Rodríguez D, Mirelis B, Navarro F. Infecciones producidas por *Clostridium difficile*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2013; 31(4): 254. doi: 10.1016/j.eimc.2012.12.010
- Becerra M, Ospina S, León S, Yajaira D. Factores de riesgo para la infección de *Clostridium difficile*. *Infectio*. 2011; 15(4): 220-26. [https://doi.org/10.1016/S0123-9392\(11\)70735-4](https://doi.org/10.1016/S0123-9392(11)70735-4)
- Meyer L, Espinoza R, Quera R. *Clostridium difficile*. Epidemiología, Diagnóstico Y Estrategias Terapéuticas. *Infection: Epidemiology, Diagnostic And Therapeutic Strategies*. *Rev. Med. Clin. Condes*. 2014; 25(3) 473-84. [https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(14\)70064-1](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(14)70064-1)
- Pérez M, Hurtado A, Couto I, Gutiérrez J, Seoane L, Suárez JM, et al. Abordaje multidisciplinario de la infección por *Clostridium difficile*. *Rev. chil. infectol*. 2013; 30(2): 165-85.
- Freeman J, Bauer MP, Baines SD, Corver J, Fawley WN, Goorhuis B, et al. The changing epidemiology of *Clostridium difficile* infections. *Clin Microbiol Rev*. 2010; 23(3): 529-49. doi: 10.1128/CMR.00082-09. PMID: 20610822; PMCID: PMC2901659
- Debast SB, Bauer M, Kuijper. Updating the guidance document for the treatment of *Clostridium difficile* infection. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. *Clinical Microbiol and infection*. 2014; 20(2). doi: 10.1111/1469-0691.12418.
- Balassiano I, Yates E, Domingues R, Ferreira E. *Clostridium difficile*: a problem of concern in developed countries and still a mystery in *Journal of Medical Microbiology*. 2012; 61, 169-79. doi: 10.1099/jmm.0.037077-0.
- Asencio A, Monge D. Epidemiología de la infección por *Clostridium difficile* en España. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2012; 30(6): 333-7. doi: [10.1016/j.eimc.2011.09.010](https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.09.010)
- Wroblewski D, Hannett GE, Bopp DJ, Dumyati GK, Halse TA, Dumas NB, et al. Rapid molecular characterization of *Clostridium difficile* and assessment of populations of *C. difficile* in stool specimens. *J Clin Microbiol*. 2009; 47(7): 2142-8. doi: 10.1128/JCM.02498-08. PMID: 19403775; PMCID: PMC2708487
- Deshpande A, Pasupuleti V, Rolston DDK, Jain A, Deshpande N, Pant C, et al. Diagnostic accuracy of realtime polymerase chain reaction in detection of *Clostridium difficile* in the stool samples of patients with suspected *Clostridium difficile* infection. *Clin Infect Dis*. 2011; 53: e8190. <https://doi.org/10.1093/cid/cir505>
- Griffiths D, Fawley W, Kachrimanidou M, Bowden R, Crook DW. Multilocus sequence typing of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol*. 2010; 48(3): 770-8. doi: 10.1128/JCM.01796-09. PMID: 20042623; PMCID: PMC2832416.
- Lemee L, Dhalluin A, Pestel-Caron M, Lemeland JF, Pons JL. Multilocus sequence typing analysis of human and animal *Clostridium difficile* isolates of various toxigenic types. *Journal of clinical microbiology*. 2004; 42: 2609-

17. doi: 10.1128/JCM.42.6.2609-2617.2004.
13. Persson S, Torpdahl M, Olsen KE. New multiplex PCR method for the detection of *Clostridium difficile* toxin A (tcdA) and toxin B (tcdB) and the binary toxin (cdtA/cdtB) genes applied to a Danish strain collection. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 1057-64. doi: 10.1111/j.1469-0691.2008.02092.x
14. Gebreyes WA, Adkins PR. The use of pulsed-field gel electrophoresis for genotyping of *Clostridium difficile*. *Methods Mol Biol*. 2015;1301:95-101. doi: 10.1007/978-1-4939-2599-5_9. PMID: 25862051.
15. CLSI. *Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria*. 9th ed. CLSI standard M11. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.
16. Legaria MC, Lumelsky G, Rosetti S. *Clostridium difficile*-associated diarrhea from a general hospital in Argentina. *Anaerobe*. 2003; 9(3):113-6. doi: 10.1016/S1075-9964(03)00088-X. PMID: 16887697.
17. Balassiano I, Dos Santos-Filho J, de Oliveira MP, Ramos MC, Japiassu 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. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2010.07.017.
18. 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. PMID: 17984329
19. Alvarez L M, González D R, Briceño L I, Cofre D C, Labarca L J, Vial C P, et al. Diagnóstico de diarrea por *Clostridium difficile*: en busca de un enfoque clínico más eficiente. *Rev méd Chile* [Internet]. junio de 2001 [citado 18 de abril de 2023];129(6). Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872001000600004&lng=en&nrm=is_o&lng=en. <http://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872001000600004>.
20. Putsathit P, Maneerattanaporn M, Piewngam P, Kiratisin P, Riley TV. Prevalence and molecular epidemiology of *Clostridium difficile* infection in Thailand. *New Microbes New Infect* 2017; 15:27-32. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2016.10.004>
21. Álvarez S, Blanco JL, Peláez T, Astorga RJ, Harmanus C, Kuijper E, et al. High prevalence of the epidemic *Clostridium difficile* PCR ribotype 078 in Iberian free-range pigs. *Res Vet Sci*. 2013; 95(2): 358-61. doi: 10.1016/j.rvsc.2013.06.021.
22. Orrego M, Weiler N, Martínez M. Detección de *Clostridioides difficile* toxigénico a partir de muestras diarreicas por reacción en cadena de la polimerasa, en pacientes hospitalizados en Paraguay. Periodo 2016-2018. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud*. 2020; 18(1): 55-60. doi:10.18004/mem.iics/1812-9528/2020.018.01.55-060
23. Gardilic M, Fica A, Chang M, Llanos C, Luzoro A. Diarrea asociada a *Clostridium difficile* en un hospital de adultos: Estudio descriptivo. *Rev. chil. infectol*. 2000; 17(4): 307-12. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-1018200000400005>
24. Fernández-Canigia L, Nazar J, Arce M, Dadamio J, Smayevsky J, Bianchini H, et al. *Clostridium difficile* diarrhea: Frequency of detection in a medical center in Buenos Aires, Argentina. *Rev Argent Microbiol*. 2001; 33(2):101-107. PMID: 11494752
25. Liao C, Ko W, Lu J, Hsueh P. Characterizations of clinical isolates of *Clostridium difficile* by toxin genotypes and by susceptibility to 12 antimicrobial agents, including fidaxomicin (OPT-80) and rifaximin: a multicenter study in Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 56: 3943-9. <https://doi.org/10.1128/AAC.00191-12>
26. Marcon AP, Gamba MA, Vianna LA. Nosocomial diarrhea in the intensive care unit. *Braz J Infect Dis*. 2006 Dec; 10(6):384-9. doi: 10.1590/s1413-86702006000600005. PMID: 17420910.
27. Pépin J, Saheb N, Coulombe MA, Alary ME, Corriveau MP, Authier S, et al. Emergence of fluoroquinolones as the predominant risk factor for *Clostridium difficile*-associated diarrhea: a cohort study during an epidemic in Quebec. *Clin Infect Dis*. 2005; 41(9): 1254-60. 10.1086/496986. PMID: 16206099.
28. Camacho-Ortiz A, Galindo A, Rancel A, Macías A, Lamothe-Molina P, Ponce de León-Garduño A, et al. Factors associated with *Clostridium difficile* disease in a tertiary-care medical institution in Mexico: A case-control study. *Rev Invest Clin* 2009; 61: 371-7. PMID: 20184096.

29. Dias M, Yamashiro J, Borrasca V, Stempliuk V, Araujo M, Costa SF, et al. Pseudo-Outbreak of *Clostridium difficile* associated diarrhea in a tertiary care hospital. *Rev Ins Med Trop Sao Paulo*. 2010; 52, 133-7. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652010000300004>
30. Falces I, Troyano P, García S, Baquero F, Mellado MJ, García J. Detection of toxigenic *Clostridium difficile* in paediatric patients. *Enferm Infecc Microbiol Clin (Engl Ed)*. 2018 Jun-Jul; 36(6): 357-61. doi: 10.1016/j.eimc.2017.05.006. PMID: 28689671.
31. Monge D, Morosini M, Millán I, Pérez Canosa C, Manso M, Guzman MF, et al. Factores de riesgo de infección por *Clostridium difficile* en pacientes hospitalizados [Risk factors for *Clostridium difficile* infections in hospitalized patients]. *Med Clin (Barc)*. 2011; 19; 137(13): 575-80. doi: 10.1016/j.medcli.2010.12.026.
32. Tian T, Zhao J, Yang J, Qiang C, Li Zr, Chen J, et al. Molecular Characterization of *Clostridium difficile* Isolates from Human Subjects and the Environment. *PLoS ONE*, 2016 11(3): e0151964. doi:10.1371/journal.pone.0151964
33. Ferreira CE, Nakano V, Durigon EL, Avila-Campos MJ. Prevalence of *Clostridium* spp. and *Clostridium difficile* in children with acute diarrhea in São Paulo city, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003; 98(4): 451-4. 10.1590/s0074-02762003000400003.
34. 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. Doi: 10.1056/NEJMoa051639.
35. Pinto LJF, Alcides APP, Ferreira EO, Avelar KES, Sabrá A, Domingues RMCP, et al. Incidence and importance of *Clostridium difficile* in pediatrics diarrhea in Brazil. *J Med Microbiol*. 2003; 52(12): 1095-1099. doi: 10.1099/jmm.0.05308-0. PMID: 14614068.
36. Alcides A, Brazier J, Pinto L, Balassiano IT, Boente RF, de Paula GR, et al. New PCR ribotypes of *Clostridium difficile* detected in children in Brazil. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2007; 92:53-9. <https://doi.org/10.1007/s10482-006-9134-2>
37. Peláez T, Alcalá L, Alonso R, Martín-López A, García-Arias V, Marín M, et al. In vitro activity of ramoplanin against *Clostridium difficile*, including strains with reduced susceptibility to vancomycin or with resistance to metronidazole. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 1157-9. doi: 10.1128/AAC.49.3.1157-1159.2005.
38. Huber C, Foster N, Riley T, Paterson D. Challenges for standardization of *Clostridium difficile* typing methods. *Journal of clinical microbiology*. 2013; 51(9):2810-4. <https://doi.org/10.1128/JCM.00143-13>
39. Wroblewski D, Hannett GE, Bopp DJ, Dumyati GK, Halse TA, Dumas NB, et al. Rapid molecular characterization of *Clostridium difficile* and assessment of populations of *C. difficile* in stool specimens. *J Clin Microbiol*. 2009; 47(7): 2142-8. doi: 10.1128/JCM.02498-08.