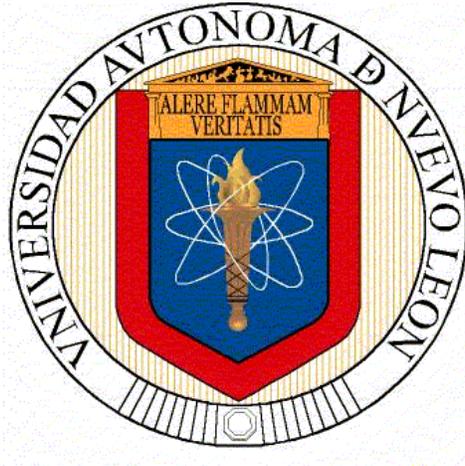


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



Epidemiología molecular de aislamientos clínicos de
Clostridium difficile obtenidos en el Hospital Universitario
Dr. José Eleuterio González y su correlación clínica

Por

ADRIÁN CAMACHO ORTIZ

Como requisito para obtener el Grado de
DOCTOR EN MEDICINA

Agosto, 2015

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



Epidemiología molecular de aislamientos clínicos de
Clostridium difficile obtenidos en el Hospital Universitario
Dr. José Eleuterio González y su correlación clínica

Por

DR. ADRIÁN CAMACHO ORTIZ

Como requisito para obtener el Grado de
DOCTOR EN MEDICINA

Agosto, 2015

**EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE
CLOSTRIDIUM DIFFICILE OBTENIDOS EN EL HOSPITAL
UNIVERSITARIO DR. JOSÉ ELEUTERIO GONZÁLEZ Y
SUCORRELACIÓN CLÍNICA**

**Dra. Elvira Garza González
Director de Tesis**

**Dr. med. Francisco Javier Bosques Padilla
Co-director de Tesis**

**Dr. med. Javier Ramos Jiménez
Jefe en Función del Servicio de Infectología**

**Dr. med. Edelmiro Pérez Rodríguez
Subdirector de Asistencia Hospitalaria**

**Dr. med. Héctor J. Maldonado Garza
Jefe del Servicio de Gastroenterología**

**Dr. med. Dr. Gerardo Enrique Muñoz Maldonado
Subdirector de Estudios de Posgrado**

DEDICATORIA Y/O AGRADECIMIENTOS

El camino que debe ser recorrido en un proyecto de investigación desde la epifanía hasta el resultado final es un trayecto sinuoso. Aquellos que logran atravesarlo te podrán contar todas las inadvertencias que aparecen en dicho camino.

En el presente camino encontré diversos de estos obstáculos que sin duda pudieron haberme desanimado; digo pudieron ya que en los momentos de mayor cansancio Gisela me preparaba aun otro café mientras Nicolás y Miranda me daban un abrazo y muchos besos de buenas noches; la cafeína y el amor de mi familia me mantuvieron basto de energía (por lejos este último).

Si tienes tan solo un fragmento de la suerte que tuve encontraras a alguien quien amplificara tus ideas, las nutrirá y te hará ver que nada es imposible.... yo tuve a Elvira. Durante 5 años no pude llegar a hacerla decir “eso no lo podemos hacer doctor”...sin embargo lo seguiré intentando.

“Mis residentes” aunque algunos se burlan ya que no son míos, sin embargo los siento míos como un hermano mayor o un padre puede sentirlos; jamás se doblegan ante el trabajo y sin duda hicieron gran parte de este...en orden de aparición: Pedro, Sissy, Álvaro, Dinael, Michel, Erik, Eva, Cinthya, Sandra, Reynaldo e Hiram.

Las Chicas Superpoderosas Samantha, Soraya y Paola que en verdad son superpoderosas, no miento; sólo ponlas en un laboratorio, provee lo que necesitan y retrocede 2 pasos...verás maravillas.

Raúl, Daniel, Perla y Susana hicieron todas esas cosas que en un proyecto de estos no puedes describir claramente pero que claramente no podría hacerse sin ello.

Aida y Felizardo mis padres sin quienes nada en la vida hubiese sido posible y Yeera quien aplaude mis triunfos pequeños como si fuese acreedor a un Nobel. Como dices tú “voy a guardar una copia de esta tesis porque va a valer mucho cuando seas importante”...algún día hermanita.

A todos ustedes les agradezco todo lo que hicieron por este proyecto y por mí.

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO I	8
INTRODUCCIÓN	8
CAPÍTULO II.....	9
MARCO TEÓRICO.....	9
Antecedentes generales	9
Patogénesis	9
Factores de riesgo al desarrollo de ICD	10
Factores del huésped	11
Exposición a espora de <i>C. difficile</i>	11
Alteración de la microbiota normal	11
Exposición a Antibióticos.....	11
Otros Medicamentos	12
Antecedentes directos	13
CAPÍTULO III	15
JUSTIFICACIÓN	15
CAPÍTULO IV.....	16
OBJETIVOS.....	16
Objetivo general	16
Objetivos particulares.....	16
CAPÍTULO V	17
HIPÓTESIS	17
CAPÍTULO VI.....	18
MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
Diseño metodológico del estudio	18
Población del estudio	18
Descripción del diseño.....	18
Criterios de inclusión.....	19
Criterios de exclusión	19
Criterios de eliminación	19
Lugar de referencia y método de reclutamiento	20
Método de evaluación de pacientes	21
Detección de infección	21
Análisis de aislamientos clínicos	21
Método	22
Cultivo de <i>C. difficile</i>	23
Análisis de <i>tcdA</i> , <i>tcdB</i> , <i>cdtA</i> y <i>cdtB</i>	24
Análisis de <i>tcdC</i>	26
Análisis de la deleción intra-marco de <i>tcdC</i>	27
Análisis de deleción de <i>tcdA</i> 3'-Terminal.....	28
GeneXpert	28
Ribotipificación.....	29
Electroforesis en gel por campos pulsados.....	29

Cepa control	34
CAPÍTULO VII.....	35
CÁLCULO DE MUESTRA.....	35
CAPÍTULO VIII.....	36
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	36
CAPÍTULO IX.....	37
DECLARACIÓN BIOÉTICA.....	37
CAPÍTULO X	38
RESULTADOS.....	38
Datos clínicos y población de estudio.....	38
Aislamientos.....	40
CAPÍTULO XI.....	42
DISCUSIÓN.....	42
ANEXOS	45
BIBLIOGRAFÍA	62

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

En las últimas dos décadas, el dramático aumento en la incidencia y severidad de las infecciones por *Clostridium difficile* (ICD) en diversos países a nivel mundial han hecho de éstas un reto para la salud pública mundial [1-5], afectando a grupos de población mayormente vulnerable tale como pacientes con hospitalizaciones prolongadas, críticamente enfermos, edad avanzada entre otros.

Recientemente, se publicaron las guías para el manejo de la ICD [6-7] y en ellas se describe claramente no solo los tratamientos óptimos de la ICD sino las mejores estrategias diagnósticas. La ICD se presenta con un espectro variable de la enfermedad que varía entre la colonización asintomática hasta el megacolon toxico y en estos casos severos se puede requerir de una intervención quirúrgica para su tratamiento [8-9].

Los cambios genéticos y moleculares de *C. difficile* han hecho que este sea un agente patógeno más eficaz y con mayor virulencia. El presente trabajo indaga sobre estas características.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Antecedentes generales

En 1893 Finey describió un caso de diarrea hemorrágica en una mujer joven luego de 10 días de haber sido sometida a cirugía gástrica. El reporte de la autopsia describió los cambios como “colitis diftérica” por la presencia de pseudomembranas similares a las observadas en la difteria. Esta descripción fue realizada más de 40 años antes de la introducción de antibióticos [10]. En 1935 Hall y O'tootle describieron a *Bacillus difficile* como microbiota colónica habitual en neonatos. Durante los años cincuenta los casos de enterocolitis pseudomembranosa fueron atribuidos a *Staphylococcus aureus*, un organismo cuya incidencia había aumentado en pacientes hospitalizados que habían sido expuestos a antibióticos. En 1974 Tedesco [11] realizó un estudio prospectivo de 200 pacientes tratados con clindamicina, en los que detectó diarrea en 21% y colitis pseudomembranosa en el 10% de los pacientes. Tres años después se describió la toxina de *Clostridium difficile* en hámsteres como factor de virulencia [12]. Para la década de los años 80, el metronidazol y la vancomicina fueron establecidos como tratamientos de primera línea para el manejo de *C. difficile*.

Patogénesis

Clostridium difficile es un bacilo Gram positivo, anaerobio y formador de esporas el cual puede formar parte de la microbiota intestinal normal en recién nacidos sanos. [13].

Este organismo se disemina vía fecal-oral y en pacientes hospitalizados puede ser adquirido por medio de la ingesta de esporas o bacterias en estado vegetativo a través las manos del personal de salud o del ambiente [14-15].

Las esporas resisten el ácido gástrico y germinan a un estado vegetativo en el intestino [16]. Estos portadores actúan como reservorios para *C. difficile* facilitando la diseminación a otros pacientes. Las principales toxinas producidas por esta bacteria con la A y B [17].

Los sitios de glicosilación de las proteínas Rho en ambas toxinas se traslocan al citosol de las células blanco, en donde producen una despolimerización de actina y de manera subsecuente, muerte celular. Las cepas de *C. difficile* no toxigénicas se consideran no patogénicas y no causan manifestaciones clínicas. A través de los años, la importancia y los respectivos roles de las toxinas A y B han sido debatidas. Por muchos años se consideró a la toxina A como el mayor factor de virulencia, sin embargo en años más recientes se ha vuelto cada vez más evidente que la toxina B también juega un papel importante. [18-19] Algunas cepas, además de producir toxinas A y B también producen una tercera toxina conocida como toxina binaria [20-21].

El rol de la toxina binaria en la patogénesis permanece sin esclarecerse, sin embargo se han encontrado en cepas de *C. difficile* asociadas a brotes nosocomiales de ICD con alta severidad clínica [22].

La variedad de nombres dados a esta cepa refleja diferentes características lo cual se ha demostrado por diversos métodos de tipificación: electroforesis en gel por campos pulsados, análisis de endonucleasas de restricción y reacción en cadena de polimerasas (PCR)- ribotipificación [23]. La colonización asintomática puede presentarse hasta en un 50% de los pacientes hospitalizados [24-25]. En un estudio prospectivo a 15 meses realizado en seis hospitales canadienses en Quebec y Ontario [26], de 4,143 pacientes incluidos, 184 (4.4%) presentó colonización asintomática al momento de admisión a la unidad y 123 (3.0%) padecía colonización por *C. difficile* asociada a cuidados de salud.

Factores de riesgo al desarrollo de ICD

Los factores de riesgo para ICD se pueden dividir de manera general en tres categorías: factores del huésped (estado inmunológico, comorbilidades), exposición a esporas de *C. difficile* (hospitalizaciones, estancias en lugares comunitarios) y factores que alteren la microbiota colónica normal (antibióticos, otros medicamentos, cirugías) [27].

Factores del huésped

Los factores de riesgo incluyen; edad (>65 años), co-morbilidades o condiciones subyacentes, enfermedad inflamatoria intestinal, inmunodeficiencias y VIH, malnutrición y bajo niveles de albúmina sérica [3,28].

Exposición a espora de C. difficile

Algunos factores de riesgo tales como las estancias hospitalarias prolongadas pueden aumentar el riesgo de ICD al aumentar la probabilidad de exposición a esporas de *C. difficile* en el suelo o fomites ambientales. Una estadía mayor a 2 semanas ha mostrado ser un factor de riesgo para ICD [29].

Alteración de la microbiota normal

Exposición a Antibióticos

Es bien sabido que las terapias antimicrobianas juegan un papel central en la patogénesis de ICD, presuntamente por la alteración en la microbiota intestinal normal, siendo así que se crea un escenario perfecto para que *C. difficile* prolifere y produzca toxinas. El riesgo de ICD puede aumentar hasta 6 veces durante la terapia antimicrobiana y en los meses subsecuentes de haberla finalizado [30]. A pesar de que casi todos los antibióticos han sido asociados con ICD, la clindamicina, las cefalosporinas de tercera generación, la penicilina y las fluoroquinolonas se han considerado tradicionalmente como de mayor riesgo al desarrollo de ICD [31-32]. El uso de antibióticos y un tratamiento antimicrobiano de mayor de 10 días se ha sido asociado con un mayor riesgo desde hace varios años [33-34]. Los antibióticos menos asociados a ICD incluyen a los macrólidos, sulfonamidas y tetraciclinas. A pesar de haber antibióticos con mayor relación a ICD, todos los antibióticos han sido reportados como causa de ICD [35]. Aún con una exposición muy limitada tal como una dosis única de antibiótico como profilaxis quirúrgica, ésta puede incrementar el riesgo tanto de colonización

como de infección por *C. difficile* [36-37]. En ambos casos. En algunos casos de ICD éstos no se relacionan con antibióticos, sin embargo éstos son típicamente adquiridos en la comunidad y no en pacientes quirúrgicos o adquiridos en un nosocomio [38].

Otros Medicamentos

Un factor de riesgo para el desarrollo de ICD controversial es el uso de medicamentos supresores de ácido gástrico tales como bloqueadores histamínicos-2 e inhibidores de bomba de protones (IBPs). [39-40].

Una revisión sistemática de incidencias y recurrencias de ICD en pacientes bajo tratamiento con IBPs que incluyó 42 estudios observacionales (30 controles de caso, 12 cohortes, 313,000 participantes) mostró una probable asociación entre el uso de IBPs y la incidencia y recurrencia de ICD. Este riesgo fue aún mayor en pacientes bajo tratamiento antibiótico concomitante [41].

Otros estudios sugieren que esta asociación puede estar siendo confundida con la severidad de base de la enfermedad y la estancia hospitalaria [42]. Dado que los medicamentos supresores de ácido, especialmente IBPs, pueden o no ser prescritos en escenarios quirúrgicos, por lo tanto debe de considerarse la necesidad o no de terapia con IBPs en pacientes con alto riesgo de ICD.

Antecedentes directos

Entre 1989 y 1992, se identificó una cepa de *C. difficile* altamente resistente a clindamicina (cepa J) en grandes brotes de diarrea en 4 hospitales en EUA. Se identificó que el uso de clindamicina es un factor de riesgo para adquirir la infección por esta cepa y estar colonizado con ésta aumenta el riesgo de desarrollar diarrea asociada a *C. difficile*.

Del 2003 al 2006 se observó que las infecciones por *C. difficile* eran cada vez más frecuentes, severas, y refractarias al tratamiento estándar, así como más recaídas que lo que se había descrito. Estas observaciones se hicieron en Norte América y Europa y se han atribuido a una nueva cepa designada como NAP1/BI/027. Esta cepa parece ser más virulenta que otras probablemente por la producción de una toxina extra (toxina binaria), así como mayor cantidad en la producción de toxina A y B comparada con las cepas conocidas hasta entonces. Se observó que el uso de fluoroquinolonas correlaciona con la aparición de ésta cepa [43-44].

En Quebec, Canadá [45] a principios del 2000 se observó un aumento en la frecuencia y severidad de la ICD. En un estudio retrospectivo de 1771 casos en esta región, se demostró que en el 2003, la incidencia de ICD aumentó 4 veces desde 1991, con un incremento hasta 10 veces en pacientes > 65 años. Entre los pacientes hospitalizados, la incidencia aumentó de 3-12 por cada 1000 personas (1991-2002) a 25-43 por cada 1000 (2003-2004), y se observaron en éstos últimos, casos más severos y refractarios al tratamiento; el 10% requirieron admisión a la Unidad de terapia intensiva, el 2.5% fue sometida a colectomía de urgencia y la mortalidad fue del 16% [32].

Al mismo tiempo el Center for Disease Control (CDC, por sus siglas en inglés) notó un aumento en la frecuencia y severidad de la ICD asociada a los cuidados de la salud desde el 2000 en EUA, con un rango de aumento de 31 a 61 casos por cada 100 000 hab entre 1996 y 2003; este rango fue mayor en pacientes > de 65 años (228 por cada 100, 000 hab) [47].

La colonización por *C. difficile* ocurre en el 20-50% de los adultos hospitalizados comparado con el 3% de los adultos sanos en general. Los individuos colonizados son un reservorio para contaminar el ambiente y ya que *C. difficile* es altamente transmisible a través de fómites y puede ser cultivado de casi cualquier superficie incluyendo manos, ropa y estetoscopio del personal de salud; su transmisión es fácil entre los pacientes hospitalizados [48-49].

Es más probable que las exposiciones nuevas a *C. difficile* produzcan enfermedad, mientras que es más probable que los pacientes ya colonizados permanezcan asintomáticos durante su hospitalización. Lo anterior se demostró en un estudio prospectivo en 810 pacientes hospitalizados, en el que 192 ya estaban colonizados y 618 se expusieron por primera vez a este germen; los expuestos por primera vez desarrollaron con más frecuencia enfermedad que los ya colonizados (22 vs 1). Este fenómeno se ha observado aun cuando portadores y pacientes que desarrollan la enfermedad, se exponen a la misma cepa. Incluso los brotes son producidos con frecuencia por una sola cepa de *C. difficile* aun cuando existan otras cepas en ese medio hospitalario; como ocurrió en 2 brotes en el mismo hospital que fueron atribuidas a una sola cepa aunque se aislaron 31 cepas distintas de 98 pacientes en la institución [50].

CAPÍTULO III

JUSTIFICACIÓN

En América Latina, *C. difficile* NAP1/027 se ha detectado en Costa Rica y más recientemente en Chile. En México, los estudios han demostrado las características clínicas de los pacientes con ICD, mostrando un riesgo importante a desarrollar ICD tras el uso de bloqueadores H2, una hospitalización previa de 12 semanas, tras estancia en la UCI o usado clindamicina, pero no se publicado el análisis genético de las cepas y su correlación clínica.

CAPÍTULO IV

OBJETIVOS

Objetivo general

Realizar la caracterización epidemiológica molecular de aislamientos clínicos de *Clostridium difficile* obtenidos en el Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González y determinar su correlación clínica.

Objetivos particulares

1. Identificar pacientes en riesgo de infección por *Clostridium difficile*
2. Aislar y genotipificar *C. difficile* en los pacientes de estudio
3. Determinar la relación clonal de los aislamientos de *C. difficile* mediante electroforesis en gel de campos pulsados
4. Correlacionar la expresión clínica de la enfermedad causada por *C. difficile* con las características genéticas del microorganismo

CAPÍTULO V

HIPÓTESIS

Existe correlación entre las características epidemiológico-moleculares de los aislamientos clínicos de *Clostridium difficile* y las características clínicas de los pacientes.

CAPÍTULO VI

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño metodológico del estudio

Estudio de Cohorte Observacional, Longitudinal, Descriptivo, Prospectivo, No ciego.

Población del estudio

Pacientes hospitalizados en el hospital universitario Dr. José Eleuterio González durante el periodo de estudio: Se incluyeron sólo pacientes adultos de las áreas de urgencia/terapia intensiva, cirugía, medicina interna.

Descripción del diseño

Durante el periodo de estudio se evaluó diariamente a todos los pacientes en búsqueda de los criterios de inclusión. Una vez identificados de les invitó a participar en el estudio. Si decidían participar se firmó el consentimiento informado y se tomaron las muestras. La intervención terapéutica quedó a cargo del equipo médico tratante sin intervención por el presente estudio.

Criterios de inclusión

- Pacientes adultos (16 años o mayores)
- Hospitalizado por > 48hrs o que tuviera < 48hrs pero que hubiera sido hospitalizados durante las 12 semanas previas
- Que hubiera desarrollado diarrea durante su hospitalización
- Que no hubiera otra explicación clara del origen de dicha diarrea
- Que su médico tratante hubiera solicitado una determinación de toxinas A/B de *C. difficile*
- Que hubiera aceptado participar en el estudio con firma de consentimiento informado

Criterios de exclusión

- Muestras tomadas de forma inadecuada
- Que el paciente se rehusara a firmar el consentimiento informado

Criterios de eliminación

- Casos en los cuales la información concerniente a las características del paciente y resultados de pruebas no estuvieran disponibles

Lugar de referencia y método de reclutamiento

Hospital de tercer nivel de atención con 450 camas censables y 60 camas no censables (urgencias y terapias intensivas). Se incluyeron sólo pacientes adultos de las áreas de urgencia/terapia intensiva, cirugía, medicina interna.

Método de evaluación de pacientes

Durante el periodo de estudio se evaluó diariamente a todos los pacientes en búsqueda de los criterios de inclusión. Una vez identificados de les invitó a participar en el estudio. Tras informarles las características y la firma del consentimiento informado se tomaron las muestras de heces la cual se procesaron para determinar la presencia de toxinas de *C. difficile* por el método de Immunocard Toxins AB (Meridian RT) además de guardar la otra muestra para posteriormente someterse a cultivo y PCR. Los resultados del inmunoensayo se hicieron llegar al médico tratante en un periodo <48hrs posterior a la toma de la muestra.

Detección de infección

A las muestras de heces colectadas se les realizaron exámenes para toxinas utilizando la prueba de ImmunoCard Toxins A&B (Meridian Bioscience, Cincinnati, OH, USA). A su vez, las muestras una vez obtenidas de los pacientes fueron con shock de etanol durante 3 horas previas a la inoculación en agar Cicloserina Cefoxitina Fructosa (CCFA). La incubación se logró en una atmósfera anaerobia utilizando el sistema GasPak EZ pouch anaeróbico (Becton Dickinson, Sparks, MA, USA) a 37°C durante 48 horas, las colonias anaeróbicas fueron identificadas por medio del uso de; catalasa, tinción de Gram y el Crystal Identification System (Becton Dickinson).

Análisis de aislamientos clínicos

En todos los aislamientos se realizaron múltiples PCRs para genotipificar *tcdA*, *tcdB*, *cdtA*, *cdtB*, *tcdC*. A su vez, detectamos el gen regulador negativo *tcdC*. Para obtener ADN de los aislamientos clínicos, cinco colonias fueron transferidas en 200µL de 100 mM Tris-HCl, 150 µg de lisozima fue añadida y la mezcla fue incubada a 37°C durante una noche. Por último, se extrajo el ADN genómico mediante el protocolo estándar de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico.

Método

Se resuspendieron colonias de cultivo joven en 200µl de Tris-HCL 100mM y añadieron 150µl de lisozima con ayuda de un aplicador estéril. Se incubaron a 37°C durante toda la noche. Añadimos 200µl de TE 1X con SDS al 1% y 6µl de proteinasa K (10mg/ml). Incubamos a 55°C por 3 horas en baño de agua. Agregamos 250µl de fenol saturado y mezclamos por inversión. Agregamos 250µl de SEVAG (cloroformo-alcohol isoamílico) y mezclamos por inversión. Añadimos 100µl de TE 1X. Agitamos vigorosamente durante 5 minutos. Centrifugamos a 14,000RPM durante 8 minutos, transferimos fase acuosa a un vial nuevo. Volvimos a extraer con 250µl de fenol saturado y mezclamos por inversión. Agregamos 250µl de SEVAG (cloroformo-alcohol isoamílico) y mezclamos por inversión. Añadimos 100µl de TE 1X. Agitamos vigorosamente durante 5 minutos y centrifugamos a 14,000RPM durante 8 minutos. Añadimos 2.33 volúmenes de etanol absoluto, hasta observar la formación de la hebra de ADN, dejamos precipitar a -20°C por 1 hora. Centrifugamos a 14,000RPM durante 5 minutos. Lavamos 2 veces con etanol al 70%. Decantamos el etanol restante y dejamos secar durante toda la noche. Se suspendieron en 100µl de TE 1X. Se incubaron en baño de agua a 65°C durante 15 minutos. Cuantificamos por espectrofotometría o fluorómetro.

Cultivo de C. difficile

Para el cultivo de *C. difficile*, se descongeló un vial de muestra (mantenida a -70°C) a temperatura ambiente. A un vial de 2mL se agregaron 1mL de etanol absoluto y con ayuda de un aplicador estéril, mezclamos la muestra y agregamos aproximadamente 1mL de heces al vial con etanol y se mezcló. Dejamos reposar la mezcla a temperatura ambiente durante 3 horas, se centrifugó a 3000 RPM durante 5 minutos. Posteriormente decantamos el etanol (de preferencia en algodón dentro de una bolsa plástica desechable) y se sembró el sedimento de heces en medio CCFA. Incubamos muestra en condiciones de anaerobiosis a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 5-7 días.

C. difficile aparece como colonias planas a ligeramente elevadas, amarillas transparente, con bordes ligeramente filamentosos. En el medio CCFA las colonias son rodeadas de una zona amarilla. El crecimiento pudo ser examinado con luz UV para fluorescencia amarilla por hasta 1 hora después de interrumpida la atmosfera anaerobia. Después de la exposición al aire ambiental, las colonias podrían tornarse no viables, lo cual se acompañaría de cambio de color a rosado y pérdida de la fluorescencia. Posteriormente se realizó la tinción de Gram para la identificación de la morfología de *C. difficile*, buscamos bacilos Gram positivos. Es importante la búsqueda de esporas ovaes sub-terminales. Para la identificación se realizó una prueba de tolerancia a oxígeno ambiental. Para este fin se realizó resiembra de los aislamientos en anaerobiosis, al igual que en ambiente aerobio para diferenciar de organismos no estrictos. *C. difficile* es además catalasa negativo, por lo cual una sencilla prueba nos ayudó a confirmar este hecho. Se tomó una colonia del aislamiento a analizar y se sumergió por completo dentro de un vial con agua oxigenada; la presencia de una reacción de efervescencia significaba que el aislamiento estudiado era catalasa positiva, de lo contrario se clasificó como catalasa negativo. Para la identificación definitiva se utilizó el kit comercial BBL Crystal TM Identification Systems, Anaerobe ID Kit (BectonDickinson) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Análisis de *tcdA*, *tcdB*, *cdtA* y *cdtB*

Los genes *tcdA*, *tcdB*, *cdtA* y *cdtB* fueron amplificados utilizando un método PCR multiplex [51]. El volumen total fue de 25 μ L, el cual se constituyó por 2.5 μ L de 10 \times PCR buffer, 100 ng de ADN, 3mM MgCl₂, 200 μ M de cada dNTP y 1 U de polimerasa Taq (Bioline, London, UK), y los primers *tcdA*-F3345, *tcdA*-R3969, *tcdB*-F5670, *tcdB*-R6079A, *tcdB*-R6079B, *cdtA*-F739A, y *cdtA*-F739B fueron utilizados (Tabla 1). La condiciones de termociclado fueron las siguientes: 3 min a 94°C; seguido de 35 ciclos de 50 s a 94°C, 40 s a 56°C, y 50 s a 72°C; y una extensión final de 3 min a 72°C.

Tabla 1. Primers utilizados para tipificación de *C. difficile*.

NOMBRE	SECUENCIAS (5'3'')	CONCENTRACIÓN (μ M)
tcdA-F3345	GCATGATAAGGCAACTTCAGTGGTA	0.6
tcdA-R3969	AGTTCCTCCTGCTCCATCAAATG	0.6
tcdB-F5670	CCAAARTGGAGTGTTACAAACAGGTG	0.4
tcdB-R6079A	GCATTTCTCCATTCTCAGCAAAGTA	0.2
tcdB-R6079B	GCATTTCTCCGTTTTTCAGCAAAGTA	0.2
cdtA-F739A	GGGAAGCACTATATTAAGCAGAAGC	0.05
cdtA-F739B	GGGAAACATTATATTAAGCAGAAGC	0.05
cdtA-R958	CTGGGTTAGGATTATTTACTGGACCA	0.1
cdtB-F617	TTGACCCAAAGTTGATGTCTGATTG	0.1
cdtB-R878	CGGA TCTCTTGCTTCAGTCTTTATAG	0.3
C1	TTAATTAATTTTCTCT ACAGCTATCC	0.3
C2	TCTAATAAAAGGGAGATTGTATTATG	0.3
tcdC-F252	CATGGTTCAAAATGAAAGACGAC	0.3
tcdC-R415	GGTCATAAGTAATACCAGTATCATATCCTTTC	0.3
NK9	CCACCAGCTGCAGCCATA	0.17
NKV011	TTTTGATCCTATAGAATCTAACTTAGTAAC	0.17
16S	GTGCGGCTGGATCACCTCCT	0.2
23S	CCCTGCACCCTTAATAACTTGACC	0.2

Se utilizó una PCR múltiple previamente descrita por Persson y colaboradores con algunas modificaciones [51]. El volumen total fue de 25µl consistiendo de 2.5µl de 10X PCR buffer (Bioline, Londres, Reino Unido), 100ng de ADN, 3mM de MgCl₂ (Bioline, Londres, Reino Unido), 200µM de cada dNTP, 2U de Taq polimerasa (Bioline, Londres, Reino Unido) y los primers: *tcdA*-F3345, *tcdA*-R3969, *tcdB*-F5670, *tcdB*-R6079A, *tcdB*-R6079B, *cdtA*- F739A, *cdtA*-F739B, *cdtA*-R958, *cdtB*-F617, *cdtB*-R878 con productos y condiciones de termociclado específicas (Tabla 2 y 3).

Tabla 2. Productos para análisis de <i>tcdA</i>, <i>tcdB</i>, <i>cdtA</i> y <i>cdtB</i>	
<i>tcdA</i>	629 pb
<i>tcdB</i>	410 pb
<i>cdtA</i>	221 pb
<i>cdtB</i>	262.....

Tabla 3. Condiciones de termociclado para análisis de <i>tcdA</i>, <i>tcdB</i>, <i>cdtA</i> y <i>cdtB</i>		
Inicio	94°C	3 min
35 Ciclos	94°C	50 seg
	56°C	40 seg
	72°C	50 seg
Extensión Final	72°C	3 min

Análisis de *tcdC*

Con el fin de amplificar el gen *tcdC* se realizó PCR de acuerdo al método utilizado por Spigaglia et al. [52]. El volumen total fue de 25 μ L, el cual consistió de 2.5 μ L de 10 \times PCR buffer, 100 ng de ADN, 3mM MgCl₂, 200 μ M de cada dNTP, y 1 U de polimerasa Taq. Los primers utilizados fueron C1 y C2 (Tabla 1). La condiciones de termociclado fueron las siguientes: 5 min a 94°C; seguido de 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 50°C, y 1 min a 72°C; concluyendo con una extensión final de 3 min a 72°C. (Tablas 4 y 5).

Tabla 4. Productos para análisis de <i>tcdC</i>	
<i>tcdC</i>	718pb

Tabla 5. Condiciones de termociclado para análisis de <i>tcdC</i>		
Inicio	94°C	5 min
30 Ciclos	94°C	1 min
	50°C	1 min
	72°C	1 min
Extensión Final	72°C	1 min

Análisis de la deleción intra-marco de *tcdC*

Para realizar el análisis de la deleción intra-marco de *tcdC*, se realizó PCR como descrito por Persson et al. [51]. El volumen total fue de 25 μ L, el cual consistió de 2.5 μ L de 10 \times PCR buffer, 100 ng de ADN, 3mM MgCl₂, 200 μ M de cada dNTP, y 1 U de polimerasa Taq. Los primers usados fueron *tcdC*-F252 y *tcdC*-R415 (Tabla 1). La condiciones de termociclado fueron las siguientes: 3 min a 94°C; seguido de 35 ciclos de 50 s a 94°C, 40 s a 56°C, y 50 s a 72°C; concluyendo con una extensión final de 3 min a 72°C. (Tablas 6 y 7).

Tabla 6. Productos para análisis de deleción <i>tcdC</i>	
Deleción interna de 54 pb	108pb
Deleción interna de 39 pb	126pb
Deleción interna de 18 pb	144pb
Deleción interna de 0 pb	162pb

Tabla 7. Condiciones de termociclado para análisis de deleción <i>tcdC</i>		
Inicio	94°C	3 min
37 Ciclos	94°C	50 seg
	56°C	40 seg
	72°C	15 seg
	72°C	3 min
Extensión Final	72°C	3 min

Análisis de deleción de *tcdA* 3'-Terminal

Para la realización del análisis de deleción de *tcdA* 3'-terminal, la mezcla reactiva consistió en 25 µL, el cual contenía 2.5 µL de 10× PCR buffer, 100 ng de ADN, 3mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 1 U polimerasa Taq y los primers NK9 y MNKV011 [53].

Se realizó una PCR de acuerdo al método descrito por Kato y colaboradores [53] con algunas modificaciones. El volumen total fue de 25µl consistiendo de 2.5µl de 10X PCR buffer (Bioline, Londres, Reino Unido), 100ng de ADN, 3mM de MgCl₂ (Bioline, Londres, Reino Unido), 200µM de cada dNTP, 2U de Taq polimerasa (Bioline, Londres, Reino Unido) y los primers: NK9 y NKV011 (Tabla 1). El análisis se realizó con productos y condiciones de termociclado específicos mismas que fueron las siguientes: 6 min a 94°C; seguido de 37 ciclos de 20 s a 94°C, 30 s a 55°C, y 2 min a 60°C; concluyendo con una extensión final de 3 min at 60°C. (Tablas 8 y 9).

Tabla 8. Productos para análisis de deleción de <i>tcdA</i> 3'-Terminal	
<i>tcdA</i>	2535 pb
<i>tcdA</i> con deleción	714.....

Tabla 9. Condiciones de termociclado para análisis de deleción <i>tcdA</i> 3'-Terminal		
Inicio	94°C	6 min
37 Ciclos	94°C	20 seg
	55°C	30 seg
	60°C	120 seg
	60°C	3min

GeneXpert

La prueba Xpert para *C. difficile*/Epi (Cepheid, CA) fue realizada como se encuentra descrita por el fabricante. Cada una de las muestras con cultivos positivos fue colocado en un medio reactivo el cual fue agitado por 10 s, por medio de una pipeta de Pasteur, la solución fue pipeteada en el cartucho tras lo cual éste fue colocado en el instrumento Xpert. La prueba fue realizada utilizando el programa prueba GeneXpert para *C. difficile*.

Ribotipificación

Las reacciones de amplificación fueron realizadas de acuerdo al método descrito por Bidet et al. [54]. La mezcla reactiva consistió de 25 μL , conformado por 2.5 μL de 10 \times PCR buffer, 100 ng de ADN, 3mM MgCl_2 , 200 μM de cada dNTP, 1 U de polimerasa Taq y los primers 16S y 23S (Tabla 1). Las condiciones de termociclado fueron las siguientes: 6 min a 94°C; seguido de 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 57°C, y 1 min a 72°C; concluyendo con una extensión final de 7 min a 72°C. Los productos de amplificación fueron sometidos a electroforesis a través de 2.5% de gel de agarosa teñido con bromuro de etidio durante 6 h a 85 V y luego analizados en una mesa ultravioleta con el software LabWorks Image Acquisition and Analysis Software Version 4.5.00.0 para Windows (UVP, Inc., Upland, CA, USA). *C. difficile* ATCC 9689 y ATCC 9689 fueron usados como control.

Electroforesis en gel por campos pulsados

PFGE fue realizada de acuerdo al método de Alonso et al. con modificaciones mínimas [55]. Se realizaron tres cultivos bacterianos en agar CCFA previo inicio, posteriormente se inoculó en un medio tioglicolato líquido (FTM) y se incubó por 24 h a 37 °C. Posteriormente, 2 mL de la mezcla FTM fue centrifugada para obtener sedimento bacteriano. El sedimento fue lavado una vez con 1mL de buffer de suspensión celular posteriormente se suspendió de nuevo en 410 μL de buffer de suspensión celular. A cada suspensión bacteriana se le agregó 150 μL de agarosa al 1.5% y se mezclaron completamente. La mezcla se transfirió a la placa con pocillos (35 μL para cada pocillo) y se dejó solidificar a 4°C por 10–15 min. Los pocillos solidificados fueron incubados en 1 mg mL^{-1} de solución de lisozima (100 μL de 25 mg mL^{-1} caldo lisozima más 2.5 mL de buffer lisozima) por 2 h a 37°C. Se retiró la lisozima, y los pocillos fueron enjuagados con solución salina. Los pocillos se incubaron con 20 U mL^{-1} solución proteínasa K (100 μL de >600 U mL^{-1} caldo proteínasa K en 2.5 mL de buffer de reacción de proteínasa K) a 50°C durante una noche (17 h). Posteriormente, los pocillos fueron lavados 4 veces con 1 \times buffer de lavado por 30 min con agitación a temperatura ambiente. Como siguiente paso los pocillos fueron incubados por 1 h con 1 mL de 1 \times buffer enzima de restricción a temperatura ambiente y después durante la noche en 300 μL de 1 \times buffer enzima de restricción el cual contenía 30–50 U de la enzima de restricción SmaI a 30°C. Tras digestión, el buffer con enzima de restricción fue retirado y los pocillos fueron incubados por

30 min en 1× buffer de lavado. Los pocillos fueron cargados en gel de agarosa al 1% con 0.5× buffer Tris-borato-EDTA con tiourea (200 μM). Se realizó electroforesis a 6 V por 22 h con tiempos pulsados iniciando a 1 s y terminando a 35 s usando el CHEF-DR III Pulsed-Field Electrophoresis System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

1º día

1. Se sembraron aislamientos en agar CCFA en placa en anaerobiosis por 24 horas. Si era un aislamiento recién descongelado, se repitió este paso dos veces más

2º día

1. A partir de cultivo anterior inoculamos una asada (una sola colonia) en 5ml de medio líquido tioglicolato
2. Se incubó hasta fase exponencial (24 horas) a 37°C

3º día

1. Acomodamos los portaobjetos de las muestras a trabajar y se expusieron a luz ultravioleta durante 15 minutos
2. Pasamos 2ml de cultivo líquido a un vial Eppendorf nuevo y se centrifugó por 5 minutos a 14000RPM
3. Eliminamos todo el sobrenadante sin remover la pastilla
4. Se añadió la pastilla 1ml de PIV frío, agitamos en vórtex hasta disolver y centrifugamos por 5 min a 14000RPM
5. Se eliminó el PIV de cada tubo
6. Se añadió 410μl de PIV a cada muestra y agitamos en vórtex para disolver la pastilla
7. Fundimos agarosa al 1.5% en microondas y mantuvimos entre 40-42°C. (150μl de agarosa por cada muestra)
8. Colocamos 150μl de agarosa fundida a cada tubo, uno por uno, agitamos en vórtex, hacer una muestra a la vez para evitar que se solidificara la agarosa
9. Preparación de un disco: Se colocaron 35μl de la muestra con agarosa sobre una superficie de vidrio forrada con papel parafilm (preparamos entre 5-7 discos por muestra)
10. Se dejaron enfriar los discos a -20°C por 5 minutos y fueron pasados a un tubo de 15ml
11. Se prepararon lisozima, lisostafina y RNAsa a concentraciones de 10mg/ml

Tabla 10. Preparación lisozima, lisostafina y RNAsa				
Reactivo	Volumen	Cantidad	Para 24rxn	Para 31 rxn
Lisozima	10µl	0.1mg /muestra	0.0024g	0.0031g
RNAsa*	5µl	10µl / muestra	240µl	310µl
Lisostafina*	10µl	0.05mg/muestra	0.0012	0.00155
Volumen Total			23.760mL	30.690mL
*Se encuentra a una concentración de 5mg/mL				

12. Añadimos enzimas al buffer EC que cambió a EC-lisis y dejamos a temperatura ambiente (preparamos 1ml de EC por muestra)
13. Se añadió 1ml de EC-lisis al tubo y se llevó a fondo los discos, no agitamos mucho para evitar que se rompieran
14. Se incubó 2 horas a 37°C
15. Preparamos solución ESP, 1ml por muestra: añadimos 1mg de proteinasa K a 1ml de ES. Se preparó en el momento
16. Decantamos el sobrenadante de EC-lisis con una gasa estéril
17. Añadimos 1ml de solución ESP e incubó toda la noche a 50°C (17h)

4º día

1. Se filtró la solución con una gasa estéril, añadimos 13ml de TE 1X
2. Agitamos por inversión y realizamos 4 lavados cada 30 minutos

5º día

1. Se preparó buffer para restricción

Tabla 11. Preparación de buffer de restricción			
Reactivo	1ª Reacción	24 rxn	31 rxn
BSA	4µl	96µl	124µl
Buffer	4µl	96µl	124µl
Agua	32µl	768µl	992µl

2. Transferimos con pinzas los discos a un Eppendorf y añadimos 40µl de buffer de restricción (sin enzima), se incubó 1 hora para atemperar. Se transfirieron algunos discos a un tubo Eppendorf sumergiéndolos a 1ml de buffer TE
3. Preparamos enzima

Tabla 12. Preparación de enzima			
Reactivo	1ª Reacción	24 rxn	31 rxn
BSA	4µl	96µl	124µl
Buffer	4µl	96µl	124µl
Agua	31µl	744µl	961µl
Enzima (SmaI)	1µl	24µl	31µl

4. Se colocaron los discos en las paredes del Eppendorf para poder sacar los 40µl del buffer de restricción sin enzima
5. Añadimos 40µl del buffer de restricción con enzima. Se incubó toda la noche a: SmaI a 30°C

6º día

1. Se expusieron a la luz ultravioleta durante 15 minutos los componentes de la placa para gel de agarosa
2. Limpiamos el equipo con agua destilada estéril y una pequeña cantidad de cloro (15ml aproximadamente) y se dejó por 15 minutos, sacamos el agua y se repitió el procedimiento pero sin cloro
3. Se sacaron los discos de la incubación, se colocaron en refrigeración
4. Preparamos el equipo, verificamos que no tuviera corriente y apagamos la bomba
5. Añadimos los 7L de TBE 0.5X con tiourea (200µM) a la cámara y dejamos que alcanzara los 14°C
6. Se preparó el gel de agarosa al 1% con TBE 0.5X y tiourea (200µM), chico (20 muestras) 100ml, grande (30 muestras) 150ml, preparamos un excedente de 10ml
7. Se vació la agarosa a la placa, colocamos el peine, y dejamos 10ml de agarosa a 50°C
8. Agregamos los discos de agarosa, el marcador de PM al principio y al final y las cepas control con un asa desechable sobre un portaobjetos para introducirlo al gel de agarosa

9. Cubrimos los pocillos del gel con la agarosa que estaba a 50°C
10. Colocamos el gel en el equipo y programamos las condiciones para *C. difficile*: T Inicial 1.0s, T Final 35s, volts 6. Tiempo de corrida 22h, velocidad de la bomba 70 a 180mA y temperatura de 14°C

7º día.....

1. Se sacó el gel y se tiñó con bromuro de etidio 1 µg/ml (30 µl) por 10 minutos y enjuagando con agua, observando con luz UV y se tomaron fotos
2. Eliminamos el TBE 0.5X de la cámara y lavamos 2 veces con agua destilada con y sin cloro

Cepa control

La cepa de control utilizada en todas la pruebas fue, *Clostridium difficile* toxigénica ATCC BAA-1805.

CAPÍTULO VII

CÁLCULO DE MUESTRA

Basados en una estimación de 5.04 casos por 1000 egresos (VIDAS AB, sensibilidad de 65-70%) y un nivel de confiabilidad de 95% con un intervalo de confianza de 10 calculamos un total de 58.5 casos anuales.

CAPÍTULO VIII

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis descriptivo. Utilizamos el test de suma Wilcoxon al comparar las medias y prueba exacta de Fisher o Chi-cuadrado para la comparación de variables dicótomas. Se utilizó S.P.S.S ver 18.

CAPÍTULO IX

DECLARACIÓN BIOÉTICA

Este estudio se realizó con la aprobación del Comité de Ética Local de la Escuela de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León (Aprobación MB11-007). Se obtuvo consentimiento informado por escrito aprobado por el Comité de Ética.

CAPÍTULO X

RESULTADOS

Datos clínicos y población de estudio

Durante el periodo de 18 meses de vigilancia, se detectaron 106 pacientes con probable ICD y 36 fueron positivos por prueba de ImmunoCard. A su vez, se identificaron 22 pacientes con cultivos positivos para *C. difficile*, 14 de los cuales tuvieron una prueba positiva por ImmunoCard y 22 resultaron positivos por GeneXpert. (Figura 1)

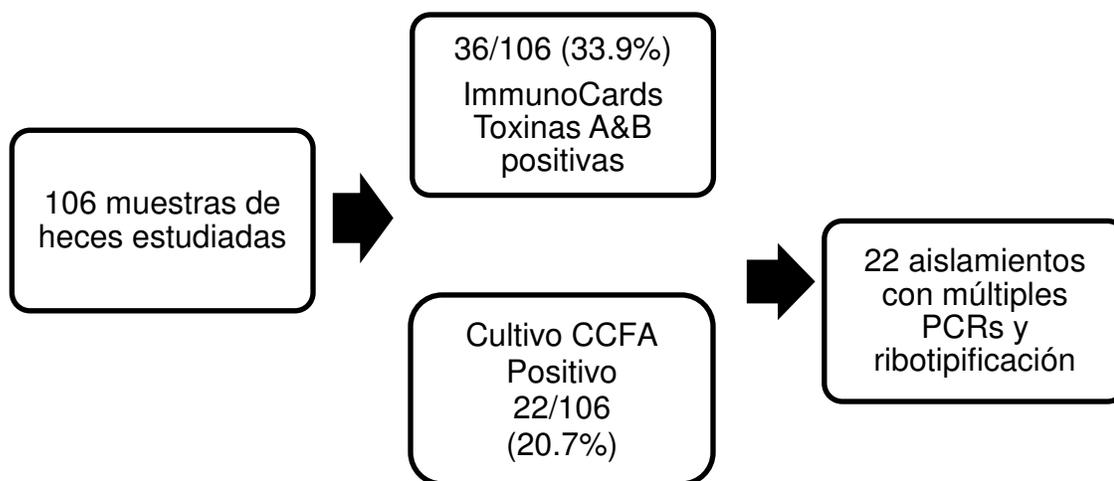


Figura 1. Distribución de estudios realizados en la población

De los 22 pacientes con cultivo positivo, 9 fueron mujeres (40.9%) y la edad mediana fue de 46.5 años de edad. Los factores de riesgo incluyeron; una hospitalización de 16.1 días previa a la detección de la toxina, un uso de antibióticos por 13.5 días en promedio y el uso de 3 antibióticos como mediana. Los antibióticos más utilizados previa detección de toxina fueron cefalosporinas de tercera generación (11/22), clindamicina (11/22) y fluoroquinolonas (7/22). Los pacientes reportaron una mediana de 9 defecaciones al día. Los niveles promedio de leucocitos periféricos, albúmina y creatinina fue de 22,200 células/mL, 2.0 g/dL y 1.69 mg/dL respetivamente. Se observaron diferencias en el uso previo de clindamicina y la mortalidad general entre pacientes con cultivos positivos y cultivos negativos. (Tabla 13)

Características	Cultivo Positivo ICD (n=22)	Cultivo Negativo (n=84)	p
Género masculino	14(63.6)	55 (74.1)	0.978
Edad	46.5 (15-89)	45.6 (15-79)	0.035
Mediana de movimientos intestinales un día previo a diagnóstico de CDI	9 (4-20)	4 (3-10)	0.189
Promedio de IMC	23.0 (15.6-27.8)	25.9 (15.5-38.7)	0.997
Albúmina g/dL	2.0 (1-32)	2.19 (0.9-3.7)	0.370
Creatinina mg/dL	1.69 (0.3-10.56)	0.95 (0.2-5.9)	0.408
Duración de estancia hospitalaria	30.8 (7-115)	30.7 (1-77)	0.942
Días de uso antibiótico previo a síntomas (mediana)	13.5 (0-49)	13.0 (0-90)	0.174
Cefalosporinas de tercera generación	11 (50.0)	28 (32.5)	0.203
Clindamicina	11 (50.0)	19 (22.0)	0.019
Fluoroquinolonas	7 (31.8)	28 (32.5)	0.947
Estancia en UCI previa	1 (4.5)	13 (15.1)	0.336
Cirugía intrabdominal previa	11 (50.0)	41 (48.8)	0.920
Total de mortalidad en 30 días	6 (27.7)	3 (3.5)	0.002

ICD Infección C. Difficile; UCI: Unidad de cuidados intensivos; Valores dados con n(%) o medias ± desviaciones estándar.

El tratamiento fue combinado (vancomicina enteral y metronidazol IV) en 9/22 (40.9%) pacientes y 13/22 (59%) fueron tratados con monoterapia (10 metronidazol, 2 vancomicina y 1 rifaximina). En general la tasa bruta de mortalidad en 30 días fue de 8.4% (9/106). Dos pacientes requirieron colectomía como tratamiento para CDI.

Aislamientos

Se obtuvieron 22 aislamientos de 22 pacientes (edad media de 51.7 años; rango de 20-89 años; 10 mujeres y 12 hombres). La mayoría de los aislamientos fueron recolectados en salas médicas, sin embargo algunas fueron obtenidas de salas de cuidados intensivos y shock trauma. (Tabla 14) Los perfiles genéticos de la toxina fueron evaluados con base en PCR notándose dos tipos de perfiles. La mayoría de los aislamientos, 90.9% (20/22), portaban genes codificados para enterotoxina, citotoxina y las toxinas binarias (*tcdC*, *tcdA*, *cdtA* y *cdtB*) y estas cepas portaban el gen regulador *tcdC* con una deleción 18-bp. Las 20 muestras de dichos aislamientos fueron positivas para cepa toxigénica NAP1/027: *C. difficile* toxigénica positivo/ presuntivamente NAP1/027 positivo.

Aislamiento	<i>tcdA</i>	<i>tcdB</i>	<i>tcdC</i>	Deleción <i>tcdC</i>	<i>cdtA</i>	<i>cdtB</i>	ImmunoCard Toxinas AyB	Sala	Fecha de Colección m/d/a	Edad	Género
100	+	+	+	18	+	+	+	IM	11/9/11	84	F
102	+	+	+	18	+	+	-	IM	11/14/11	64	F
104	+	+	+	18	+	+	-	UCI	11/15/11	40	M
106	+	+	+	0	-	-	+	UCI	12/22/11	59	M
108	+	+	+	18	+	+	+	CG	11/28/11	64	M
111	+	+	+	18	+	+	+	UR	12/2/11	52	M
118	+	+	+	18	+	+	-	CG	1/6/12	57	M
121	+	+	+	18	+	+	+	ST	1/31/12	46	M
122	+	+	+	18	+	+	+	IM	2/8/12	21	F
127	+	+	+	18	+	+	-	UCI	3/2/12	86	F
128	+	+	+	18	+	+	-	IM	3/6/12	89	F
131	+	+	+	18	+	+	+	IM	2/19/12	35	M
135	+	+	+	18	+	+	+	IM	4/18/12	35	M
139	+	+	+	18	+	+	+	CG	4/4/11	60	M
140	+	+	+	18	+	+	+	CP	4/24/11	75	M
156	+	+	+	18	+	+	-	IM	4/17/12	75	F
161	+	+	+	18	+	+	+	ST	4/1/12	20	F
166	+	+	+	18	+	+	+	IM	4/17/12	35	F
169	+	+	+	18	+	+	+	ST	5/2/12	50	M
176	+	+	+	18	+	+	+	IM	5/9/12	42	F
183	+	+	+	18	+	+	-	ST	5/24/12	15	M
186	+	+	+	0	-	-	-	IM	6/1/12	29	F

IM: Medicina Interna; UCI: Unidad de Cuidados Intensivos; CP: Cirugía Plástica; CG: Cirugía General; ST: Shock Trauma; M: Masculino; F: Femenino

El 9.1% (2/22) de los aislamientos restantes fue positivo para *tcdB*, *tcdA* y *tcdC* sin regulador del gen *tcdC* y negativos para los marcadores de toxina binaria *cdtB* y *cdtA* (Tabla 14).

Las dos muestras de las cuales estos aislamientos obtenidos fueron negativos para cepa NAP1/027 toxigénica; *C. difficile* toxigénica positivo/presuntivamente NAP1/027 negativo.

PFGE fue realizada en 17 aislamientos observándose principalmente un patrón característico de la cepa NAP1/027. Únicamente dos aislamientos mostraron un patrón diferente (aislamientos 106 y 186).

Los datos del análisis de ribotipificación mostraron resultados similares con un predominante ribotipo característico de la cepa 027 y únicamente dos aislamientos mostraron un patrón distinto (asilamientos 106 y 186).

CAPÍTULO XI

DISCUSIÓN

C. difficile es un patógeno nosocomial importante asociado a enfermedad diarreica. En este escrito presentamos el primer reporte de *C. difficile* NAP1/027 en México.

Una de las pruebas diagnósticas de ICD es la prueba ImmunoCard. En nuestro estudio analizamos 106 pacientes con probable ICD y de éstos, 36 resultaron positivos por ImmunoCard. Interesantemente, de los 22 pacientes con cultivos positivos para *C. difficile* solamente 14 fueron positivos por prueba de ImmunoCard. De acuerdo al fabricante, la prueba ImmunoCard tiene una sensibilidad de 95.2% y una especificidad de 98.5% con un valor predictivo negativo de 99%.

Sin embargo, con base en nuestros resultados, el cultivo no fue capaz de detectar 12 paciente infectado y la prueba de ImmunoCard falló en la detección de 8 pacientes. Aunque la evaluación de la prueba diagnóstica no fue parte de nuestro objetivo, pareciera ser necesaria la realización de ambas para lograr diagnósticos acertados. El PCR directo de las muestras de heces es un examen diagnóstico ampliamente utilizado en el diagnóstico de ICD ya que posee una alta sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo. Es por esto que PCR se ha recomendado como el estudio diagnóstico preferido para ICD [56].

A pesar de que ningún examen es 100% sensible o específico en la detección de *C. difficile*, las pruebas de citotoxigenicidad y citotoxina celular son actualmente se consideran las pruebas gold standard. Un sesgo en nuestro estudio es que estas pruebas aún no se encuentran disponibles en nuestro laboratorio para la confirmación de los resultados de PCR, ya nos encontramos implementando esta técnica.

Trabajos previos han determinado que aproximadamente uno de cada diez pacientes que se infectan con *C. difficile* morirán [57] y que la mortalidad asociada al ribotipo NAP1/027 incrementa con la edad del paciente. Un estudio reciente ha demostrado que 44.1% de aquellos pacientes infectados eran mayores de 65 años y que 8.1% de ellos murieron dentro de los 30 días siguientes al diagnóstico [58]. En nuestro estudio, 3 de cada 22 pacientes (13.6%) fallecieron de ICD con una edad promedio de 67.6 años. Si tomamos en consideración que todos los pacientes infectados (n=44) (36 pacientes con toxinas positivas más 8 con cultivo positivo y con ImmunoCard negativo), tuvimos una tasa de mortalidad directamente atribuible a ICD de 6.8% (3/44). En este estudio no encontramos relación epidemiológica directa entre los casos de ICD NAP1/027.

Las infecciones por *C. difficile* son también relacionadas con un aumento en el costo de los cuidados de salud debido a una estancia hospitalaria más prolongada [59]. Se ha demostrado que las infecciones nosocomiales de *C. difficile* representan una estancia hospitalaria más prolongada [60]. No obstante, *C. difficile* es el agente nosocomial infeccioso más común, con pacientes, trabajadores de salud y el medio ambiente hospitalario como reservorio, aunado a esto se encuentra como mayor factor de riesgo el tratamiento antibiótico dentro de periodo de 2-3 meses [61]. Los factores de riesgo en nuestros pacientes fueron; estancia hospitalaria de 16.1 días previa a la detección de la toxina, uso de antibiótico en un promedio de 16.2 días y una mediana de 3 antibióticos utilizados.

La tipificación de los aislamientos de *C. difficile* se basó principalmente en uno o más de los tres esquemas de tipificación más comunes, incluyendo análisis de enzima de restricción (la clona epidémica es tipo BI), PFGE (clona epidémica tipo NAP1) y/o ribotipificación por PCR con valores *D* de 0.843 y 0.688 respectivamente [62]. En este estudio se utilizaron ambas metodologías y ambas fueron capaces de mostrar la relación clonal de los aislamientos. Sin embargo, la ribotipificación por PCR es más sencilla de realizar en laboratorio que la PFGE ya que es menos laboriosa.

Es más probable que una presentación más severa de la enfermedad sea causada por la cepa con ribotipo NAP1/027 que por cepas no-027 debido a que las cepas NAP1/027 producen una cantidad excesiva de toxinas A y B como resultado de la delección *tcdC* [44]. En nuestro hospital, la mayoría de los aislamientos presentaron cepa ribotipo NAP1/027 y se encontraba diseminada en diversas áreas en el hospital, es por tanto que se debe de tener especial

cuidado de evitar la propagación de este ribotipo. En resumen, los hallazgos previamente mencionados representan la diseminación.

La diseminación clonal de *C. difficile* es una gran preocupación en el ámbito de cuidado de la salud es por tanto que el aislamiento de *C. difficile* NAP1/027 requiere una continua vigilancia genética para la identificación temprana de nuevos casos. Tras los hallazgos de este estudio se reforzaron las políticas hospitalarias en cuanto al uso de desinfectantes basados en cloro y el aislamiento temprano de pacientes.

En conclusión, los resultados de este trabajo confirman la aparición de *C. difficile* en México. Se requieren datos de vigilancia para valorar la diseminación de ésta en el hospital y establecer factores de riesgo relacionados con la transmisión de la misma en nuestras facilidades. Este es el primer reporte de *C. difficile* ribotipo NAP1/027 en México.

ANEXOS

American Journal of Infection Control 42 (2014) e71–e73



Contents lists available at ScienceDirect

American Journal of Infection Control

journal homepage: www.ajicjournal.org



Brief report

The effect of pharmacy restriction of clindamycin on *Clostridium difficile* infection rates in an orthopedics ward



Nora Cecilia Cruz-Rodríguez MD^a, Raúl Hernández-García MD^a,
Ana Gabriela Salinas-Caballero MD^a, Edelmiro Pérez-Rodríguez MD^b,
Elvira Garza-González PhD^c, Adrián Camacho-Ortiz MD^{a,d,*}

^aCoordinación de Epidemiología Hospitalaria, Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González," Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México

^bSubdirección de Asistencia Hospitalaria, Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González," Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México

^cServicio de Gastroenterología y Departamento de Patología Clínica, Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González," Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México

^dServicio de Infectología, Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González," Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México

Key Words:

Hospital acquired infection
Antibiotic stewardship
Antibiotics

A high consumption of clindamycin was noted in an orthopedics ward with high rates of *Clostridium difficile* infection (CDI). We restricted clindamycin for the entire ward. A reduction of 88% in CDI (1.07 to 0.12 × 1,000 patients-days, $P = .056$) and 84% for all-cause diarrhea (2.40 to 0.38 × 1,000 patients-days, $P = .021$) was achieved. Clindamycin was reduced 92.61% without an increase in other antibiotics. We identified high consumption of clindamycin as a risk factor for CDI.

Copyright © 2014 by the Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology, Inc. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Prior exposure to antimicrobial agents has been identified as a risk factor for *Clostridium difficile* infection (CDI).¹ The most common agents predisposing to CDI have been fluoroquinolones, clindamycin, or broad-spectrum cephalosporins.² Restricting exposure to antibiotics associated with increased CDI is an intuitively attractive approach to reduce CDI rates; however, there are few studies that demonstrate the successful implementation of antibiotic prescribing interventions to decrease these rates.^{1,3,4} During the months of May and June of 2012, we registered a notable increase in CDI in the orthopedics ward and identified a ward-wide high consumption of clindamycin. The aim of our study was to assess the effect of clindamycin restriction on CDI rates in an orthopedics ward in a university teaching hospital in Mexico.

METHODS

We performed an interventional 23-month study that consisted of 2 periods: a 7-month baseline period (December 2011 through

June 2012) and a 16-month intervention period (July 2012 through October 2013). The orthopedics ward unit is a 48-bed area (37 adult beds and 11 pediatric beds) with a mean of 1,200 admissions per year. This orthopedics ward unit primarily hospitalizes patients with fractures because of motor vehicle accidents, gunshot wounds, and multiple trauma.

The intervention period consisted of a pharmacy restriction of clindamycin for the entire orthopedics ward. Only patients with a previous infectious disease consult could receive clindamycin in their antibiotic scheme. Staff members were informed of the restriction and were instructed to use alternative antibiotic schemes during small group and ward academic meetings. Metronidazole was preferred for use in contaminated wounds and empiric anaerobic bacteria coverage. Infectious diseases consultants participated in the treatment of all CDI cases, and, in other cases, the attending physician actively solicited a consult.

During both periods, the same personnel from the infection control unit maintained active surveillance for patients with diarrhea, defined as passage of 3 or more unformed stools in the previous 24 hours, fever, and leukocytosis ($>11,000$ white blood cells/mm³). In suspected cases, stool samples were sent for detection of toxin A/B (ImmunoCard Toxins A&B; Meridian Bioscience, Inc, Cincinnati, OH). If these patients were toxin A/B positive, they were categorized as CDI; if they were toxin A/B negative, they were

* Address correspondence to: Adrián Camacho-Ortiz, MD, Servicio de Infectología, Coordinación de Epidemiología Hospitalaria, Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González," Universidad Autónoma de Nuevo León, Avenida Francisco I. Madero s/n, Colonia Mitras Centro, Monterrey NL 64460, México.

E-mail address: acamacho_md@yahoo.com (A. Camacho-Ortiz).

Conflict of interest: None to report.

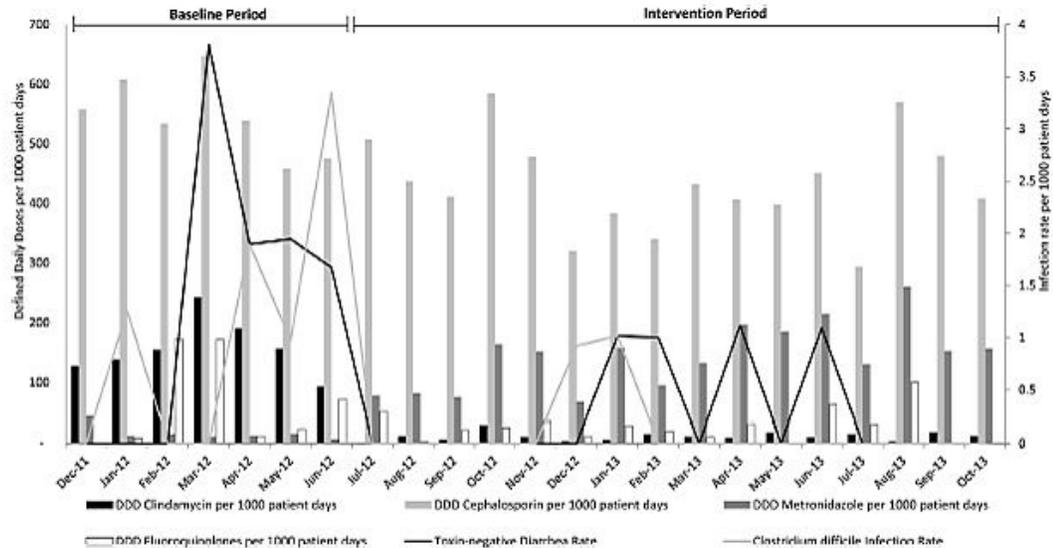


Fig 1. *Clostridium difficile* infection and toxin-negative diarrhea rates and compared to clindamycin, cephalosporins, metronidazole, and fluoroquinolones consumption.

Table 1
Risk factors for CDI of the study population

	Baseline period, n = 684	Intervention period, n = 1,720	P value
Mean age, y	35.12	35.08	.93
Total antibiotic DD (per patient)	5,736 (8.38)	9,923 (5.76)	.13
Length of stay (per patient), days	7,026 (10.27)	16,507 (9.59)	.48
Number of surgeries (per patient)	565 (0.826)	1,415 (0.822)	.24

DD, daily dose.

NOTE. Values in parentheses represent means. The number inside the parenthesis refers to the average length of stay per patient, the number outside the parenthesis refers to the total length of stay; this also applies for the other variables.

labeled as toxin-negative diarrhea. All-cause diarrhea was defined as the combined group of patients with CDI and with toxin-negative diarrhea. We excluded patients with recent use of laxatives or with an alternative cause for diarrhea. Prescription information and pharmacy registry for antibiotic consumption were analyzed for both periods. A continuous hospital-wide hand hygiene program was active throughout the study. Contact precautions for CDI cases were not modified, and no other actions were modified during the study.

RESULTS

In this study, 684 patients were included during the baseline and 1,720 during the intervention period. There was no difference in mean length of hospital stay in either group (10.27 vs 9.59 days, respectively; $P = .483$), and there were no differences in age and gender between the 2 study periods. Risk factors for CDI in both groups were similar (Table 1).

The mean infection rate was reduced from 1.07 per 1,000 hospital-days during the baseline period to 0.12 per 1,000 hospital-days during the intervention period, with a decrease of 88.78%

($P = .056$). Furthermore, toxin-negative diarrhea was reduced from a mean of 1.33 to 0.26 ($P = .076$), and all-cause diarrhea was reduced from a mean of 2.40 per 1,000 hospital-days to 0.38 per 1,000 hospital-days, with a decrease of 84% ($P = .021$) (Fig 1).

Defined daily doses (DDD) of clindamycin per 1,000 patient-days declined from a mean 157.43 during the baseline period to 11.63 in the intervention period, with a decrease of 92.61% ($P = .0002$). Use of cephalosporins declined as well, from 545.14 DDD per 1,000 patient-days during the baseline period to 431.1 during the intervention period, with a decrease of 21% ($P = .00681$). Metronidazole usage increased from 17.56 DDD per 1,000 patient-days to 143.72 ($P = .0002$), and fluoroquinolones decreased from 76.77 to 27.31 DDD per 1,000 patient-days with no statistical significance ($P = .2101$).

DISCUSSION

Clindamycin has been known since the seventies to be a risk factor for the development of CDI.⁵ After we identified it as an important hazard for our orthopedics ward, the restriction of its use was associated with favorable results. In other studies as well as in ours, a revised antibiotic guideline avoiding broad-spectrum antibiotics can prompt a significant decrease in CDI cases.⁶ By establishing an effective antibiotic scheme, clindamycin usage was reduced importantly (157.43 to 11.63 DDD per 1,000 patient-days), an event that did not prompt an increase in cephalosporin and fluoroquinolones use but did cause a consequent increment in metronidazole consumption. Although an alternative antibiotic scheme was discussed with the medical personnel that included cephalosporins, we did not observe an increase in their use. This could represent only a spurious relation. A similar clindamycin restriction in the Hunter Holmes McGuire Veterans Affairs Medical Center, a 703-bed tertiary care hospital, was performed as a control measure during an outbreak of CDI associated to a clindamycin-resistant strain. A sustained decrease in the number of patients with CDI after the restriction was observed (11.7 vs 3.33 cases per month after restriction; $P < .001$). Their use of clindamycin was

reduced by 87%, offset by an increased use of several other antibiotics with antianaerobic activity (imipenem, cefotetan, ticarcillin-clavulanate, piperacillin, and metronidazole).³ Pear et al reported a reduction from an average of 7.7 CDI cases per month to 1.9 cases per month after clindamycin restriction ($P < .001$) during an outbreak associated to a clindamycin-resistant strain.⁴ We noticed that, under similar conditions, the restriction of clindamycin in our orthopedics ward prompted a comparable decrease in CDI (1.07 to 0.12 per 1,000 inpatient-days). In all of the above-mentioned studies, standard infection control measures including isolation precautions and hand hygiene programs were applied before and after clindamycin restriction; however, none of these efforts appeared to alter the frequency of new cases.^{3,4} We acknowledge the fact that other uncontrolled factors could influence CDI rates, but we consider this unlikely because no other intervention was implemented during the study.

In conclusion, in the present study clindamycin restriction was associated with a reduction in CDI and probable CDI in the orthopedics ward without an increase in cephalosporin

use. This proved to be an effective measure for the control of CDI.

References

1. 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;31:431–55.
2. Bartlett JG. Narrative review: the new epidemic of *Clostridium difficile*-associated enteric disease. *Ann Intern Med* 2006;145:758–64.
3. Climo MW, Israel DS, Wong ES, Williams D, Coudron P, Markowitz SM. Hospital-wide restriction of clindamycin: effect on the incidence of *Clostridium difficile*-associated diarrhea and cost. *Ann Intern Med* 1998;128:989–99.
4. Pear SM, Williamson TH, Bettin KM, Gerding DN, Galgiani JN. Decrease in nosocomial *Clostridium difficile*-associated diarrhea by restricting clindamycin use. *Ann Intern Med* 1994;120:272–7.
5. Tedesco FJ, Barton RW, Alpers DH. Clindamycin-associated colitis: a prospective study. *Ann Intern Med* 1974;81:429–33.
6. Talpaert M, Rao GG, Cooper BS, Wade P. Impact of guidelines and enhanced antibiotic stewardship on reducing broad-spectrum antibiotic usage and its effect on incidence of *Clostridium difficile* infection. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66:2168–74.

RESEARCH ARTICLE

First Report of *Clostridium difficile* NAP1/027 in a Mexican Hospital

Adrián Camacho-Ortiz¹, Daniel López-Barrera², Raúl Hernández-García¹, Alejandra M. Galván-De los Santos¹, Samantha M. Flores-Treviño², Jorge M. Laca-Díaz³, Héctor J. Maldonado Garza², Francisco J. Bosques-Padilla², Elvira Garza-González^{2,3*}

1 Servicio de Infectología, Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, Mexico, **2** Servicio de Gastroenterología, Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, Mexico, **3** Departamento de Patología Clínica, Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, Mexico

* elvira_garza_gzz@yahoo.com



Abstract

Background and Objective

Clostridium difficile NAP1/ribotype 027 is associated with severe disease and high mortality rates. Our aim was to determine the prevalence of NAP1/ribotype 027 among *C. difficile* isolates in a tertiary care hospital, and review the main clinical data.

Methods

We included 106 stool samples from 106 patients. Samples were tested for A&B toxins and were cultured on CCFA agar. The genes *tcdA*, *tcdB*, *tcdC*, *cdtA*, and *cdtB* were amplified using PCR in clinical isolates. The *tcdA* 3'-end deletion analysis, PCR-ribotyping, and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) were also performed. Stool samples that were positive for culture were tested by the GeneXpert *C. difficile* assay. Clinical data were collected.

Results

Thirty-six patients tested positive for A&B toxins; and 22 patients had positive culture for *C. difficile*, 14 of which tested positive for the A&B toxins and all 22 patients tested positive by the GeneXpert *C. difficile* assay. Risk factors included an average hospital stay of 16.1 days prior to toxin detection, average antibiotic use for 16.2 days, and a median of 3 antibiotics used. The 30-day crude mortality rate was 8.4%. Six of the 22 patients died, and 3 of those deaths were directly attributed to *C. difficile* infection. The majority of isolates, 90.9% (20/22), carried genes *tcdB*, *tcdA*, *cdtA*, and *cdtB*; and these strains carried the corresponding downregulator gene *tcdC*, with an 18-bp deletion. PFGE was performed on 17 isolates, and one main pattern was observed. Analysis of the ribotyping data showed similar results.

OPEN ACCESS

Citation: Camacho-Ortiz A, López-Barrera D, Hernández-García R, Galván-De los Santos AM, Flores-Treviño SM, Laca-Díaz JM, et al. (2015) First Report of *Clostridium difficile* NAP1/027 in a Mexican Hospital. PLoS ONE 10(4): e0122627. doi:10.1371/journal.pone.0122627

Academic Editor: Markus M. Heimesaat, Charité, Campus Benjamin Franklin, GERMANY

Received: December 11, 2014

Accepted: February 23, 2015

Published: April 27, 2015

Copyright: © 2015 Camacho-Ortiz et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: The authors have no support or funding to report.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Conclusion

The above findings represent the clonal spread of *C. difficile* in our institution, which mainly includes the NAP1/027 strain. This is the first report of *C. difficile* ribotype NAP1/027 in Mexico.

Introduction

Clostridium difficile is a Gram-positive anaerobic bacterium that is able to produce spores. This bacterial species causes a potentially fatal diarrheal disease due to the production of its principal virulence factors toxin A and toxin B, which are encoded by their genes *tadA* and *tcdB* that are located on a 21-kilobase section of chromosomal DNA known as the pathogenicity locus (*PaLoc*). The *tcdC* gene is thought to encode a negative regulator of toxin production. Therefore, enhanced toxin production, and thus increased virulence, is often derived in strains with an aberrant *tcdC* genotype. In addition to toxins A and B, some strains also produce a third toxin known as binary toxin, encoded by *ctdA* and *ctdB*, located outside the *PaLoc* [1]. The spores of this anaerobic bacterium are widely distributed in hospital environments, and their ingestion by patients with an altered gut microflora contributes to colonization and disease [1,2].

The spectrum of *C. difficile* infection (CDI) is very wide, starting from asymptomatic carriage to severe diarrhea that may progress to pseudomembranous colitis and toxic megacolon. The epidemiology of *C. difficile* has changed in the past decade, and a new type has emerged: polymerase chain reaction (PCR) ribotype (RT) 027/North American Pulsed (NAP)-field type 01. Major outbreaks associated with this strain have been described since 2004, first in Canada followed by the USA and Europe [1,3–5]. *C. difficile* NAP1/027 is associated with a severe disease presentation and high morbidity and mortality rates; therefore, it presents a major clinical and financial burden [6]. In Latin America, this strain has been found in Costa Rica and more recently in Chile [7]. In Mexico, studies have shown the clinical characteristics of patients with CDI demonstrating a significant risks of developing CDI following the use of H2 blockers, if they had a prior hospitalization within 12 weeks of diagnosis, if they had been in the intensive care unit, prior use of cephalosporin's, fluoroquinolones [2] and clindamycin [2] but genetic analysis of Mexican isolates have not been published. Thus, our aim was to determine the prevalence of NAP1/027 among *C. difficile* isolates in a tertiary care hospital, and review the main clinical data.

Material and Methods

Ethics Statement

This study was performed with the approval of the Local Ethics Committee of the School of Medicine of the Universidad Autónoma de Nuevo León (Approval MB11-007). Written informed consent approved by the Ethics Committee was obtained from all patients.

When applied, written informed consent was obtained from caretakers, or guardians on behalf of the minors enrolled in this study.

Study population and collection of data

From March 2011 through August 2012, 106 stool samples were analyzed from hospitalized patients aged 16 years or older. We enrolled patients with a hospital stay greater than 48 h or a

recent hospitalization (in the previous 12 weeks) who developed diarrhea (3 or more depositions in the last 24h with a Bristol score of 6 or 7) and in whom there was no obvious explanation of the cause. All subjects agreed to participate in the study by signing an informed consent.

The demographic and clinical data collected in the study were age, gender, and length of hospital stay. In addition, the usage and dosage of antibiotics within the past 2 months were investigated as potential risk factors for CDI. Laboratory tests such as white blood cell (WBC) count, creatinine, and albumin were performed within 24 h of enrollment.

Detection of infection

The stool samples collected were tested for toxins using the ImmunoCard toxins A&B assay (Meridian Bioscience, Cincinnati, OH, USA). Furthermore, fecal samples were collected from patients and were treated with ethanol shock for 3 h prior to inoculation on cycloserine-cefoxitin fructose agar (CCFA). Incubation was achieved in an anaerobic atmosphere using a GasPak EZ anaerobe pouch system (Becton Dickinson, Sparks, MA, USA) at 37°C for 48 h; and anaerobic colonies were identified using catalase, Gram staining, and the Crystal Identification System (Becton Dickinson).

Analysis of clinical isolates

For all isolates, multiple PCR were performed to genotype *tcdA*, *tcdB*, *cdtA*, *cdtB*, *tadC*. We also detected the deletion in the downregulator gene *tcdC*.

To obtain DNA from clinical isolates, five colonies were transferred into 200 μ L of 100 mM Tris-HCl, 150 μ g of lysozyme was added, and the mixture was incubated at 37°C overnight. Finally, genomic DNA was extracted with a standard phenol-chloroform-isoamyl alcohol protocol.

tcdA, *tcdB*, *cdtA*, and *cdtB* analysis

The genes *tcdA*, *tcdB*, *cdtA*, and *cdtB* were amplified using a multiplex PCR method [8]. The total volume was 25 μ L, consisting of 2.5 μ L of 10 \times PCR buffer, 100 ng of DNA, 3mM MgCl₂, 200 μ M of each dNTP, and 1 U of Taq polymerase (Bioline, London, UK), and the primers *tcdA*-F3345, *tcdA*-R3969, *tcdB*-F5670, *tcdB*-R6079A, *tcdB*-R6079B, *cdtA*-F739A, and *cdtA*-F739B were used (Table 1). Thermocycler conditions were as follows: 3 min at 94°C; then 35 cycles of 50 s at 94°C, 40 s at 56°C, and 50 s at 72°C; and a final extension of 3 min at 72°C.

tcdC analysis

PCR was performed to amplify the *tcdC* gene according to the method used by Spigaglia et al. (2002) [9]. The total volume was 25 μ L, consisting of 2.5 μ L of 10 \times PCR buffer, 100 ng of DNA, 3mM MgCl₂, 200 μ M of each dNTP, and 1 U of Taq polymerase. The primers used were C1 and C2 (Table 1). Thermocycler conditions were as follows: 5 min at 94°C; then 30 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 50°C, and 1 min at 72°C; and a final extension of 3 min at 72°C.

tcdC internal in-frame deletion analysis

For *tcdC* internal in-frame deletion analysis, PCR was performed as described by Persson et al. (2011) [8]. The total volume was 25 μ L, consisting of 2.5 μ L of 10 \times PCR buffer, 100 ng of DNA, 3mM MgCl₂, 200 μ M of each dNTP, and 1 U of Taq polymerase. The primers used were *tcdC*-F252 and *tcdC*-R415 (Table 1). Thermocycler conditions were as follows: 3 min at 94°C;

Table 1. Primers used for typing of *C. difficile*.

	Forward and reverse primers (5'3')	Concentration (μM)
tcdA-F3345	GCATGATAAGGCAACTTCAGTGGTA	0.6
tcdA-R3969	AGTTCCCTCCTGCTCCATCAAATG	0.6
tcdB-F5670	CCAAARTGGAGTGTACAAACAGGTG	0.4
tcdB-R6079A	GCATTTCTCCATTCAGCAAAGTA	0.2
tcdB-R6079B	GCATTTCTCCGTTTTTCAGCAAAGTA	0.2
cdtA-F739A	GGGAAGCACTATATTAAGCAGAAGC	0.05
cdtA-F739B	GGGAAACATTATATTAAGCAGAAGC	0.05
cdtA-R958	CTGGGTTAGGATTTACTGGACCA	0.1
cdtB-F617	TTGACCCAAAGTTGATGTCTGATTG	0.1
cdtB-R878	CGGATCTCTTGCTTCAGTCTTTATAG	0.1
C1	TTAATTAATTTCTCTACAGCTATCC	0.3
C2	TCTAATAAAAGGGAGATTGTATTATG	0.3
tcdC-F252	CATGGTTCAAAATGAAAGACGAC	0.3
tcdC-R415	GGTCATAAGTAATACCAGTATCATATCCTTTC	0.3
NK9	CCACCAGCTGCAGCCATA	0.17
NKV011	TTTTGATCCTATAGAATCTAACTTAGTAAC	0.17
16S	GTGCGGCTGGATCACCTCCT	0.2
23S	CCCTGCACCCTTAATAACTTGACC	0.2

doi:10.1371/journal.pone.0122627.t001

then 35 cycles of 50 s at 94°C, 40 s at 56°C, and 50 s at 72°C; and a final extension of 3 min at 72°C.

tcdA 3'-end deletion analysis

For *tcdA* 3'-end deletion analysis, the reaction mixture consisted of 25 μL, containing 2.5 μL of 10× PCR buffer, 100 ng of DNA, 3mM MgCl₂, 200 μM of each dNTP, 1 U of Taq polymerase, and the primers NK9 and MNKV011 [10]. Thermocycler conditions were as follows: 6 min at 94°C; then 37 cycles of 20 s at 94°C, 30 s at 55°C, and 2 min at 60°C; and a final extension of 3 min at 60°C.

GeneXpert *C. difficile*

The Xpert *C. difficile*/Epi assay (Cepheid, CA) was performed as described by the manufacturer. Briefly, each stool sample positive for culture was transferred into a sample reagent vial. The vial was vortexed for 10 s, and the solution was pipetted into the cartridge by using a Pasteur pipette. The cartridge was placed on the Xpert instrument, and the assay was performed using the GeneXpert *C. difficile* assay program.

PCR-Ribotyping

Amplification reactions were performed according to the method described by Bidet et al. [11]. The reaction mixture consisted of 25 μL, containing of 2.5 μL of 10× PCR buffer, 100 ng of DNA, 3mM MgCl₂, 200 μM of each dNTP, 1 U of Taq polymerase, and the primers 16S and 23S (Table 1). Thermocycler conditions were as follows: 6 min at 94°C; then 35 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 57°C, and 1 min at 72°C; and a final extension of 7 min at 72°C. Amplification products were subjected to electrophoresis through a 2.5% agarose gel stained with ethidium bromide for 6 h at 85 V and then analyzed on an ultraviolet table with the LabWorks Image

Acquisition and Analysis Software Version 4.5.00.0 for Windows (UVP, Inc., Upland, CA, USA). *C. difficile* ATCC 9689 and ATCC 9689 were used as a control.

Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)

PFGE was performed according to the method used by Alonso et al. (2002), with minor modifications [12]. A bacterial culture was grown in CCFA agar three times before starting, and then it was inoculated into fluid thioglycollate medium (FTM) and grown for 24 h at 37°C. Next, 2 mL of the FTM mixture was taken and centrifuged to obtain the bacterial pellet. The pellet was washed one time with 1 mL of cell suspension buffer and then resuspended in 410 μ L of cell suspension buffer. Each bacterial suspension was mixed with 150 μ L of 1.5% agarose and mixed thoroughly. The mixture was transferred to plug molds (35 μ L for each plug) and allowed to solidify at 4°C for 10–15 min. The solidified plugs were incubated in 1 mg mL⁻¹ lysozyme solution (100 μ L of 25 mg mL⁻¹ lysozyme stock plus 2.5 mL of lysozyme buffer) for 2 h at 37°C. The lysozyme was removed, and the plugs were rinsed with sterile water. The plugs were incubated with 20 U mL⁻¹ proteinase K solution (100 μ L of >600 U mL⁻¹ proteinase K stock in 2.5 mL of proteinase K reaction buffer) at 50°C overnight (17 h). Then, the plugs were washed four times with 1 \times washing buffer for 30 min at room temperature with agitation. Next, the plugs were incubated for 1 h with 1 mL of 1 \times restriction enzyme buffer at room temperature and then overnight in 300 μ L of 1 \times restriction enzyme buffer containing 30–50 U of the restriction enzyme SmaI at 30°C. After digestion, the buffer with the restriction enzyme was removed and the plugs were incubated for 30 min in 1 \times washing buffer. The plugs were loaded on a 1% agarose gel with 0.5 \times Tris-borate-EDTA buffer with thiourea (200 μ M). Electrophoresis was run at 6 V for 22 h with pulse times starting at 1 s and ending at 35 s using the CHEF-DR III Pulsed-Field Electrophoresis System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Control strain

Toxicogenic strain *Clostridium difficile* ATCC BAA-1805 was used as control strain in all assays.

Statistical analysis

Descriptive analysis was performed. We used Wilcoxon sum test when comparing means and Fisher exact test or Chi square test for comparison of dichotomical variables. S.P.S ver 18 was used

Results

Clinical data of patients

During the 18-month surveillance period, we screened 106 patients with probable CDI, and 36 tested positive with the ImmunoCard assay. Furthermore, we found 22 patients with a positive culture for *C. difficile*, 14 of which tested positive with the Immuno Card assay and all 22 were positive by the GeneXpert assay. (Fig 1)

Of the 22 patients with a positive culture, 9 were women (40.9%) and the median age was 46.5 years old. Risk factors included an average hospital stay of 16.1 days prior to toxin detection, average antibiotic use for 13.5 days, and a median of 3 antibiotics used. The most common antibiotics used prior to toxin detection were third-generation cephalosporins (11/22), clindamycin (11/22), and fluroquinolones (7/22). Patients had a median of 9 stool movements per day. The average levels of peripheral leukocytes, albumin, and creatinine were 22,200 cells/mL, 2.0 g/dL, and 1.69 mg/dL, respectively. We observed differences in prior use of clindamycin and overall mortality between culture positive and culture negative patients (Table 2)

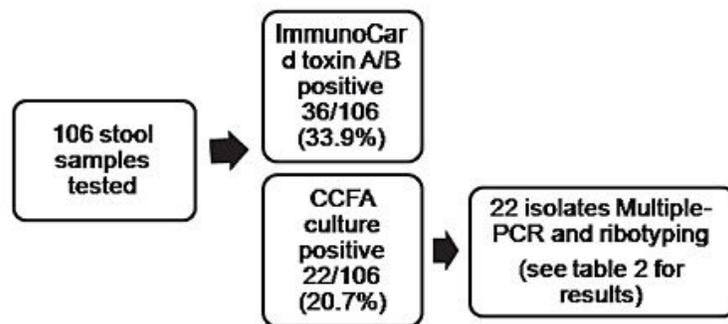


Fig 1. Distribution of tests performed in the study population.

doi:10.1371/journal.pone.0122627.g001

Treatment was combined (enteral vancomycin and IV metronidazole) in 9/22 (40.9%) patients, and 13/22 (59%) had monotherapy (10 metronidazole, 2 vancomycin, and 1 rifaximin). The overall 30-day crude mortality rate was 8.4% (9/106). Two patients required colectomies for treatment of CDI. Six of the 22 patients died, and 3 of those deaths were directly attributed to CDI.

Isolates

Twenty-two isolates were collected from 22 patients (mean age, 51.7 years old; range, 20–89 years old; 10 females, 12 males). Most of these isolates were collected from medical wards, but other wards such as trauma and intensive care units were also involved (Table 3). Toxin gene profiles were assessed based on PCR, and two profile types were noted. The majority of isolates, 90.9% (20/22), carried genes encoding enterotoxin, cytotoxin, and the binary toxins (*tdB*, *tdA*, *cdtA*, and *cdtB*); and these strains carried the corresponding downregulator gene *tdcC*,

Table 2. Comparison of clinical characteristics between culture positive and culture negative patients.

Characteristic	Culture positive CDI (n = 22)	Culture negative (n = 84)	p
Male gender	14 (63.6)	55 (74.1)	0.978
Age	46.5 (15–89)	45.6 (15–79)	0.035
Median bowel movements on the day prior to diagnosis of CDI	9 (4–20)	4 (3–10)	0.189
Average BMI	23.0 (15.6–27.8)	25.9 (15.5–38.7)	0.997
Albumin (g/dL)	2.0 (1–3.2)	2.19 (0.9–3.7)	0.370
Creatinine (mg/dL)	1.69 (0.3–10.56)	0.95 (0.2–5.9)	0.408
Length of hospital stay	30.8 (7–115)	30.7 (1–77)	0.942
Days of antibiotic use before symptoms (median)	13.5 (0–49)	13.0 (0–90)	0.174
Third gen. cephalosporins	11 (50.0)	28 (32.5)	0.203
Clindamycin	11 (50.0)	19 (22.0)	0.019
Fluoroquinolones	7 (31.8)	28 (32.5)	0.947
Prior ICU stay	1 (4.5)	13 (15.1)	0.336
Previous intrabdominal surgery	11 (50)	41(48.8)	0.920
Overall 30 day-mortality	6 (27.7)	3 (3.5)	0.002

CDI: *Clostridium difficile* infection; ICU: Intensive care unit. Values are given as n (%) or mean ± SD.

doi:10.1371/journal.pone.0122627.t002

Table 3. Presence and composition of the cytolethal distending toxin (CDT) locus in the *C. difficile* strains tested.

isolate	<i>tcdA</i>	<i>tcdB</i>	<i>tcdC</i>	<i>tcdC</i> deletion	<i>cdtA</i>	<i>cdtB</i>	ImmunoCard toxins A&B	Ward	Collection date (m/d/y)	Age (y)	Gender
100	+	+	+	18	+	+	+	IM	11/9/11	84	Female
102	+	+	+	18	+	+	-	IM	11/14/11	64	Female
104	+	+	+	18	+	+	-	ICU	11/15/11	40	Male
106	+	+	+	0	-	-	+	ICU	12/22/11	59	Male
108	+	+	+	18	+	+	+	Surgery	11/28/11	64	Male
111	+	+	+	18	+	+	+	ER	12/2/11	52	Male
118	+	+	+	18	+	+	-	GS	1/6/12	57	Male
121	+	+	+	18	+	+	+	Trauma	1/31/12	46	Male
122	+	+	+	18	+	+	+	IM	2/8/12	21	Female
127	+	+	+	18	+	+	-	ICU	3/2/12	86	Female
128	+	+	+	18	+	+	-	IM	3/6/12	89	Female
131	+	+	+	18	+	+	+	IM	2/19/12	35	Male
135	+	+	+	18	+	+	+	IM	4/18/12	35	Male
139	+	+	+	18	+	+	+	GS	4/4/11	60	Male
140	+	+	+	18	+	+	+	PS	4/24/11	75	Male
156	+	+	+	18	+	+	-	IM	4/17/12	75	Female
161	+	+	+	18	+	+	+	Trauma	4/1/12	20	Female
166	+	+	+	18	+	+	+	IM	4/17/12	35	Female
169	+	+	+	18	+	+	+	Trauma	5/2/12	50	Male
176	+	+	+	18	+	+	+	IM	5/9/12	42	Female
183	+	+	+	18	+	+	-	Trauma	5/24/12	15	Male
186	+	+	+	0	-	-	-	IM	6/1/12	29	Female

IM: Internal Medicine; ICU: Intensive Care Unit; PS: Plastic Surgery; GS: General Surgery

doi:10.1371/journal.pone.0122627.t003

with an 18-bp deletion. The 20 stool samples from which these isolates were obtained tested positive for the toxigenic NAP1/027 strain: toxigenic *C. difficile* positive/presumptive NAP1/027 positive.

The remaining 9.1% (2/22) of the isolates were positive for *tcdB*, *tcdA*, and *tcdC*; had no deletion of the downregulator gene *tcdC*; and were negative for the binary toxin marker genes *cdtB* and *cdtA* (Table 3).

The 2 stool samples from which these isolates were obtained tested negative for the toxigenic NAP1/027 strain: toxigenic *C. difficile* positive/presumptive NAP1/027 negative.

PFGE was performed on 17 isolates, and one main pattern characteristic of NAP1 strain was observed. Only two isolates showed a different pattern (isolates 106 and 186).

Analysis of the ribotyping data showed similar results with a predominant ribotype characteristic of 027 strains and only two isolates showing a different pattern (isolates 106 and 186).

Discussion

C. difficile is an important nosocomial pathogen associated with diarrheal disease. In this paper, we present the first report of *C. difficile* ribotype NAP1/027 from Mexico.

One of the most used tests for the diagnosis of CDI is the ImmunoCard assay. In our study, we screened 106 patients with probable CDI, and 36 tested positive with the ImmunoCard assay. Interestingly, among the 22 patients with a positive culture for *C. difficile*, only 14 were positive by the ImmunoCard assay. According to the manufacturer, the ImmunoCard assay has a sensitivity of 95.2%, a specificity of 98.5%, and a negative predictive value of 99%.

However, based on our results, the culture was not able to detect 12 infected patients and the ImmunoCard test missed 8 patients. Even though it was not our objective to evaluate the diagnostic tests, it seems that it is necessary to perform both for a more accurate diagnosis. Direct PCR from stool specimens is a widely used test for the diagnosis of CDI because it has high sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value. In fact, PCR has been recommended as the preferred diagnostic test for CDI [13].

While no test is 100% sensitive and specific for the detection of *C. difficile*, cell cytotoxicogenic and cytotoxin tests are the current gold standards. A bias of our study is that these tests are not still available in our laboratory for confirmation of the PCR results, we are already implementing this technique.

Previous work has determined that approximately one out of ten patients who acquire *C. difficile* will die [14] and that mortality associated with ribotype NAP1/027 infection increases with the patient's age. A recent study has shown that 44.1% of infected patients were older than 65 years and that 8.1% of them died within 30 days after diagnosis [15]. In our study, 3 out of 22 patients (13.6%) died from CDI, with an average age of 67.6 years. If we consider all infected patients ($n = 44$) (36 toxin-positive patients plus 8 culture-positive, ImmunoCard-negative patients), we had a mortality rate directly attributed to CDI of 6.8% (3/44). In our study, we did not find a direct epidemiologic link between the CDI NAP1/027 cases.

C. difficile infection is also related with higher health care costs due to longer hospital stays [16]. It has been shown that hospital-acquired *C. difficile* infection significantly extends the duration of a patient's stay in hospital [17]. Furthermore, *C. difficile* is most commonly a nosocomial infectious agent, with reservoirs being patients, healthcare workers, and the hospital environment; and the major risk for CDI is antibiotic exposure within the preceding 2–3 months [18]. The risk factors for our patients were a hospital stay of 16.1 days prior to toxin detection, average antibiotic use for 16.2 days, and a median of 3 antibiotics used.

Typing of *C. difficile* isolates is mostly based on one or more of three common typing schemes, including restriction enzyme analysis (the epidemic clone is type BI), PFGE (the epidemic clone is NAP1), and/or PCR ribotyping (the epidemic clone is ribotype 027). It has been described that PFGE exhibits better discriminatory power than PCR ribotyping, with D -values of 0.843 and 0.688, respectively [19]. In our study, we used both methodologies and both were able to show the clonal relationship of the isolates. However, PCR ribotyping is much easier to perform in the laboratory than PFGE analysis because it is less laborious.

A more severe disease presentation is more likely to be caused by ribotype NAP1/027 strains than by non-027 strains because ribotype NAP1/027 strains produce excessive amounts of toxins A and B as a result of *tcdC* deletion [4]. In our hospital, most of the isolates were ribotype NAP1/027 and were disseminated in several hospital wards; thus, special care should be taken to avoid the spread of this ribotype. In summary, the above findings represent the clonal spread of *C. difficile* in our institution, which mainly includes the ribotype NAP1/027 strain.

Clonal spread of *C. difficile* is a mayor concern in the healthcare environment and thus the isolation of *C. difficile* NAP1/027 requires an ongoing genetic surveillance for an early identification of new cases. Hospital policies regarding the use of chlorine based disinfectants and earlier isolation precautions were reinforced after these findings.

These data confirm the emergence of *C. Difficile* in Mexico. Surveillance data are needed to assess the dissemination of this strain in the hospital and to establish risk factors related with the transmission of this bacterium in our healthcare facilities. This is the first report of *C. difficile* ribotype NAP1/027 in Mexico.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: ACO EGG. Performed the experiments: DLB SFT RHG AGS JILD. Analyzed the data: EGG ACO FJBP HJMG JILD. Contributed reagents/materials/analysis tools: ACO EGG. Wrote the paper: ACO EGG SFT DLB.

References

- Elliott B, Chang BJ, Gollidge CL, Riley TV (2007) *Clostridium difficile*-associated diarrhoea. Intern Med J 37: 561–568. PMID: [17640189](#)
- Poulanen SM, Simo AE (2004) *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults. CMAJ 171: 51–58. PMID: [15238498](#)
- Kuiper EJ, Coignard B, Tull P (2006) Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe. Clin Microbiol Infect 12 Suppl 6: 2–18. PMID: [16965399](#)
- McDonald LC, Killgore GE, Thompson A, Owens RC Jr., Kazakova SV, Sambol SP et al. (2005) An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. N Engl J Med 353: 2433–2441. PMID: [16322603](#)
- Wamy M, Pepin J, Fang A, Killgore G, Thompson A, Brazier J et al. (2005) Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. Lancet 366: 1079–1084. PMID: [16182895](#)
- Mylonakis E, Ryan ET, Calderwood SB (2001) *Clostridium difficile*—Associated diarrhea: A review. Arch Intern Med 161: 525–533. PMID: [11252111](#)
- Hernandez-Rocha C, Barra-Carrasco J, Pizarro-Guajardo M, Ibanez P, Bueno SM, Sarker MR et al. (2012) Epidemic *Clostridium difficile* ribotype 027 in Chile. Emerg Infect Dis 18: 1370–1372. doi: [10.3201/eid1808.120211](#) PMID: [22840230](#)
- Persson S, Jensen JN, Olsen KE (2011) Multiplex PCR method for detection of *Clostridium difficile* *tcdA*, *tcdB*, *cdtA*, and *cdtB* and internal in-frame deletion of *tcdC*. J Clin Microbiol 49: 4299–4300. doi: [10.1128/JCM.05161-11](#) PMID: [21976756](#)
- Spigaglia P, Mastrantonio P (2002) Molecular analysis of the pathogenicity locus and polymorphism in the putative negative regulator of toxin production (TcdC) among *Clostridium difficile* clinical isolates. J Clin Microbiol 40: 3470–3475. PMID: [12202595](#)
- Kato H, Kato N, Katow S, Maegawa T, Nakamura S, Lyerly DM. (1999) Deletions in the repeating sequences of the toxin A gene of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* strains. FEMS Microbiol Lett 175: 197–203. PMID: [10386368](#)
- Bidet P, Barbut F, Lalande V, Burghoffer B, Petit JC (1999) Development of a new PCR-ribotyping method for *Clostridium difficile* based on ribosomal RNA gene sequencing. FEMS Microbiol Lett 175: 261–266. PMID: [10386377](#)
- Alonso R, Martin A, Pelaez T, Marin M, Rodriguez-Creixems M, et al. Bouza E. (2005) An improved protocol for pulsed-field gel electrophoresis typing of *Clostridium difficile*. J Med Microbiol 54: 155–157. PMID: [15673509](#)
- O'Horo JC, Jones A, Stemke M, Harper C, Safdar N (2012) Molecular techniques for diagnosis of *Clostridium difficile* infection: systematic review and meta-analysis. Mayo Clin Proc 87: 643–651. doi: [10.1016/j.mayocp.2012.02.024](#) PMID: [22766084](#)
- Oake N, Taljaard M, van Walraven C, Wilson K, Roth V, Forster AJ. (2010) The effect of hospital-acquired *Clostridium difficile* infection on in-hospital mortality. Arch Intern Med 170: 1804–1810. doi: [10.1001/archinte.130.10.1804](#) PMID: [21059973](#)
- Pepin J, Valiquette L, Alary ME, Villemure P, Pelletier A, Forget K, et al. (2004) *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity. CMAJ 171: 466–472. PMID: [15337727](#)
- Ghantaji SS, Saif K, Lairson DR, DuPont HL, Garey KW (2010) Economic healthcare costs of *Clostridium difficile* infection: a systematic review. J Hosp Infect 74: 309–318. doi: [10.1016/j.jhin.2009.10.016](#) PMID: [20153547](#)
- Forster AJ, Taljaard M, Oake N, Wilson K, Roth V, van Walraven C. (2012) The effect of hospital-acquired infection with *Clostridium difficile* on length of stay in hospital. CMAJ 184: 37–42. doi: [10.1503/cmaj.110543](#) PMID: [22143235](#)
- Heinlen L, Ballard JD (2010) *Clostridium difficile* infection. Am J Med Sci 340: 247–252. doi: [10.1097/MAJ.0b013e3181e933d8](#) PMID: [20697257](#)
- Killgore G, Thompson A, Johnson S, Brazier J, Kuiper E, Pepin J et al. (2008) 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 46: 431–437. PMID: [18039796](#)



The Brazilian Journal of INFECTIOUS DISEASES

www.elsevier.com/locate/bjid



Original article

Application of the ATLAS score for evaluating the severity of *Clostridium difficile* infection in teaching hospitals in Mexico

Raúl Hernández-García^a, Elvira Garza-González^b, Mark Miller^c,
Giovanna Arteaga-Muller^d, Alejandra María Galván-de los Santos^a,
Adrián Camacho-Ortiz^{a,*}

^a Coordinación de Epidemiología Hospitalaria, Hospital Universitario Dr José Eleuterio González, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Mexico

^b Servicio de Gastroenterología, Hospital Universitario Dr José Eleuterio González, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Mexico

^c Division of Infectious Diseases, McGill University, Montreal, Canada

^d Departamento de Medicina Interna, Hospital Christus Muguerza alta Especialidad, Nuevo León, Monterrey, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 January 2015

Accepted 5 May 2015

Available online xxx

Keywords:

Clostridium difficile

Prediction rule

Mortality

ABSTRACT

Background: For clinicians, a practical bedside tool for severity assessment and prognosis of patients with *Clostridium difficile* infection is a highly desirable unmet medical need.

Setting: Two general teaching hospitals in northeast Mexico.

Population: Adult patients with *C. difficile* infection.

Methods: Prospective observational study.

Results: Patients included had a median of 48 years of age, 54% of male gender and an average of 24.3 days length of hospital stay. Third generation cephalosporins were the antibiotics most commonly used prior to *C. difficile* infection diagnosis. Patients diagnosed with *C. difficile* infection had a median ATLAS score of 4 and 56.7% of the subjects had a score between 4 and 7 points. Patients with a score of 8 through 10 points had 100% mortality.

Conclusion: The ATLAS score is a potentially useful tool for the routine evaluation of patients at the time of *C. difficile* infection diagnosis. At 30 days post-diagnosis, patients with a score of ≤ 3 points had 100% survival while all of those with scores ≥ 8 died. Patients with scores between 4 and 7 points had a greater probability of colectomy with an overall cure rate of 70.1%.

© 2015 Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

Introduction

Clostridium difficile infection (CDI) is a serious threat in the hospital setting and it is now one of the leading causes of healthcare-associated infection.^{1,2} Serious complications such as sepsis, toxic megacolon, need for colectomy, and death are associated with CDI especially in those patients infected by hypervirulent strains.³

The need of a proper instrument for severity assessment has been previously studied with various results.⁴⁻⁶ For clinicians, a practical bedside tool for severity assessment and prognosis is a highly desirable unmet medical need. One of the most practical bedside severity scoring systems is the ATLAS system that has recently been validated⁷ based upon two large clinical trials comparing vancomycin and fidaxomicin (Table 1). We sought to apply the ATLAS score in two Mexican teaching hospitals and compare some of our findings to the published data.

Methods

This prospective study was performed from November 2011 to March 2014. The study was carried out in two teaching hospitals from the northeastern region of Mexico: the University Hospital "Dr. José Eleuterio González" tertiary care hospital with 450 beds in Monterrey and Hospital Christus Muguerza Alta Especialidad a private teaching hospital with 200 beds. Patients were included in the study if they were hospitalized for more than 48 h and had more than three bowel movements in the previous 24 h (Bristol scale 6-7), and no other cause of diarrhea plus a positive *C. difficile* toxin assay (Immunocard toxin AB, Meridian Bioscience Inc.); and/or a colonoscopy showing pseudomembranous colitis. All cases had to have a positive stool culture for toxigenic *C. difficile*. Clinical cure was defined as the absence of diarrhea or inflammatory response at the end of treatment and no recurrence 28 days after the end of treatment. For comparison of dichotomous variables we applied Fishers exact test or Chi-Square test. A p-value of ≤ 0.05 was considered statistically significant.

Results

A total of 102 patients were included with a median of 48 years of age and a slight predominance of males (54%). They had an

Table 1 – The ATLAS scoring system and the number of points per characteristic.

	Points		
	0	1	2
Age (years)	≤ 60	60-70	>70
Temperature (°C)	≤ 37.6	37.6-38.5	>38.6
Leucocytes (K/mL)	≤ 16	16-25	>25
Albumin (g/mL)	≥ 3.5	2.6-3.4	<2.5
Systemic antibiotics	Yes	-	No

average length of hospital stay (LOS) of 24.3 days, 14.6 days of antibiotic therapy, and 5.3 days of diarrhea prior to CDI diagnosis. Third generation cephalosporins were the antibiotics most commonly used prior to CDI diagnosis (47.0%) followed by fluoroquinolones (33.3%) and clindamycin (23.5%). There were 3.9% (4/102) total colectomies and 30-day all-cause mortality was 17.6% (18/102) (see Table 2).

Metronidazole was the treatment for 58/102 patients (56.8%), oral vancomycin in 7/102 (6.8%), and a combination of metronidazole PO/IV and vancomycin PO in 37/102 patients (36.2%). Mortality was statistically different between patients with a serum albumin of ≤ 2.5 g/dL compared with those with higher albumin levels [18 (40%) vs. 4 (7.0%) $p < 0.0001$].

The day on which the patients were diagnosed with CDI, the distribution of ATLAS scores among this cohort can be seen in Table 2. All four patients with a score of eight or greater died during the 30 days after the diagnosis of CDI: three of them as a result of septic complications of CDI and the remaining patient because of cancer related complications. There were four colectomies performed as a therapeutic measure for CDI; two patients with a score of 5 points each, one with a score of 6 and another with a score of 7 all of whom survived. In addition, no deaths or colectomies occurred among the patients having an ATLAS score of 2 points or less.

Table 2 – Characteristics and outcome of the study population of CDI patients.

Demographic characteristics	n = 102
Mean age	49.79 (15-97)
Male gender	55 (53.92%)
Risk factors	
Average BMI	25.69
Total LOS (days)	24.38
LOS before CDI diagnosis	11.89
LOS after CDI diagnosis	12.72
Mean number of antibiotics use before CDI	23.5
Average antibiotic days before CDI	14.61
Postsurgical diagnosis	46 (45.9%)
Clinical characteristics	
Average number of bowel movements	5.59
Days with diarrhea before diagnosis of CDI	5.38
Average leukocyte count	13,897
Fever	55 (53.9%)
Outcome	
≤ 28 day mortality	18 (17.6%)
>28 day mortality	5 (4.9%)
Median ATLAS score	4
Colectomy	4 (3.9%)
Prior antibiotics used	
Third generation cephalosporins	48 (47.05%)
Fluoroquinolones	34 (33.3%)
Carbapenems	26 (25.4%)
Clindamycin	24 (23.52%)
Antibiotics used for the treatment of CDI	
Metronidazole	58 (56.86%)
Vancomycin	7 (6.86%)
Metronidazole + vancomycin	37 (36.27%)

CDI, *Clostridium difficile* infection; LOS, length of stay.

Table 3 – Comparison between colectomy, 28-day mortality and cure rates using the ATLAS score in 2 different groups.

ATLAS score	No. patients	Colectomy (n)	Mortality rate (n)	Cure rate (n=102)	Miller et al. ^a (n=452)	p ^b
0	5	0	0 (0)	100 (5/5)	95.7 (66/69)	0.63
1	5	0	0 (0)	100 (5/5)	93.3 (83/89)	0.55
2	11	0	0 (0)	100 (11/11)	92.7 (63/68)	0.79
3	19	0	5.2 (1)	94.7 (18/19)	89.5 (77/86)	0.54
4	22	0	22.7 (5)	77.2 (17/22)	81.1 (43/53)	0.95
5	13	15.3 (2)	30.7 (4)	69.2 (9/13)	76.1 (35/46)	0.89
6	15	6.6 (1)	53.3 (8)	46.6 (7/15)	85.7 (18/21)	0.03
7	8	12.5 (1)	12.5 (1)	87.5 (1/8)	50.0 (4/8)	0.28
8	2	0	100 (2)	0 (0/2)	55.6 (5/9)	0.52
9	1	0	100 (1)	0 (0/1)	33.3 (1/3)	0.5
10	1	0	100 (1)	0 (0/1)	NA	NA

^a Ref. 7.^b Difference in the cure rate between the current study and Miller et al.

Discussion

A simple bedside scoring system for evaluating severity and prognosis in CDI patients continues to be an important unmet medical need. The ATLAS score is one of the simplest tools for the prediction of cure in patients with CDI. The score was validated in a large database⁷ that was extrapolated from two CDI studies^{8,9} comparing vancomycin and fidaxomicin for the treatment of CDI. In the current study we applied the ATLAS scoring system in a cohort of patients diagnosed with CDI and followed them prospectively. The cure rate was similar to the previous description⁷ of this scoring system with the exception of the group with a score of 6 points, in which our group had a lower cure rate (Table 3). In this prospective observational study, we did not intervene or alter the treatments since those variables were decided by the treating physician. Although the study did not interfere with the treatment decision, the majority of patients with severe disease received vancomycin as suggested by current guidelines and other studies.^{10,11} None of the patients were treated with fidaxomicin since this medication was not available in Mexico at the time of the study. Several severity scores have been applied in patients with CDI with sensitivities ranging from 63.2% to 84.2%, and specificities ranging from 59.4% to 93.9%.¹² The scoring system used in our study was originally applied as a predictor of cure but in the current study we additionally correlated the score with the need for colectomy and mortality rate, thus enhancing its utility.

The decision for performing a total colectomy was evaluated by the treating medical staff and was not controlled by our study investigators. In the current study the four patients with an ATLAS score of ≥ 8 died without a colectomy. This could be a reflection of their severe clinical condition and the reluctance to refer them for surgery, or a direct consequence of the presence of fulminant colitis and/or sepsis due to the CDI.

Conclusion

Our study evaluated the ATLAS score in a teaching hospital scenario finding it a useful tool for routine evaluation of patients with CDI. Those patients with a score of ≤ 3 points had an excellent prognosis while those who had scores between 4

and 7 points had a greater probability of having a colectomy. Patients with scores ≥ 8 had 100% mortality, but it is unclear if that was due to the severity of their colitis or because an early enough colectomy was not performed.

In summary, the ATLAS score at the time of CDI diagnosis in our patient population can be used to predict survival and the need for consideration of colectomy. Additionally, it can aid clinicians in choosing which patients to monitor closely and to intervene in order to prevent or treat CDI-related complications, morbidity and mortality.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

- Magill SS, Edwards JR, Barnberg W, et al. Multistate Point-Prevalence Survey of Health Care-Associated Infections. *N Engl J Med.* 2014;370:1198–208.
- Jarvis WR, Schlosser J, Jarvis AA, Chinn RY. National point prevalence of *Clostridium difficile* in US health care facility inpatients, 2008. *Am J Infect Control.* 2009;37:263–70.
- Loo VG, Poirier L, Miller MA, 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.
- Henrich TJ, Krakower D, Bitton A, Yokoe DS. Clinical risk factors for severe *Clostridium difficile*-associated disease. *Emerg Infect Dis.* 2009;15:415–22.
- Gujja D, FriedenberG FK. Predictors of serious complications due to *Clostridium difficile* infection. *Aliment Pharmacol Ther.* 2009;29:635–42.
- Toro DH, Amaral-Mojica KM, Rocha-Rodriguez R, Gutierrez-Nunez J. An innovative severity score index for *C. difficile* infection: a prospective study. *Infect Dis Clin Pract.* 2011;19:336–9.
- Miller MA, Louie T, Mullane K. Derivation and validation of a simple clinical bedside score (ATLAS) for *Clostridium difficile* infection, which predicts response to therapy. *BMC Infect Dis.* 2013;13:148.
- Louie TG, Miller MA, Mullane KM, et al. Fidaxomicin versus vancomycin for *Clostridium difficile* infection. *N Engl J Med.* 2011;364:422–31.

9. Crook DW, Walker AS, Kean Y, et al. Fidaxomicin versus vancomycin for *Clostridium difficile* infection: meta-analysis of pivotal randomized controlled trials. *Clin Infect Dis*. 2012;55 Suppl 2:S93-103.
10. Zar FA, Bakkanagari SR, Moorthi KM, Davis MB. A comparison of vancomycin and metronidazole for the treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea, stratified by disease severity. *Clin Infect Dis*. 2007;45:302-7.
11. Cohen SH, Gerding DN, Johnson S, 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;31:431-55.
12. Fujitai S, George WL, Murthy AR. Comparison of clinical severity score indices for *Clostridium difficile* infection. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2011;32:220-8.

UNCORRECTED PROOF

BIBLIOGRAFÍA

1. Clements AC, Magalhães RJ, Tatem AJ, Paterson DL, Riley TV. Clostridium difficile PCR ribotype 027: assessing the risks of further worldwide spread. Lancet Infect Dis. 2010;10:395-404.
2. Lessa FC, Gould CV, McDonald LC. Current status of Clostridium difficile infection epidemiology. Clin Infect Dis. 2012;55:65-70.
3. Goudarzi M, Seyedjavadi SS, Goudarzi H, Mehdizadeh Aghdam E, Nazeri S. Clostridium difficile Infection: Epidemiology, Pathogenesis, Risk Factors, and Therapeutic Options. Scientifica. 2014;2014:916826.
4. To KB, Napolitano LM. Clostridium difficile infection: update on diagnosis, epidemiology, and treatment strategies. Surg Infect. 2014;15:490-502.
5. Eckmann C, Wasserman M, Latif F, Roberts G, Beriot-Mathiot A. Increased hospital length of stay attributable to Clostridium difficile infection in patients with four co-morbidities: an analysis of hospital episode statistics in four European countries. Eur J Health Econ. 2013 Oct;14(5):835-46.
6. Surawicz CM, Brandt LJ, Binion DG, Ananthkrishnan AN, Curry SR, Gilligan PH, McFarland LV, Mellow M, Zuckerbraun BS. Guidelines for diagnosis, treatment, and prevention of Clostridium difficile infections. Am J Gastroenterol. 2013 Apr;108(4):478-98
7. Debast SB, Bauer MP, Kuijper EJ; European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the treatment guidance document for Clostridium difficile infection. Clin Microbiol Infect. 2014 Mar;20 Suppl 2:1-26.
8. Zerey M, Paton BL, Lincourt AE, Gersin KS, Kercher KW, Heniford BT. The burden of Clostridium difficile in surgical patients in the United States. Surg Infect. 2007;8:557-66.
9. Abdelsattar ZM, Krapohl G, Alrahmani L, Banerjee M, Krell RW, Wong SL, Campbell DA, Aronoff DM, Hendren S. Postoperative Burden of Hospital-Acquired Clostridium difficile Infection. Infect Control Hosp Epidemiol. 2015 ;36:40-6.

10. Aslam S, Hamill RJ, Musher DM. Treatment of Clostridium difficile-associated disease: old therapies and new strategies. *Lancet Infect Dis* 2005; 5: 549–57.
11. Tedesco FJ. Ampicillin-associated diarrhea: A prospective study. *Am J Dig Dis*. 1975; 20: 295-7.
12. Bartlett JG, Onderdonk AB, Cisneros RL, Kasper DL. Clindamycin-associated colitis due to a toxin-producing species of Clostridium in hamsters. *J Infect Dis*.1977; 136: 701-5
13. Viscidi R, Willey S, Bartlett JG. Isolation rates and toxigenic potential of Clostridium difficile isolates from various patient populations. *Gastroenterology*. 1981;81:5-9.
14. Cheng AC, Ferguson JK, Richards MJ, Robson JM, Gilbert GL, McGregor A, Roberts S, Korman TM, Riley TV; Australasian Society for Infections Diseases. Australasian Society for Infectious Diseases guidelines for the diagnosis and treatment of Clostridium difficile infection. *Med J Aust*. 2011;194:353-8.
15. McFarland LV, Mulligan ME, Kwok RY, Stamm WE. Nosocomial acquisition of Clostridium Difficile infection. *N Engl J Med*. 1989;320:204-10.
16. Shaughnessy MK, Micielli RL, Depestel DD, et al. Evaluation of hospital room assignment and acquisition of Clostridium difficile infection. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2011;32:201-6.
17. Pruitt RN, Lacy DB. Toward a structural understanding of Clostridium difficile toxins A and B. *Front Cell Infect Microbiol*. 2012;16;28.
18. Kuehne SA, Cartman ST, Heap JT, Kelly ML, Cockayne A, Minton NP. The role of toxin A and toxin B in Clostridium difficile infection. *Nature*. 2010;467:711–713.
19. Kuehne SA, Collery MM, Kelly ML, Cartman ST, Cockayne A, Minton NP. Importance of toxin A, toxin B, and CDT in virulence of an epidemic Clostridium difficile strain. *J Infect Dis*. 2014;209:83-6
20. Eckert C, Coignard B, Hebert M, Tarnaud C, Tessier C, Lemire A, Burghoffer B, Noel D, Barbut F; ICD-Raisin Working Group. Clinical and microbiological features of Clostridium difficile infections in France: the ICD-RAISIN 2009 national survey. *Med Mal Infect*. 2013;43:67-74.
21. De Rosa FG, Cavallerio P, Corcione S, Parlato C, Fossati L, Serra R, Di Perri G, Cavallo R. Molecular Characterization of Toxigenic Clostridium difficile in a Northern Italian Hospital. *Curr Microbiol*. 2015;70:154-5.

22. Bacci S, Mølbak K, Kjeldsen MK, Olsen KE. Binary toxin and death after clostridium difficile infection. *Emerg Infect Dis.* 2011;17:976-82.
23. Sundriyal A, Roberts AK, Ling R, McGlashan J, Shone CC, Acharya KR. Expression, purification and cell cytotoxicity of actin-modifying binary toxin from *Clostridium difficile*. *Protein Expr Purif.* 2010;74:42–8.
24. Bartlett JG, Gerding DN. Clinical recognition and diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *Clin Infect Dis.* 2008;46:12–18.
25. Lawrence J. Contemporary management of *Clostridium difficile* associated-disease. *Gastroenterol Endosc News Speed.* 2007;5:35–40.
26. Loo VG, Bourgault AM, Poirier L, Lamothe F, Michaud S, Turgeon N, Toye B, Beaudoin A, Frost EH, Gilca R, Brassard P, Dendukuri N, Béliveau C, Oughton M, Brukner I, Dascal A. Host and pathogen factors for *Clostridium difficile* infection and colonization. *N Engl J Med.* 2011; 3:1693-703.
27. McFarland LV. Renewed interest in a difficult disease: *Clostridium difficile* infections--epidemiology and current treatment strategies. *Curr Opin Gastroenterol.* 2009;25:24-35.
28. Vecchio AL, Zacur GM. *Clostridium difficile* infection: an update on epidemiology, risk factors, and therapeutic options. *Current Opinion in Gastroenterology.* 2012;28:1–9.
29. Huang H, Wu S, Chen R, Xu S, Fang H, Weintraub A, Nord CE. Risk factors of *Clostridium difficile* infections among patients in a university hospital in Shanghai, China. *Anaerobe.* 2014;30:65-9.
30. Hensgens MP, Goorhuis A, Dekkers OM, Kuijper EJ. Time interval of increased risk for *Clostridium difficile* infection after exposure to antibiotics. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67:742–8.
31. Kazakova SV, Ware K, Baughman B, Bilukha O, Paradis A, Sears S, Thompson A, Jensen B, Wiggs L, Bessette J, Martin J, Clukey J, Gensheimer K, Killgore G, McDonald LC . A hospital outbreak of diarrhea due to an emerging epidemic strain of *Clostridium difficile*. *Arch Intern Med.* 2006;166:2518–2524.
32. McCusker ME, Harris AD, Perencevich E, Roghmann M. Fluoroquinolone use and *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Emerg Infect Dis.* 2003;9:730–733.

33. Gerding DN, Olson MM, Peterson LR, Teasley LR, Gebhard RL, Schwartz ML, Lee JT Jr. Clostridium difficile-associated diarrhea and colitis in adults. Arch Intern Med. 1986;146:95–100.
34. Brown E, Talbot GH, Axelrod P, Provencher M, Hoegg C. Risk factors for Clostridium difficile toxin-associated diarrhea. Infect Control Hosp Epidemiol. 1990;11:283–290.
35. Iv EC, Iii EC, Johnson DA. Clinical update for the diagnosis and treatment of Clostridium difficile infection. World J Gastrointest Pharmacol Ther. 2014;5:1-26.
36. Privitera G, Scarpellini P, Ortisi G, Nicastro G, Nicolin R, De Lalla F. Prospective study of Clostridium difficile intestinal colonization and disease following single-dose antibiotic prophylaxis in surgery. Antimicrob Agents Chemother. 1991;35:208–210.
37. Yee J, Dixon CM, McLean AP, Meakins JL. Clostridium difficile disease in a department of surgery. The significance of prophylactic antibiotics. Arch Surg. 1991;126:241–246.
38. Khanna S, Pardi DS, Aronson SL, Kammer PP, Orenstein R, St Sauver JL, Harmsen WS, Zinsmeister AR. The epidemiology of community-acquired Clostridium difficile infection: a population-based study. Am J Gastroenterol. 2012;107:89-95.
39. Cunningham R, Dale B, Undy B, Gaunt N. Proton pump inhibitors as a risk factor for Clostridium difficile diarrhoea. J Hosp Infect. 2003;54:243–245.
40. Dial S, Alrasadi K, Manoukian C, Huang A, Menzies D. Risk of Clostridium difficile diarrhea among hospital inpatients prescribed proton pump inhibitors: cohort and case-control studies. CMAJ. 2004;171:33–38.
41. Kwok CS, Arthur AK, Anibueze CI, Singh S, Cavallazzi R, Loke YK. Risk of Clostridium difficile infection with acid suppressing drugs and antibiotics: meta-analysis. Am J Gastroenterol. 2012;107:1011-9.
42. Shah S, Lewis A, Leopold D, Dunstan F, Woodhouse K. Gastric acid suppression does not promote clostridial diarrhoea in the elderly. QJM. 2000;93:175–181.
43. Musher DM, Logan N, Mehendiratta V, Polk RE, Oinonen M, Pakyz A. Epidemic Clostridium difficile. N Engl J Med 2006; 354: 1199-1203.

44. McDonald LC, Killgore GE, Thompson A, Owens RC, Kazakova SV, Sambol SP. An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. *N Engl J Med* 2005; 353: 2433-41
45. Pepin J, Valiquette L, Cossette B. Mortality attributable to nosocomial *Clostridium difficile*-associated disease during an epidemic caused by a hypervirulent strain in Quebec. *CMAJ* 2005; 173: 1037-42
46. Poxton IR, McCoubrey J, Blair G. The pathogenicity of *Clostridium difficile*. *Clin Microbiol Infect.* 2001; 7: 421-7
47. McDonald LC, Coignard B, Dubberke E, Song X, Horan T, Kutty PK. Recommendations for surveillance of *Clostridium difficile*-associated disease. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2007;28;140-5
48. Loo VG, Poirier L, Millar M, 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
49. McFarland LV, Clarridge JE, Beneda HW, Raugi GJ. Fluoroquinolone use and risk factors for *Clostridium difficile*-associated disease within a Veterans Administration health care system. *Clin Infect Dis* 2007 ;45: 1141-51
50. Persson S, Jensen JN, Olsen KE (2011) Multiplex PCR method for detection of *Clostridium difficile* *tcdA*, *tcdB*, *cdtA*, and *cdtB* and internal in-frame deletion of *tcdC*. *J Clin Microbiol* 2011;49: 4299–4300.
51. Spigaglia P, Mastrantonio P (2002) Molecular analysis of the pathogenicity locus and polymorphism in the putative negative regulator of toxin production (*TcdC*) among *Clostridium difficile* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 40: 3470–3475. PMID: 12202595
52. Kato H, Kato N, Katow S, Maegawa T, Nakamura S, Lyerly DM. (1999) Deletions in the repeating sequences of the toxin A gene of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* strains. *FEMS Microbiol Lett* 175: 197–203.
53. Bidet P, Barbut F, Lalande V, Burghoffer B, Petit JC (1999) Development of a new PCR-ribotyping method for *Clostridium difficile* based on ribosomal RNA gene sequencing. *FEMS Microbiol Lett* 175: 261–266. PMID: 10386377
54. Alonso R, Martin A, Pelaez T, Marin M, Rodriguez-Creixems M, et al. Bouza E. (2005) An improved protocol for pulsed-field gel electrophoresis typing of *Clostridium difficile*. *J Med Microbiol* 54: 155–157. PMID: 15673509

55. O'Horo JC, Jones A, Sternke M, Harper C, Safdar N (2012) Molecular techniques for diagnosis of *Clostridium difficile* infection: systematic review and meta-analysis. *Mayo Clin Proc* 87: 643–651. doi: 10.1016/j.mayocp.2012.02.024 PMID: 22766084
56. Oake N, Taljaard M, van Walraven C, Wilson K, Roth V, Forster AJ. (2010) The effect of hospital-acquired *Clostridium difficile* infection on in-hospital mortality. *Arch Intern Med* 170: 1804–1810. doi: 10.1001/archinternmed.2010.405 PMID: 21059973
57. Pepin J, Valiquette L, Alary ME, Villemure P, Pelletier A, Forget K, et al. (2004) *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity. *CMAJ* 171: 466–472. PMID: 15337727
58. Ghantaji SS, Sail K, Lairson DR, DuPont HL, Garey KW (2010) Economic healthcare costs of *Clostridium difficile* infection: a systematic review. *J Hosp Infect* 74: 309–318. doi: 10.1016/j.jhin.2009.10.016 PMID: 20153547
59. Forster AJ, Taljaard M, Oake N, Wilson K, Roth V, van Walraven C. (2012) The effect of hospital-acquired infection with *Clostridium difficile* on length of stay in hospital. *CMAJ* 184: 37–42. doi: 10.1503/cmaj.110543 PMID: 22143235
60. Heinlen L, Ballard JD (2010) *Clostridium difficile* infection. *Am J Med Sci* 340: 247–252. doi: 10.1097/MAJ.0b013e3181e939d8 PMID: 20697257
61. Killgore G, Thompson A, Johnson S, Brazier J, Kuijper E, Pepin J et al. (2008) 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* 46: 431–437. PMID: 18039796