

Artículo Original/ Original Article

Detección de *Clostridioides difficile* toxigénico a partir de muestras diarreicas por reacción en cadena de la polimerasa, en pacientes hospitalizados en Paraguay. Periodo 2016-2018

*María Orrego, Natalie Weiler, Mario Martínez

Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social, Laboratorio Central de Salud Pública, Departamento de Bacteriología y Micología, Sección Enteropatógenos. Paraguay

Cómo referenciar este artículo/
How to reference this article:

Orrego M, Weiler N, Martínez M. Detección de *Clostridioides difficile* toxigénico a partir de muestras diarreicas por reacción en cadena de la polimerasa, en pacientes hospitalizados en Paraguay. Periodo 2016-2018. Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud. 2020; 18(1): 55-60

RESUMEN

La infección por *Clostridioides difficile* (ICD) se considera la principal enfermedad diarreica asociada a pacientes internados en instituciones de salud, generalmente mayores de 61 años y al uso de antimicrobianos de espectro extendido. Es un bacilo grampositivo anaerobio estricto, esporulado. La alteración de la microbiota colónica por el tratamiento antimicrobiano permite la colonización e infección por este microorganismo, cuya manifestación clínica, se basa en la presentación de cuadro diarreico. El objetivo de este estudio fue detectar *C. difficile* toxigénico a partir de muestras diarreicas por reacción en cadena de la polimerasa en pacientes hospitalizados. Estudio descriptivo de corte transversal, prospectivo que utilizó como un instrumento de medición una ficha epidemiológica conteniendo las variables de estudio y consentimiento informado. En 901 muestras diarreicas, se detectaron las toxinas tcdA, tcdB, ctdA, ctdB y tcdC y del gen de especie. La prevalencia de *C. difficile* toxigénico fue de 19,7% (n=178) de las muestras que dieron positivas para una o ambas toxinas (toxinas A y B); el 98% presentó ambas toxinas. Se observó mayor presentación de ICD en pacientes con una mediana de 68 años, y en el sexo masculino en un 52%. Se evaluó el tratamiento antimicrobiano y el uso de los antimicrobianos, donde, el uso de clindamicina, cefalosporinas, fluoroquinolonas y vancomicina, presentó valores estadísticamente significativos. Los resultados obtenidos permitieron caracterizar epidemiológicamente la infección por este patógeno. Es de gran importancia realizar en forma temprana el diagnóstico y diseñar e implementar estrategias para evitar la emergencia de este patógeno.

Palabras clave: Detección, *Clostridioides difficile*, toxinas, factores de riesgo.

Detection of toxigenic *Clostridioides difficile* from diarrheic samples by polymerase chain reaction in hospitalized patients in Paraguay. Period 2016-2018

ABSTRACT

Clostridioides difficile infection is considered the main diarrheal disease associated with patients hospitalized in health institutions, older than 61 years and the use of extended spectrum antimicrobials. It is a strict anaerobic, sporulated gram-positive bacillus. The alteration of the colonic microbiota by antimicrobial treatment allows colonization and infection by this microorganism, whose clinical manifestation is based on the presentation of the diarrheal syndrome. The objective of this study was to detect toxigenic *C. difficile* from diarrheal samples by polymerase chain reaction in hospitalized

Fecha de recepción: julio 2019. Fecha de aceptación: setiembre 2019

*Autor correspondiente: María Orrego. Laboratorio Central de Salud Pública, Departamento de Bacteriología y Micología, Sección Enteropatógenos. Paraguay

Correo electrónico: maveorrego@gmail.com



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

patients. This was a descriptive, cross-sectional, prospective study in which an epidemiological record containing the study variables and informed consent were used. In 901 diarrheal samples, tcdA, tcdB, ctdA, ctdB and tcdC toxins and the species gene were detected. The prevalence of toxigenic *C. difficile* was 19.7% (n=178) of the samples, positives for one or both toxins (toxins A and B) while 98% presented both toxins. A higher frequency of ICD was observed in male patients (52%) who had a median age of 68 years. Antimicrobial treatment and use of antimicrobials were evaluated, where the use of clindamycin, cephalosporins, fluoroquinolones and vancomycin had statistically significant values. The results allowed infection by this pathogen to be epidemiologically characterized. It is very important to make early diagnosis and design and implement strategies to prevent the emergence of this pathogen.

Keywords: detection, *Clostridioides difficile*, toxins, risk factors.

INTRODUCCIÓN

El *Clostridioides difficile* es un bacilo grampositivo anaerobio estricto, formador de esporas. En su ciclo biológico, existen 2 estados: vegetativo, responsable de las manifestaciones clínicas y caracterizado por la capacidad de producir toxinas, que pueden ser eliminadas por algunos antibióticos; y latente, en forma de esporas, las cuales no produce toxinas y resisten a las condiciones de temperatura, humedad y al efecto de los antibióticos⁽¹⁾.

El contacto con esporas de una cepa de *C. difficile* junto con la alteración de la microbiota colónica frecuentemente por la exposición a tratamiento antimicrobiano permiten la colonización y posterior infección por este microorganismo, cuya manifestación clínica, generalmente, se basa en la presentación de cuadro diarreico⁽²⁾.

Además, la hospitalización prolongada, ingreso a la unidad de cuidados intensivos, edad avanzada, inmunosupresión, la proximidad física con infectados son factores de riesgo de la infección por *Clostridioides difficile* (ICD)⁽³⁾.

La detección de *C. difficile* por métodos moleculares permite el aumento de la especificidad en comparación con métodos convencionales como inmunocromatográficos o ELISA que generalmente se utilizan en las instituciones de salud. Esta metodología permite dar respuestas rápidas al plantel médico para la toma de decisiones, teniendo en cuenta la patogenicidad de esta bacteria y la rápida propagación por medio de fómites y por sus esporas, esta última, dota a la bacteria de mayor resistencia en cuanto a la viabilidad^(3,4).

El diagnóstico laboratorial de la ICD se realiza mediante la detección de las toxinas en las heces⁽⁴⁾. Las cepas toxigénicas poseen un locus de patogenicidad (PaLoc) con los genes de las toxinas A y B (tcdA y tcdB), exotoxinas que principalmente causan la sintomatología de la infección^(4,5). Además, algunas cepas producen la denominada toxina binaria, cuyo papel en la patogénesis no está todavía muy claro y estas se encuentran codificadas por los genes ctdA y ctdB⁽⁶⁾. La sensibilidad de la mayoría de los métodos moleculares suele ser superior al 90% tanto para los métodos que utilizan PCR a tiempo real como los que realizan amplificación iso-térmica, mientras que la especificidad suele alcanzar el 94-99% lo que permite un diagnóstico de laboratorio rápido y certero tanto al clínico como al centro de control de infecciones^(7,8).

El cultivo es un método engorroso y tedioso, debido a la técnica de enriquecimiento, la atmósfera y el tiempo de crecimiento, que hace difícil la recuperación de cepas puras de este patógeno⁽⁸⁾.

En EEUU los datos del CDC muestran que los pacientes con diagnóstico al alta de ICD han aumentado de forma significativa, pasando de 31/100.000 casos en 1996 a 61/100.000 en el año 2003⁽⁹⁾ y la incidencia media por hospitales ha aumentado desde el 2005 hasta 5,5/10.000 días paciente (rango 0-36,3/10.000; y por países 0-19,1)⁽¹⁰⁾.

En Latinoamérica, específicamente en Costa Rica, también se ha descrito a *C. difficile* como el principal agente causal de diarrea nosocomial, con una tasa de infección cercana al 30% de los casos de diarrea, mientras que la cepa hipervirulenta fue encontrada, por primera vez, en otro centro hospitalario de este país con una prevalencia del 54% del total de los aislamientos⁽¹¹⁻¹³⁾. El conocimiento de la epidemiología y de la biología de la ICD es escaso en el hemisferio sur de América. En Chile, Gardilic et al. (2000) evaluaron 27 pacientes hospitalizados con 31 episodios de diarrea asociada a *C. difficile* durante 4 meses, de los cuales solo murió 1 (4%) paciente por megacolon tóxico⁽¹⁴⁾. García et al.

(2007), reportaron que de 156 pacientes con diarrea nosocomial, 55 (35,2%) fueron diagnosticados de ICD⁽¹⁵⁾. Estudios realizados en Brasil por Souza Dias et al. (2010) muestran una incidencia de 3,3/1.000 pacientes hospitalizados y una prevalencia del 27%⁽¹⁶⁾. En Argentina, Legaria et al. (2003), describieron que de 87 pacientes con sospecha de ICD, el 40% eran toxigénico⁽¹⁷⁾.

C. difficile tiene un papel muy importante en las infecciones intrahospitalarias, en Paraguay se conoce poco acerca de la prevalencia de esta infección. El desconocimiento de la epidemiología local, su incidencia y los factores de riesgo relacionados con la ICD dificultan la generación de políticas hospitalarias para la contención o minimización del impacto de estas infecciones, por lo que el objetivo de este trabajo es determinar la prevalencia de *C. difficile* a partir de muestras diarreicas en pacientes hospitalizados, por el método molecular de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio descriptivo de corte transversal, prospectivo, cumpliendo con las cuestiones éticas de estudios poblacionales. Como instrumento de medición se elaboró una ficha epidemiológica conteniendo las variables de estudio a medir y el consentimiento informado, firmado por el paciente o responsable en el momento de la solicitud del estudio. Se estudiaron 901 muestras diarreicas de etiología desconocida, de pacientes hospitalizados o con antecedente de hospitalización previa, y no asociada al uso de lactulosa.

De las muestras remitidas al Laboratorio Central de Salud Pública con solicitud de pedido médico, ficha epidemiológica y consentimiento informado, se procedió a separar la muestra, primero, para la extracción de ADN, en TE 1x, marca Applichem y centrifugado a 6000 rpm por 10 minutos, como pre-tratamiento, para luego proceder a la extracción con equipo automatizado Magpurix y utilizando kit comercial Zinexts compatible con dicho equipo, ambos de Zinexts Life Science Corp. En segundo lugar, se procedió a la crioconservación de las muestras de heces para posterior siembra en caso de dar positivas a algunas de las toxinas estudiadas y desecho de las muestras negativas. Luego de la extracción de ADN, se procedió a detectar las toxinas tcdA y tcdB y el gen de especie por reacción de la cadena de la polimerasa (PCR) de punto final según protocolo Persson et al. 2011⁽¹⁸⁾ y de tiempo real con kit comercial de marca RIDA®. Se utilizó como cepa control *Clostridium difficile* ATCC 9816.

De las muestras con algunas de las toxinas citadas anteriormente, se procedió a la detección de otros genes como las toxinas binarias (ctdA y ctdB), genes del locus de especie y la detección de la mutación del gen tcdC.

La siembra se llevó a cabo en Agar Clostridium de marca Pronadisa de Laboratorios Conda S.A., posterior al enriquecimiento en alcohol etílico de calidad molecular por 30 minutos, se incubó a 37°C por 48 hs., en una atmósfera de anaerobiosis y crioconservación de las cepas puras en BHI-Glicerol a -80°C para estudios posteriores.

Las variables de estudio, fueron sometidas a un formato Excel, codificadas y analizadas con el software EpiInfo 7.

RESULTADOS

De las 901 muestras procesadas, 19.7% (178 muestras) dio positivo para una o ambas toxinas (toxinas A y B). El 98% (174 muestras) del total de positivos presentaban ambas toxinas y el 2% (4 muestras) solo la toxina A. Entre las positivas, no se detectó ninguna cepa portadora de toxinas binarias. Entre las muestras que presentaron ambas toxinas, se detectó la presencia de mutaciones en el gen tcdC en un 2% (3 muestras), lo que generaría una mayor expresión de las toxinas A y B.

Según las características sociodemográficas estudiadas, se observó mayor presentación de ICD en pacientes con una mediana de 68 años con intervalo intercuartílico de 58 a 75 años, y en el sexo masculino en un 52% (111/178).

Respecto a las características clínicas, se midieron las variables de días de tratamiento antimicrobiano, días de estancia hospitalaria y días de síndrome diarreico, donde se observó, un aumento de días en cuanto a la exposición tanto a los antimicrobianos como a estancia hospitalaria en las muestras positivas (casos) en relación a las muestras negativas (controles). No se observó diferencias respecto a los días de síndrome diarreico entre los casos y controles, en el momento de la realización del estudio (Tabla 1).

Tabla 1: Características de los pacientes con presentación de ICD y no ICD.

Características	Casos (n= 178)	Controles (n= 723)
Edad (mediana: IRQ)	68 (58-75)	64 (47-74)
Sexo Femenino (n:%)	67 (54-80)	346 (321-377)
Sexo masculino (n:%)	111 (97-124)	377 (350-403)
Días de antimicrobiano (mediana: IRQ)	11 (7-14)	8 (5-14)
Días de estadía hospitalaria (mediana: IRQ)	16 (8-26)	13 (6-23)
Días de Síndrome diarreico (mediana: IRQ)	3 (2-5)	3 (2-5)

*IRQ: intervalo intercuartílico.

Se evaluó, como posible factor de riesgo, el tratamiento antimicrobiano previo a la aparición de la sintomatología (cuadro diarreico) y el uso de los antimicrobianos de elección para el tratamiento de los pacientes hospitalizados.

El tratamiento con antimicrobianos previo a la solicitud del estudio, el uso de clindamicina, cefalosporinas, fluoroquinolonas y vancomicina, presentaron valores estadísticamente significativos (Tabla 2).

Tabla 2: Evaluación de tratamiento con antimicrobianos como factor de riesgo.

	Casos (%)	Controles	OR (IC 95%)	p
Tratamiento ATB previo			1,91	0.047
Si	167 (9)	642 (89)		
No	11 (6)	81 (11)		
Clindamicina	43 (25)	76(12)	2,57	0.00000
Si	125 (75)	568(88)		
No				
Cefalosporinas			1,73	0.01
Si	37(22)	91(14)		
No	131(78)	560(86)		
Fluoroquinolonas			1,81	0.0002
Si	53(32)	132(20)		
No	115(68)	519(80)		
Meropenem			0,977	0.902
Si	53(32)	207(32)		
No	115(68)	439(68)		
Colistin			0,64	0.1548
Si	13(8)	75(12)		
No	155(92)	574(88)		
Vancomicina			0.56	0.006
Si	34 (20)	201(31)		
No	134 (80)	451(69)		
Metronidazol			0.73	0.288
Si	15(9)	77(12)		
No	153(91)	574(88)		
Piperacilina – Tazobactam			0.89	0.61
Si	36(21)	152(23)		
No	132 (79)	499(77)		
Amoxicilina			1.034	0.95
Si	4(2)	15(2)		
No	164(98)	636(98)		

DISCUSIÓN

Teniendo en cuenta la baja especificidad de los test inmunocromatográficos utilizados generalmente, la tediosidad en el procesamiento del cultivo toxigénico, se implemento el método de PCR para diagnóstico, esto nos permitió, detectar las principales toxinas que caracterizan su patogenicidad.

Estos resultados obtenidos en este estudio, permitió caracterizar epidemiológicamente a este patógeno, en cuanto a la prevalencia, toxinas circulantes, y factores de riesgo relacionados con la infección.

La prevalencia obtenida coincide con otros estudios realizados en la región⁽¹⁹⁻²¹⁾. El muestreo se centró en instituciones de salud pública y privada, por lo que el 90% de las muestras fueron remitidas de instituciones públicas. No se incluyó en el estudio muestras de heces de pacientes pertenecientes a la comunidad, por lo que no se pudo evaluar la prevalencia en ese entorno. En el 98% de las muestras analizadas, se detectaron las

toxinas A y B, por medio de la detección de genes *tcdA* y *tcdB*. No se detectaron toxinas binarias, pero si mutaciones en el gen *tcdC*, lo que podría implicar un aumento toxigénico de las mismas. Estas mutaciones detectadas fueron en el sitio de 18 pb. de dicho gen. Estos resultados coinciden con los reportados en otros estudio^(18,25).

Con respecto al rango etario, en los criterios de inclusión y exclusión de la población de estudio no se limitó, lo que permitió una mayor distribución y mejor delimitación del rango etario con mayor factor de riesgo, por lo que comparando el rango etario tanto en la población de estudio como en la población que dio positiva a las toxinas, se observó un mayor riesgo entre 58 a 75 años de edad. Los días de diarreas, días de internación y días de tratamiento antimicrobiano evaluados, no presentaron variaciones marcadas que indiquen valores específicos que puedan caracterizar o ayudar a diagnosticar clínicamente. Podría deberse, a que en algunos casos los pacientes son derivados de una institución de salud a otra, ya con tratamiento antimicrobiano anterior o cuadro diarreico, que no se registraron en las fichas epidemiológicas o que no eran de conocimiento del plantel de médicos del nuevo nosocomio al cual se derivó. Si se pudo observar que los casos positivos detectados tienen una mayor frecuencia de días tanto de internación hospitalaria y/o de tratamiento antimicrobiano.

Se evaluó el uso de antimicrobianos, encontrándose resultados estadísticamente significativos en alguno de ellos, presentando una mayor implicancia en la presentación de ICD. Es importante destacar que se incluyeron como variables, antimicrobianos de uso frecuente o de elección para el tratamiento de pacientes internados. El 5% (10/178) indico el no uso de antimicrobianos, refiriéndose a pacientes trasplantados, recientemente operados, pacientes oncológicos, entre los cuales, no se detectó ninguna toxina.

En este estudio, se detectaron factores relacionados con la infección por *C. difficile* como la edad avanzada, el uso de antibióticos, la hospitalización previa, lo cual concuerda con lo reportado ampliamente en otros estudios⁽²¹⁻²⁴⁾

Una limitante en cuanto a la recuperación de cepas en este estudio, es que estuvo condicionada por el pre congelamiento realizado a temperaturas de -80°C (el tiempo entre el descongelamiento y la siembra pudo interferir en la viabilidad); así también la remisión de la muestra desde el hospital al laboratorio, en muchas ocasiones, no era la correcta en cuanto a tiempo y condiciones de conservación de la muestra, lo que pudo variar, características fenotípicas y la viabilidad del patógeno.

Sería de gran importancia poder caracterizar molecularmente a las cepas del estudio, relacionando los resultados de prevalencia de toxinas y delección del gen *tcdC*, con subtipos y secuencias tipo obtenidas de métodos como subtipificación molecular y secuenciación de nueva generación.

Este microorganismo emergente que se sitúa entre una de causa de infección nosocomial, por lo tanto, debería considerarse un problema de salud pública en instituciones de salud, debido a su alta transmisibilidad, factores de virulencia, mecanismos de patogenicidad, y posibles cepas epidémicas. Así mismo, es de gran importancia realizar en forma temprana el diagnóstico y diseñar e implementar estrategias para evitar la emergencia de este patógeno.

AGRADECIMIENTO

Este estudio fue realizado en el marco del proyecto Investigación, Educación y Biotecnología aplicadas a la salud apoyado por FOCEM (Fondo para la Convergencia Estructural del Mercosur).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Oñate J, Villegas M, Correa A. Prevalencia y factores relacionados con la infección por *Clostridium difficile* en un centro hospitalario de alta complejidad en Cali (Colombia). *Infectio* 2016. 9-14.
- Alcalá L, Mena A, Niubo J, Marin M. Diagnóstico microbiológico de la infección por *Clostridium difficile*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2016; 34(9):595–602.
- Asensio A, Monge D. Epidemiología de la infección por *Clostridium difficile* en España. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2012; 30 (6):333-37.
- García A, Pérez J, Pulido A, Niubo J, Pérez P, Martín R. Evaluación de cuatro métodos rápidos para la investigación de la capacidad toxigénica de las cepas de *Clostridium difficile* aisladas en un medio selectivo. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2000; 18 (3): 109-12.
- Hsu J, Abad C, Dinh M, Safdar N. Management of Hospital prevention of

- endemic health associate *Clostridium difficile* infection: reviewing the evidence. American Journal Gastroenterol 2019; 105: 23-39
6. Abbas d, Abbas M, Farsani M. Study of the frequency of *Clostridium difficile* tcdA, tcdB, cdtA and cdtB genes in feces of Calves in south west of Iran. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2014; 13: 21. Disponible en: <http://www.ann-clinmicrob.com/content/13/1/21>. Fecha de acceso: 05/2019
 7. Belanger S, Boissinot M, Clairoux N, Picard F, Bergeroni M. Rapid Detection of *Clostridium difficile* in Feces by Real-Time PCR. J Clin Microbiol 2003; 41(2):730–34.
 8. Meyer L, Espinoza R, Quera R. Infección por *Clostridium difficile*: epidemiología, diagnóstico y estrategias terapéuticas. Rev. Med. Clin. Condes 2014; 25(3):473-84.
 9. Legaria MC, Lumelsky G, Rosetti S. *Clostridium difficile* associated diarrhea from a general hospital in Argentina. Anaerobe 2003; 9(3):113-16.
 10. Rodríguez D, Almirante B, Bartolomé R, Pomar V, Mirelis B, Navarro F et al. Epidemiology of *Clostridium difficile* infection and risk factors for unfavorable clinical outcomes: results of a hospital-based study in Barcelona, Spain. J Clin Microbiol. 2013; 51(5):1465-73.
 11. Ruiz M, Altamirano P, Rodríguez E, Gamboa M. *Clostridium perfringens* y *Clostridium difficile* como agentes etiológicos de diarrea nosocomial asociada a antibióticos en niños costarricenses. Rev Biomed 2007; 18:81-7.
 12. Villalobos M, Boza R. Caracterización epidemiológica, clínica y microbiológica del brote de diarrea asociado a *Clostridium difficile*, ocurrido en el Hospital San Juan de Dios, 2008-2009. Acta méd. costarric 2012; 54(3): 152-8.
 13. Quesada C, Rodríguez C, Gamboa M, Rodríguez E, Du T, Mulvey MR et al. Emergence of *Clostridium difficile* NAP1 in Latin America. J Clin Microbiol. 2010;48: 669-70.
 14. Gardilic M, Fica A, Chang M, Llanos C, Luzoro A. Diarrea asociada a *Clostridium difficile* en un hospital de adultos.: Estudio descriptivo. Rev. chil. infectol. 2000; 17(4):307-12.
 15. García C, Samalvides F, Vidal M, Gotuzzo E, Dupont HL. Epidemiology of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a Peruvian tertiary care hospital. Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú. Am J Trop Med Hyg. 2007;77:802-5.
 16. Vishwanath S, Singhal A, D'Souza A, Mukhopadhyay C, Varma M, Bairy I. *Clostridium difficile* infection at a tertiary care hospital in south India. J Assoc Physicians India. 2013;61(11):804-6.
 17. Lopardo G, Morfin R, Moran I, Noriega F, Zambrano B, Luxemburger C et al. Epidemiology of *Clostridium difficile*: a hospital-based descriptive study in Argentina and Mexico. Braz J Infect Dis 2015; 19(1):8-14.
 18. Persson S, Jensen JN, Olsen KE. 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(12): 4299–300.
 19. Willingham F, Ticona E, Taylor D, Bowen A, Crane A, Gottlieb AL et al. Diarrhea and *Clostridium difficile* infection in Latin American patients with AIDS. Clin Infect Dis. 1998; 27:487-93.
 20. Grille P, Olano E, Bertullo H, Bagnulo H. Estudio sobre diarrea en una unidad de cuidados intensivos quirúrgica. Rev Med Urug 2006; 22: 136-42.
 21. Becerra MG, Ospina S, Atehortúa SL, Berbes DY. Factores de riesgo para la infección por *Clostridium difficile*. Infect. 2011;15:220-6. Disponible en: Doi: 10.1016/S0123-9392(11)70735-4. Fecha de acceso: 03/2019.
 22. Fernández L, Nazar J, Arce M, Dadamio J, Smayevsky Bianchini H. *Clostridium difficile* diarrhea: Frequency of detection in a medical center in Buenos Aires, Argentina. Rev Argent Microbiol. 2001; 33 (2):101-7.
 23. Muto CA, Pokrywka M, Shutt K, Mendelsohn AB, Nouri K, Posei K et al. A large outbreak of *Clostridium difficile* associated disease with an unexpected proportion of deaths and colectomies at a teaching hospital following increased fluoroquinolone use. Infect Control Hosp Epidemiol. 2005; 26: 273-80.
 24. Camacho A, Galindo A, Rancel A, Macías AE, Lamothe P, Ponce de León-Garduño et al. Factors associated with *Clostridium difficile* disease in a tertiary-care medical institution in Mexico: A case-control study. Rev Invest Clin. 2009; 61(5):371-7.
 25. Persson S, Torpdahl M, Olsen KE. New multiplex PCR method for the detection of *Clostridium difficile* toxin A (tcdA) and toxin B (tcdB) and the binary toxin (cdtA/cdtB) genes applied to a Danish strain collection. Clin Microbiol Infect 2008; 14: 1057–64.