

Universidad Miguel Hernández

FACULTAD DE FARMACIA
CURSO ACADÉMICO 2016/2017



TRABAJO FIN DE GRADO

Revisión bibliográfica de la
infección por *Clostridium difficile*
de adquisición en la comunidad

Autor: José Manuel Pérez Quinto

Tutor/es: Pedro Antequera Rodríguez
Fernando Bornay Llinares

ÍNDICE

RESUMEN	3
1. ANTECEDENTES	4
1.1 MICROORGANISMO Y PATOGÉNESIS.....	4
1.1.1 Aspectos microbiológicos	4
1.1.2 Patogénesis	5
1.2. EPIDEMIOLOGÍA Y FACTORES DE RIESGO.....	7
1.3. CLÍNICA.....	9
1.3.1 Portadores asintomáticos de <i>C. difficile</i>	9
1.3.2 Presentación clínica.....	9
1.3.3 Recurrencias.....	10
1.4 DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO.....	10
1.5 TRATAMIENTO	11
1.6 RELEVANCIA DEL PROBLEMA. JUSTIFICACIÓN	12
2. OBJETIVOS	13
2.1 Objetivos generales	14
2.2 Objetivos específicos	14
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	15
4. DISCUSIÓN Y RESULTADOS.....	16
4.1 Incremento de <i>C.difficile</i> en la comunidad	19
4.1.1 Epidemiología de la Infección Comunitaria (C-ICD).....	19
4.1.2 Cambios en la Epidemiología en Europa.....	19
4.1.3 Epidemiología en América	20
4.2 FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS	22
4.2.1 Antibióticos / Inhibidores Bomba H ⁺	22
4.2.2 Niños / Comorbilidades.....	23
4.3 Transmisión	23
4.3.1 Animales	24
4.3.2 Medio ambiente	26
4.3.3 Comida	26
5. CONCLUSIONES.....	27
6. BIBLIOGRAFÍA	29

RESUMEN

Objetivo: En el presente trabajo se ha planteado como objetivo principal realizar una revisión en la bibliografía de la situación actual de la infección por *Clostridium difficile* en pacientes no hospitalizados.

Método: El trabajo se ha llevado a cabo realizando una búsqueda bibliográfica utilizando varias fuentes; libros de textos, artículos científicos y publicaciones de congresos en formato online publicados en la revista de SEIMC, varias tesis doctorales de la Universidad Complutense de Madrid donde abarcan la temática, páginas web de instituciones internacionales como la de IDSA-SHEA. Se ha usado también la base de datos Medline mediante el buscador PubMed, para ello se han utilizado descriptores como: “Residence Characteristics” y “Clostridium difficile”.

Resultados: En un estudio realizado sobre 10.342 casos de infección por *C.difficile* (ICD), el 32% eran ICD adquirida en la comunidad (C-ICD), ligeramente superior a otros porcentajes comunicados años atrás cuya proporción se situaba en torno al 20-27%. Un estudio de casos-contróles en el Reino Unido, determinó que la toma de antibióticos 4 semanas antes de la infección fue significativamente más frecuente en pacientes comunitarios que en los controles. Estudios de prevalencia realizados en 2003 en perros mostraron que el 13-21% de los perros con diarrea y el 2-7% de perros sin diarrea presentan las toxinas A o B del microorganismo. Otro estudio establecía una prevalencia del 32,3% de *C. difficile* en muestras tomadas en los hogares

Conclusión: La epidemiología de la infección por *C.difficile* ha variado en las últimas décadas afectando a grupo poblacionales que se consideraban previamente de bajo riesgo. Hay varios factores de riesgo relacionados con la adquisición de este patógeno en la comunidad como el uso de antibióticos y los inhibidores de la bomba de H⁺. Los animales han sido estudiados como fuente de transmisión así como la comida y el medio ambiente.

Palabras Clave: *Clostridium difficile*, toxina, nosocomial, adquisición comunitaria, antibióticos, animales.

1. ANTECEDENTES

Clostridium difficile es un bacilo grampositivo, esporulado y anaerobio estricto, capaz de producir exotoxinas. Fue descrito inicialmente como un componente de la flora intestinal normal de los neonatos. Sin embargo, no fue hasta 1978 cuando se asoció por primera vez a enfermedad en humanos al identificarse como agente causal de la colitis pseudomembranosa. Causa una infección del colon que se manifiesta como un cuadro diarreico que aparece frecuentemente tras el uso de antimicrobianos y la consiguiente alteración de la flora de este órgano¹.

1.1 MICROORGANISMO Y PATOGÉNESIS

1.1.1 Aspectos microbiológicos

C. difficile es un bacilo Gram positivo, anaerobio y esporulado, resistente a múltiples antibióticos, que puede habitar el tracto intestinal del hombre y de otros animales. Las esporas son ovales y de localización subterminal, produciendo una deformación en la célula. Bajo el microscopio se ven como palillos de fósforos con el abultamiento localizado en un extremo terminal. El microorganismo en su forma vegetativa es altamente sensible a la presencia de oxígeno, mientras que en su forma esporulada es altamente termorresistente y capaz de sobrevivir en condiciones extremas.

Con respecto a su metabolismo, no produce lecitinasa ni lipasa, es indol negativo, y es capaz de hidrolizar gelatina. En cuanto a los carbohidratos, solamente fermenta la glucosa, aunque en ocasiones puede fermentar también el manitol. Sus principales productos metabólicos son el butirato y el acetato, y en menor cantidad también produce isobutirato, isovalerato, y ácido isocaproico².

Las colonias de *C. difficile* en agar sangre son circulares o rizoides, entre planas y poco convexas, de color grisáceo y superficie mate o algo satinada, y

no hemolíticas. Su característica más peculiar es el olor a establo de caballos que desprenden debido a las sustancias volátiles que sintetizan, como el p-cresol³.

1.1.2 Patogénesis

La infección por *C. difficile* (ICD) se manifiesta habitualmente en forma de diarrea con síntomas que varían desde formas leves hasta episodios severos que pueden poner en peligro la vida del paciente. El tipo de enfermedad y su gravedad dependerán tanto de factores del microorganismo como del paciente, principalmente de la virulencia de la cepa infectiva y de la respuesta inmune del hospedador. El contacto con esporas de una cepa de *C. difficile* productora de toxinas en combinación con la alteración de la microbiota colónica permite la colonización por este microorganismo.

Dado que *C. difficile* es capaz de producir esporas que persisten en el ambiente durante largos periodos de tiempo y son resistentes a un gran número de desinfectantes, este patógeno es altamente transmisible. La ICD es consecuencia de la ingestión de esporas de *C. difficile* toxigénico que resisten la acción del ácido gástrico, germinan en el intestino delgado y colonizan el colon, donde elaboran diversas toxinas que inician una serie de fenómenos que culminan con la pérdida de la función de barrera que poseen las células epiteliales, la aparición de diarrea y la formación de pseudomembranas⁴.

A. Locus de patogenicidad

Todas las cepas de *C. difficile* toxigénico presentan un locus de patogenicidad (PaLoc) que mide unos 19,6 kb. Este locus está formado por 5 genes (tcdA, tcdB, tcdC, tcdE y tcdR). Los genes tcdA y tcdB codifican dos toxinas TcdA y TcdB12 (toxinas A y B, respectivamente), ambas responsables de la patogenicidad de *C. difficile*⁵. El gen tcdR actúa como regulador positivo de la expresión de tcdA y tcdB, mientras que tcdC actúa como regulador negativo, evitando la expresión de todo el PaLoc. Finalmente, tcdE codifica una holina

que se encargara de hacer poros en la membrana citoplasmática que permite la liberación de las toxinas⁶.

B. Toxinas

La toxina A es una enterotoxina de 308 kDa, y la toxina B es una citotoxina de 269 kDa. Estas toxinas se encuentran entre las toxinas bacterianas más letales estudiadas, y pueden actuar sobre más de 20 líneas celulares distintas de mamíferos⁷.

La mayoría de las cepas producen las dos toxinas (cepas toxigénicas) o ninguna de las dos (cepas no toxigénicas), aunque últimamente se han descrito cepas en las que solo se detecta la toxina B (toxA-, toxB+) ^{8, 9,10}

Las cepas no toxigénicas no producen enfermedad⁷.

C. Actividad de las toxinas.

Tanto TcdA como TcdB presentan actividad glucosiltransferasa, causando la interrupción de las fibras de actina del citoesqueleto que resulta en una disminución de la resistencia transepitelial, la acumulación de líquido y la destrucción del epitelio intestinal.^{11, 12,13}

Su mecanismo de acción aún no está del todo dilucidado. Las toxinas, tras unirse a sus receptores, son introducidas en las células diana mediante endocitosis. Dentro de estos endosomas, en un ambiente ácido, ocurre la digestión autoproteolítica por la que la región N-terminal (con el dominio catalítico) se separa del resto de la toxina. Al parecer solo esta región catalítica es la que será liberada al citosol y ejercerá su función. Resultado de ello será que las células epiteliales se desestructuran separándose entre ellas e incluso muriendo y, por lo tanto, facilitando la migración de neutrófilos hacia el intestino y contribuyendo a la respuesta inflamatoria típica de la colitis¹⁴. Finalmente, cabe mencionar que, además, TcdA estimula la liberación del factor de necrosis tumoral de macrófagos activados, así como la producción de citosinas¹⁵.

D. Toxina binaria

Además del mencionado PaLoc, algunas cepas de *C. difficile* son portadoras de una transferasa (*C. difficile* transferase: CDT) denominada también toxina binaria, formada por 2 subunidades (CDTa y CDTb), que está implicada en una mayor toxicidad de la cepa. Interviene incrementando la adhesibilidad de las cepas de *C. difficile* y además actúa a nivel del citoesqueleto de la célula provocando una mayor pérdida de líquidos. Así, las cepas portadoras de toxina binaria se han asociado a una mayor virulencia¹⁶.

1.2. EPIDEMIOLOGÍA Y FACTORES DE RIESGO

C. difficile forma parte de la flora fecal normal en el 1-3% de los residentes de la comunidad y en más del 20% de los adultos hospitalizados, se encuentra en las heces de pacientes sintomáticos y asintomáticos y el contagio se produce, a menudo, dentro del hospital en un entorno contaminado por esporas, por lo que el riesgo aumenta en proporción a la duración de la hospitalización^{17, 18}.

Los principales factores de riesgo que se han asociado con este tipo de infección son la exposición antibiótica (especialmente a clindamicina, cefalosporinas, betalactámicos y fluoroquinolonas), la hospitalización prolongada, el ingreso en una unidad de cuidados intensivos, la proximidad física de un individuo infectado, la edad avanzada (mayores de 65 años), la gravedad de otra enfermedad subyacente, la inmunosupresión, una escasa respuesta inmune a las toxinas de *C. difficile*, la realización de procedimientos gastrointestinales no quirúrgicos y, posiblemente, el uso de antiácidos. *C. difficile* es la causa más común de diarrea hospitalaria, llegando a suponer hasta un 30% de los casos^{19, 20}.

Es común que los recién nacidos sanos sean portadores asintomáticos de *C. difficile* en heces, con tasas que rebasan el 50% en los 6 primeros meses de

vida, pero es rara la enfermedad en esta población, probablemente porque su intestino no expresa los receptores para la toxina¹⁷.

C. difficile afecta especialmente a pacientes mayores de 65 años (tasas de incidencia de hasta 228 casos/100.000 habitantes) internados en hospitales y centros geriátricos, en quienes, debido a la coexistencia de diferentes comorbilidades, el consumo de antibióticos es muy elevado^{21, 17-18}.

Sin embargo, se han descrito brotes de ICD que afectan a grupos de población considerados como de riesgo bajo (jóvenes de la comunidad, puérperas, niños mayores de 2 años, etc.)²¹. Es frecuente que los animales de ganado porten *C. difficile* en el tracto gastrointestinal, actuando como posibles reservorios para la transmisión de cepas relevantes, causando infección en humanos^{22, 23}.

Se suma a ello el hecho de que desde el año 2003 se ha observado un aumento no solo en la incidencia sino también en la gravedad de los casos de ICD en Norteamérica y Europa, en parte debido a la aparición de una nueva cepa hipervirulenta (toxintipo III, PCR ribotipo 027)^{24,25}. Esta nueva cepa ha sido la causante de numerosos brotes en estos territorios^{26, 27, 28}. En 2007, en España, una paciente trasladada de un hospital de Reino Unido, fue ingresada en el Hospital Gregorio Marañón de Madrid, con ICD por ribotipo 027²⁹. No hubo una diseminación de esta cepa.

En el primer estudio nacional español en 2008, la incidencia de ICD relacionado con la asistencia sanitaria (H-ICD) fue de 3,8/10.000 pacientes día y la incidencia de ICD comunitario (C-ICD) fue de 23,6/100.000 habitantes. Los datos del segundo estudio nacional llevado a cabo en 2013, muestran una incidencia de H-ICD de 6,5 casos/10.000 pacientes día y una incidencia de C-ICD de 22,3/100.000 habitantes³⁰. Recientemente, se ha publicado el primer caso autóctono de ribotipo 027 en España.³¹

1.3. CLÍNICA

1.3.1 Portadores asintomáticos de *C. difficile*

La colonización por *C. difficile* es la presencia del microorganismo en una persona sin síntomas clínicos. Recientemente se ha demostrado, el importante papel que juegan en la transmisión de la ICD, los pacientes colonizados, comparados con aquellos no colonizados, las esporas de los portadores asintomáticos se observó que eran fácilmente transferibles a las manos de los investigadores³².

1.3.2 Presentación clínica

C. difficile puede causar una amplia variedad de cuadros clínicos que pueden ir desde una diarrea leve hasta una enfermedad grave y fulminante.

Tras la exposición del individuo al microorganismo la respuesta de las IgG a la toxina A del microorganismo es el factor que determina si los pacientes presentaran diarrea o serán asintomáticos; las concentraciones séricas de IgG serán más elevadas en personas asintomáticas y en los pacientes con diarrea habrá mayor cantidad de antitoxina A que a su vez se correlaciona con un menor peligro de que haya una recurrencia. La diarrea es el síntoma fundamental y suele aparecer coincidiendo con un tratamiento antibiótico aunque también puede aparecer semanas después de su retirada. Las heces casi nunca muestran sangre aunque si mucosidad y su consistencia va de blanda hasta acuosa o mucosa. Tanto los signos clínicos como de laboratorio son fiebre, dolor abdominal, leucocitosis, hipoalbuminemia y aumento de la proteína C reactiva. La infección grave puede cursar con íleo adinámico (identificado en las radiografías de abdomen o tomografía computarizada). Un dato que lleva a la presencia de infección es una leucocitosis elevada (15.000×10^9 células/l) conjuntamente con la aparición en un frotis sanguíneos de neutrófilos no segmentados; los enfermos están expuestos a un elevado riesgo de complicaciones como perforación intestinal y megacolon tóxico que puede evolucionar a una sepsis grave pudiendo ocasionar el fallecimiento del paciente³³.

1.3.3 Recurrencias

Aunque quede solucionado el problema inicial pueden darse recurrencias, la diarrea puede reaparecer en el 15-30% de los casos tras el primer episodio y puede manifestarse perforación intestinal hasta en el 11% de los casos³³.

Los pacientes que ya han sufrido recurrencias tienen más posibilidades de padecer nuevas recurrencias (33-60%), son más frecuentes en pacientes mayores de 65 años y en los que siguen hospitalizados después del episodio inicial de diarrea asociada a *C. difficile*. Las recidivas de la enfermedad pueden ser causadas por la misma cepa inicial de *C. difficile* o por una nueva cepa. Las recaídas por la misma cepa suelen producirse a las dos semanas de acabar el tratamiento aunque se han visto casos de recaídas 4 meses después debido quizás a la germinación de esporas acantonadas de *C. difficile*³³.

1.4 DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

El diagnóstico de la enfermedad causada por *C. difficile* (DACD) se basa en una combinación de criterios clínicos y datos de laboratorio: a) diarrea (3 evacuaciones o más diarias durante más de 24 h) sin otra causa identificable; además, b) evidenciar la presencia de las toxinas A y/o B en heces, o c) la identificación de pseudomembranas en el colon mediante visión directa por colonoscopia. La presencia de pseudomembranas refleja una forma más avanzada de la enfermedad y se identifica solo en el 50% de los sujetos con ICD; por tanto, la negatividad de la colonoscopia no descarta la presencia de enfermedad por *C. difficile*³³.

El diagnóstico microbiológico se basa principalmente en la detección de las toxinas responsables del daño intestinal en muestras fecales diarreicas de pacientes con sintomatología clínica de sospecha. Entre las técnicas que se utilizan de manera rutinaria se encuentran el cultivo, los ensayos de citotoxicidad, el ensayo de inmunoenzima o la amplificación genética (Reacción en cadena de la polimerasa - PCR).

El método de referencia para el diagnóstico de ICD son los estudios de la citotoxicidad de las heces en cultivo celular³⁴. Es una técnica sensible aunque poco específica, dado que la toxicidad también se puede observar por otros factores no relacionados con las toxinas de *C. difficile*³⁴. Además conlleva un considerable retraso a la hora de obtener resultados (hasta 4 días). Es por ello que se han desarrollado métodos alternativos como los que se basan en métodos inmunoenzimáticos (EIA) y que evidencian la presencia de estructuras de *C. difficile* y/o de sus toxinas, y la detección de secuencias nucleotídicas específicas de *C. difficile* y/o de los genes que codifican sus toxinas³⁵.

Existen diferentes algoritmos de trabajo para el diagnóstico microbiológico del *C. difficile*. En general, todos los algoritmos propuestos en la literatura, sugieren hacer el diagnóstico en 2 o 3 escalones³⁵.

Todos ellos usan como método inicial o de cribado la detección de la glutamato deshidrogenasa (GDH), una enzima en la pared de la bacteria que se produce en mayor cantidad que las toxinas, mediante inmunoensayo. Si es negativo para GDH, se da un resultado final negativo, pero si obtenemos un resultado GDH positivo, se deberá realizar la detección de la toxina. Si también es positiva, se informa como positivo³⁵. Finalmente, en las positivas solo para GDH o para las toxinas se debe realizar un test confirmatorio. Este test puede ser el cultivo y/o el estudio de la citotoxicidad. Dado que esta confirmación es laboriosa y lenta, se ha sugerido aplicar técnicas moleculares como confirmatorias³⁵.

1.5 TRATAMIENTO

C. difficile es sensible in vitro a metronidazol y vancomicina, los antibióticos de elección en el tratamiento de la ICD, y presenta una sensibilidad variable a otros antimicrobianos³⁶.

El metronidazol por vía oral se recomienda para un tratamiento inicial siempre y cuando sea leve. En pacientes más graves se recomienda vancomicina. También puede haber una asociación de ambos antibióticos por vía intravenosa para el tratamiento de infecciones muy graves o complicadas. No está claro que la asociación de ambos antibióticos pueda ser más eficaz que dar uno solo ya que hay pocos ensayos controlados aleatorizados para comprobarlo, aparte que aportan varios efectos adversos la asociación de vancomicina y metronidazol³⁶.

Estudios recientes han demostrado la efectividad de un antibiótico perteneciente al grupo de macrocíclicos llamado fidaxomicina³⁷.

En mayo de 2011 la FDA aprobó la fidaxomicina como el primer nuevo antibiótico para el ICD. Su concentración mínima inhibitoria mínima es cuatro veces menor que la del metronidazol y la vancomicina, tiene actividad bactericida y su mecanismo de acción consiste en la inhibición de la síntesis de ARN interfiriendo en la formación del complejo ADN-ARN polimerasa antes de que dé lugar a la transcripción del ICD³⁷.

Existe una alternativa para combatir el *C. difficile* que es el trasplante de microbiota fecal que ha sido utilizado en China durante 1700 años para combatir varias enfermedades gastrointestinales³⁸. En 1958 se describió por primera vez el uso de enemas fecales en el tratamiento de colitis producidas por este microorganismo en cuatro pacientes³⁹.

1.6 RELEVANCIA DEL PROBLEMA. JUSTIFICACIÓN

La enfermedad causada por *C. difficile* se ha asociado muy particularmente a pacientes ancianos previamente tratados con antimicrobianos y que con frecuencia habían sido recientemente intervenidos quirúrgicamente⁴⁰. Posteriormente los brotes de la infección por cepas del ribotipo 027, pusieron de manifiesto que dichos factores de riesgo no eran únicos. En años recientes, se acepta que un porcentaje sustancial de los

episodios de ICD son casos que ocurren en pacientes no hospitalizados⁴¹. De ellos, se conoce mal cuáles son los factores predisponentes reales de dicha población y la proporción de casos que han mantenido un contacto con la asistencia sanitaria.

Bauer y *et al.* describieron tres posibles causas de ICD comunitaria (C-ICD): la colonización del tracto gastrointestinal de pacientes que habían sido dados de alta de un hospital de manera reciente, el incremento de la diseminación en los hospitales ha llevado a un incremento en la tasa de portadores asintomáticos en la población y el contacto con portadores asintomáticos⁴². También se ha sugerido que el reservorio animal y la comida contaminada pueden jugar un papel importante en el incremento de casos de C-ICD⁴³. A pesar de que los antibióticos son unos de los factores de riesgo más conocidos para la C-ICD, se han descrito casos de C-ICD sin exposición previa a antibióticos.

La aparición de este microorganismo en la comunidad así como sus factores de riesgo se han convertido en un motivo de estudio en el ámbito internacional. Hasta el momento, la mayoría de la documentación científica existente se centra en la adquisición de este microorganismo en el hospital, por lo que se hacen necesarios trabajos en diferentes países que permitan el estudio de la infección en la comunidad.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos generales

En el presente trabajo se ha planteado como objetivo principal realizar una revisión en la bibliografía de la situación actual de la infección por *C. difficile* en pacientes no hospitalizados.

2.2 Objetivos específicos

Para cumplir este objetivo principal, se plantearon una serie de objetivos específicos

- Conocer la proporción de casos de C-ICD en el ámbito local e internacional
- Determinar si ha existido un incremento en el número de casos de C-ICD
- Proporción de casos que han mantenido un contacto con la asistencia sanitaria.
- Factores clínicos y epidemiológicos que expliquen dicho aumento, si lo hubiera
- Papel que el reservorio animal y la comida contaminada pueden jugar en el incremento de casos de C-ICD

3. MATERIAL Y MÉTODOS

El trabajo se ha llevado a cabo realizando una búsqueda bibliográfica utilizando varias fuentes; libros de textos, artículos científicos y publicaciones de congresos en formato online publicados en la revista de SEIMC, varias tesis doctorales de la Universidad Complutense de Madrid donde abarcan la temática, páginas web de instituciones internacionales como la de IDSA-SHEA. Se ha usado también la base de datos Medline mediante el buscador PubMed, para ello se han utilizado descriptores como: “Residence Characteristics” y “Clostridium difficile”. Debido a que es un tema algo novedoso y hoy por hoy hay poca bibliografía solo se encontraron 9 artículos abarcando la temática.



4. DISCUSIÓN Y RESULTADOS

En condiciones normales *C. difficile* es un microorganismo que forma parte de la flora intestinal del ser humano en un 3% de los adultos^{44, 45}.

Para entender los mecanismos por los cuales la bacteria causa infección, es necesario conocer la ecología del microorganismo y sus interacciones con la microbiota endógena del intestino, sobre todo del colon, en humanos. En general, los mamíferos nacen libres de microorganismos, y la microbiota se establece de manera gradual con el tiempo a través de una sucesión ecológica. Durante el proceso, un grupo de microorganismos domina sobre otro en intervalos sucesivos hasta la madurez. *C. difficile* coloniza más de un 50% de niños durante sus primeros meses de vida, permaneciendo éstos asintomáticos a pesar de la presencia de grandes cantidades de toxina. Cuando la microbiota madura, la población de *C. difficile* disminuye, hasta que prácticamente no se encuentra en adultos. El patógeno no puede establecerse en el intestino si la microbiota endógena está mantenida, por lo que se deduce que deben existir mecanismos de resistencia a la colonización de cualquier bacteria extraña por parte de la microbiota normal. En varios estudios realizados con la utilización de un quimiostato, se observó que las bacterias competían principalmente por los nutrientes y por los sitios de adhesión⁴⁵.

Por lo tanto, se puede decir que la colonización por *C. difficile* está bajo el control de la microbiota endógena. La magnitud de la población bacteriana va a depender de la competencia microbiana que supone la microbiota normal, y la aparición o no de enfermedad dependerá del tamaño de la población, de la capacidad toxigénica, así como del resto de factores de virulencia de la cepa colonizadora, de los efectos neutralizantes de toxina del resto de la microbiota, y de factores relacionados con el huésped, como la edad o su grado de inmunodeficiencia⁴⁶.

C. difficile, es el responsable de entre el 15% y el 25% de los casos de diarrea asociada a antibióticos en ambiente hospitalario^{45, 47-48} y el 90% de los casos de colitis pseudomembranosa^{47, 49-50}.

En la última década, la epidemiología de la ICD ha sufrido un cambio dramático, con un incremento del número de casos y de gravedad de la infección en Estados Unidos, Canadá y Europa. En el trabajo de J. Lucado CG y A. Elixhauser la tasa de altas hospitalarias en EEUU con diagnósticos de ICD se incrementó de 3,82/1.000 altas en el año 2000 a 8,75/1.000 altas en el año 2008, con un aumento desproporcionado de los pacientes mayores de 65 años⁵¹.

Los cambios en la epidemiología también ha supuesto la emergencia de la ICD en poblaciones que se consideraban de previamente de bajo riesgo para la ICD, como lo son los casos graves en mujeres periparto. También se ha descrito un incremento en niños y personas consideradas sanas sin contacto con el sistema sanitario⁵².

C. difficile mantiene la alta prevalencia nosocomial y comienza un preocupante aumento en el número de casos de la infección por este microorganismo adquirido en la comunidad⁵³.

Autores como Bauer *et al.* consideraron la colonización del tracto gastrointestinal de pacientes que habían sido dados de alta de un hospital de manera reciente, incremento en la tasa de portadores asintomáticos en la población y el contacto con estos portadores, como causas posibles de ICD comunitaria (C-ICD)⁵⁴.

Según la guía de práctica clínica para la infección de *C. difficile* en adultos realizada por la Sociedad de Salud Epidemiológica de Norteamérica y la Sociedad de enfermedades infecciosas de Norteamérica (SHEA-IDSA) este microorganismo continúa siendo la causa más importante de diarrea asociada

a tratamiento médico y es cada vez más importante como patógeno en la comunidad. La SHEA-IDSA define la C-ICD como la enfermedad en personas sin estancia nocturna en un centro de atención médica en, por lo menos, las 12 semanas previas al inicio de los síntomas⁵⁵.

M. Núñez-Núñez *et al.* en el servicio de Microbiología y Medicina Preventiva de los Hospitales Universitarios Virgen Macarena y Virgen del Rocío de Sevilla realizaron un estudio retrospectivo y observacional de casos por infección de *C.difficile* entre marzo de 2008 y julio de 2014; para diferenciar entre adquisición en la comunidad estricta y cuidados sanitarios se utilizaron los criterios de la SHEA-IDSA y se evaluó los tratamientos antibióticos previos, variables demográficas, epidemiológicas, clínicas y evolutivas⁵⁶.

Se identificaron 150 casos entre infección adquirida estrictamente en la comunidad y por cuidados sanitarios (ambiente nosocomial), 66(44%) eran hombres de 73 años, la adquisición en comunidad estricta fue de 36 (24%) casos; en el grupo de adquisición comunitaria había estado recibiendo antibiótico más de 30 días siendo la amoxicilina-clavulánico el más prescrito, en 44(29% de los casos) una de las prescripciones había sido injustificada siendo mayor en casos de adquisición comunitaria (46 vs 30); adicionalmente en 32 (21%) al menos una prescripción se consideró indicada pero no ajustada a la guía de tratamiento antibiótico del centro⁵⁶.

En el análisis bivariado se observaron diferencias según la adquisición (comunitaria vs asociados a cuidados sanitarios) en índice de Horn grados 3 4 (44 vs 63% $p = 0,05$); número de antibióticos en los 3 meses previos (2 vs 3, $p=0,02$); demora diagnóstica (13 vs 5 días, $p < 0,01$)⁵⁶

Estos datos demostraron que la infección por *C.difficile* fue más frecuente en pacientes comunitarios y en ellos se produjo una mayor demora en el diagnóstico⁵⁶.

4.1 Incremento de *C.difficile* en la comunidad

Elena Reigadas en su tesis doctoral afirma que el reciente cambio en la epidemiología también ha supuesto la emergencia de la ICD en poblaciones que se consideraban de previamente de bajo riesgo para la ICD, como lo son los casos graves en mujeres periparto. También se ha descrito un incremento en niños y personas consideradas sanas sin contacto con el sistema sanitario⁵⁷.

4.1.1 Epidemiología de la Infección Comunitaria (C-ICD)

Históricamente, las tasas de C-ICD han sido bajas, oscilando entre 3,2 a 16,2/100.000 habitantes. La C-ICD parece estar sufriendo un incremento con incidencias que van de 7,7 a 29,5/100.000 habitantes. En un estudio realizado sobre 10.342 casos de ICD, el 32% eran C-ICD, ligeramente superior a otros porcentajes comunicados de C-ICD que se sitúan en torno al 20-27% .La tasa de recurrencia de la C-ICD descrita oscila desde un 9% hasta en un 28%⁵⁷.

4.1.2 Cambios en la Epidemiología en Europa

Bauer MP *et al.* estudiaron en noviembre de 2008, 97 hospitales de 34 países europeos. Aplicaron unos criterios de vigilancia y determinaron 506 casos de *C. difficile* de los cuales 70 (14%) fueron clasificados como casos comunitarios, aunque la proporción variaba entre países entre el 0 y el 82%⁵⁸.

Se establecieron 106 laboratorios en 34 países europeos, tomaron muestras de heces de pacientes con sospecha de infección por *C.difficile* o diarrea de 3 o más días después del ingreso en el hospital, si se identificaban toxinas esto quería decir que había un caso. Se recogieron datos clínicos durante 3 meses. Se obtuvo información detallada de 506 pacientes. De éstos, 389 de pacientes, tuvieron aislados disponibles para su caracterización. Se identificaron 65 ribotipos diferentes mediante PCR: fueron mayoritarios los ribotipos 014/020 (61 pacientes [16%]), el 001 (37 [9%]) y el 078 (31 [8%]). La prevalencia del ribotipo 027 fue del 5%. La mayoría de los pacientes tenían un perfil de riesgo previamente identificado de edad avanzada, comorbilidad y uso reciente de antibióticos. Durante el seguimiento, 101 (22%) de un total de 455 pacientes

habían muerto. En el 40% de las muertes había relación con la ICD. Se asociaron con enfermedad complicada una edad de 65 años o más (odds ratio ajustada 3,26, IC 95% 1,08-9,78, $p = 0,216$), e infección por ribotopos 018 (6,19, 1,28-29,81; $p = 0,023$) y 056 (13,01; 1,14-148,26; $p = 0,039$).⁵⁸

4.1.3 Epidemiología en América

Los trabajos de Kutty PK *et al.* en seis centros de Carolina del Norte y publicados en 2010, mostraron una incidencia de C-ICD del 20%. Los pacientes con C-ICD se definieron como adultos (> 18 años de edad) con un resultado positivo en la detección en heces de la toxina de *C. difficile* y ninguna hospitalización en las 8 semanas anteriores. La incidencia de C-ICD fue de 21 y 46 por 100.000 años-persona en los pacientes ambulatorios de VA (Veterans Affairs) y en las poblaciones del condado de Durham, respectivamente. Los pacientes de VA recibieron más antimicrobianos que los controles (odds ratio ajustado [OR] 17,8, intervalo de confianza del 95% [IC] 6,6-48] y haber tenido una visita reciente al centro de salud (OR 5,1, IC del 95% 1,5 (AOR 9,1, IC del 95%: 2,9-28,9), tenían enfermedad de reflujo gastroesofágico (OR 11,2, IC95% 1,9-64,2), y tenían Insuficiencia cardiaca (OR 3,8, IC del 95%: 1,1-13,7)⁵⁹.

Otros estudios como los de Lessa FC en varios estados de Estados Unidos mostraron 10.342 casos, siendo la incidencia del 32%⁶⁰.

Allard *et al.* estudiaron 15 hospitales en Montreal entre 2005 y 2006, de 2297 casos encontrados, 599(27%) fueron clasificados como C-ICD⁶¹.

La zona del noroeste de Ontario presenta una alta tasa de resistencia a antibióticos, incluyendo enfermedad invasiva tratada con clindamicina. El uso de estos antibióticos puede ser un factor de riesgo en la infección por *C. difficile*. Por todo ello, Ken Babey MD *et al.* realizaron un estudio retrospectivo basado en la población para evaluar la prevalencia de infecciones del microorganismo entre pacientes hospitalizados y ambulatorios. Se consideraron casos de infección de ámbito nosocomial cuando el tiempo transcurrido desde el ingreso en el hospital era superior a las 48 horas sumado

a indicios de sintomatología o pruebas de laboratorio positivas; en cuanto a la infección adquirida en la comunidad se consideró tal, si se manifestaban los primeros síntomas o las pruebas son positivas dentro de las primeras 48 horas tras ingresar en el hospital⁶².

Por otro lado se habló de recurrencia si la prueba volvía a salir positiva entre 2-8 semanas después de que las primeras pruebas fueran positivas, mientras que se consideró un nuevo caso si habían pasado más de 8 semanas⁶².

El estudio abarcó un total de 70.000 pacientes a estudiar. Un 78,8% del total de la población a estudiar fueron nuevos casos de infecciones, un 20,6 % fueron recurrencias, un 47,1% fue diagnosticada por infección adquirida en la comunidad; la edad media de la población a estudiar es de unos 61 años por lo que era una población prácticamente casi anciana⁶².

De los pacientes con infección adquirida en la comunidad un 76,5% había estado usando antibióticos dentro de los 90 días de su diagnóstico aunque cabe destacar que una pequeña parte de la población no presentaba infección por uso de antibióticos si no por utilizar inhibidores de la bomba de protones. En cuanto a los antibióticos causantes de esta infección, ciprofloxacino y la clindamicina fueron mayoritarios seguido de cefalosporinas como fármacos causales de la infección⁶².

El uso de antibióticos se ha considerado durante mucho tiempo como un factor de riesgo, la clindamicina y el ciprofloxacino eran los más usados. En 1970 la clindamicina se asoció mucho a infección por *C. difficile*, entre 1980 y 1990 se asoció a esta infección el uso de cefalosporinas y ya más recientemente esta infección se asoció al uso de fluoroquinolonas como por ejemplo el ciprofloxacino⁶².

Los inhibidores de la bomba de protones se han asociado a un aumento de las tasas de infección por *C. difficile* en Estados Unidos y Reino Unido⁶³⁻⁶⁷. Según La Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA) tomar inhibidores de la bomba de protones a largo plazo aumenta el riesgo de infección por este microorganismo; en la actualidad no se conoce con certeza el mecanismo por el que un inhibidor de la bomba de protones puede conllevar una infección pero según un estudio escocés en 2013 tiene que ver con su

mecanismo de acción que consiste en protegernos de la acidez estomacal y parecer ser que esto produce un cambio en la flora y en el intestino grueso que podría ocasionar la infección oportunista de este patógeno⁶⁸.

4.2 FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS

Hay algunas diferencias y similitudes entre los factores de riesgo a ICD por cuidados de la salud y en la comunidad, en el caso de cuidados de la salud tenemos como factores una edad avanzada (mayor de 65 años), tratamiento antibiótico así como co-morbilidades de las que más adelante comentare⁶⁹.

Los factores que influyen en la infección en la comunidad no están del todo claro todavía, aun así la creación de un perfil de riesgo para estos casos podría ayudar a los trabajadores sanitarios de atención primaria para detectar posibles casos a tiempo⁶⁹.

4.2.1 Antibióticos / Inhibidores Bomba H⁺

El consumo de antibióticos es el factor más importante asociado a infección por *C. difficile* incluyendo el ámbito comunitario, así quedó reflejado en un estudio realizado en Estados Unidos donde se centraba en la C-ICD y uso de antibióticos, aun así no todos los antibióticos tenían el mismo riesgo; por ejemplo en el caso de cefalosporinas y fluoroquinolonas presentaron un alto riesgo pero otros antibióticos como por ejemplo las tetraciclinas tenían un bajo riesgo asociado⁷⁰.

El trabajo de Wilcox MH *et al.*, un estudio de casos-controles en el Reino Unido, determinó que la toma de antibióticos 4 semanas antes de la infección fue significativamente más frecuente en pacientes comunitarios que en los controles⁷¹.

Diversos estudios internacionales han demostrado que una proporción entre el 43-65% de la población adquiere infección en la comunidad en comparación a la adquirida por cuidados sanitarios sin uso de antibióticos en estos cuidados,

por lo que el uso de antibióticos juega un papel importante pero se requieren más estudios para determinar si puede ser una causa esencial en la C-ICD, aun así ante cualquier caso de infección en la comunidad habría que ver si tiene antecedentes de tratamiento antibiótico u hospitalización⁷²⁻⁷⁵.

Se relacionó el uso de inhibidores de la bomba de H⁺ con la infección por *C. difficile* incluyéndolo como riesgo también de infección comunitaria. Parece ser que al usar un medicamento de esta familia debido a su mecanismo de acción se produce una alteración de la flora intestinal dando lugar a una posible infección, todo esto sin el previo uso de un antibiótico⁷⁶.

4.2.2 Niños / Comorbilidades

En los dos primeros años de vida, los niños son portadores asintomáticos de *C. difficile* por lo que resulta impropio la determinación de éste en sus muestras. El primer aislamiento en heces de *C. difficile* por Hall I *et al.* en 1935 se realizó en neonatos⁷⁷.

El contacto con niños de hasta 2 años se asoció con C-ICD ya que los niños se consideran reservorios potenciales en la comunidad⁷⁸, por lo que habrá que realizar más investigaciones para ver qué posibilidad tienen los recién nacidos de poder contagiar la infección.

C. difficile puede llegar a ser un problema en pacientes con enfermedades inflamatorias intestinales como la Enfermedad de Crohn ya que estos pacientes presentan un alto riesgo de infección⁷⁹.

4.3 Transmisión

Comprender la adquisición y transmisión de este microorganismo fuera del hospital, es decir, en un ambiente comunitario ha llevado a numerosos trabajos y publicaciones.

En 2010, Otten *et al.* publicaron un modelo de transmisión de infección en la comunidad como paso inicial para desarrollar los riesgos que tiene este patógeno de causar infección en la comunidad⁸⁰.

Existen una serie de fuentes potenciales de exposición en la comunidad que pueden clasificarse en: animales, medio ambiente o alimentos.

4.3.1 Animales

Una posible fuente de transmisión son los animales, aunque podemos aislar el microorganismo tanto en animales como en humanos, Songer JG *et al.* establecieron que no se puede considerar que exista una zoonosis⁸¹ aunque más adelante veremos que hay varios autores que mantienen que este microorganismo es zoonótico.

Los animales de producción (vacas, cerdos) siempre se les ha suministrado un amplio espectro antibacteriano mezclado con la alimentación como profilaxis a futuras infecciones, el uso de estos antimicrobianos altera la flora del animal permitiendo ser colonizado por *C.difficile* al igual que ocurre en los humanos, por lo que, una vez que el microorganismo ha infectado a un animal de la zona rápidamente puede infectar a otros animales que estén sanos. Esto es motivo de preocupación ya que retrasa el crecimiento de los rebaños así como puede contaminar productos lácteos o cárnicos lo que puede dañar la confianza del consumidor⁸²⁻⁸³.

Weese *et al.*, 2001 y Marks y Kather, 2003 realizaron estudios de prevalencia en perros donde mostraron que el 13-21% de los perros con diarrea y el 2-7% de perros sin diarrea presentan las toxinas A o B del microorganismo además de mostrar una asociación entre la diarrea canina y la presencia de toxinas⁸⁴⁻⁸⁵. También se quiso estudiar otras especies de animales como el ganado vacuno, aves, siendo el ganado porcino el caso más estudiado entre las distintas especies de animales.

Songer *et al.* describieron por primera vez una disentería en el cerdo producida por *C. difficile*, esto ocurrió de forma accidental durante un estudio de *Brachyspira hyodysenteriae* en donde los cerdos gnotobioticos se infectaron accidentalmente por *C.difficile*⁸⁶. Aunque fue 3 años más tarde cuando Jones y Hunter en 1993 diagnosticaron mediante aislamiento por cultivo la primera infección natural en cerdos por el microorganismo originando un cuadro de disentería⁸⁷.

Pirs T *et al.* establecieron que la prevalencia en cerdos del microorganismo es alta (51,8%) en las granjas de Eslovenia⁸⁸, frente al ganado vacuno que tiene una prevalencia del 11,2% según Rodriguez Palacios *et al.*⁸⁹ y en aves tiene una prevalencia del 17,4% según Simango⁹⁰.

Orchad *et al.* describió el primer caso de fauna salvaje en cautividad, un oso que desarrollo colitis pseudomembranosa después de un tratamiento con Kanamicina seguido de tetraciclina⁹¹.

Autores como Borriello *et al.*, Rodriguez-Palacios *et al.*, Rupnik Pirs *et al.*, Jhung *et al.*, Indra *et al.*, propusieron la hipótesis de que *C.difficile* podía ser zoonotico.

Patricia Alba Alderete en su tesis doctoral explica que para considerar una infección por *C.difficile* como zoonosis en primer lugar hay que reconocer que este microorganismo puede infectar tanto al hombre como a los animales, hecho meramente probado y también reconocer el mecanismo de transmisión desde los animales al hombre y viceversa. El descubrimiento de las mismas cepas en diferentes especies de hospedadores nos indica que puede existir transmisión entre animales y de los animales al ser humano, pudiendo ser alguna de estas vías de transmisión⁹²:

- Por contacto directo del animal
- Por contacto indirecto con los residuos de animales (oral-fecal)
- Por consumo de productos cárnicos

Aunque todo lo anterior al parecer da razones para teorizar sobre el carácter zoonótico de este microorganismo, algunos autores indican la necesidad de realizar más estudios y hallar pruebas más contundentes sobre la relación de este microorganismo con animales⁹².

4.3.2 Medio ambiente

Alam *et al* encontraron una prevalencia del 32,3% de *C. difficile* en muestras tomadas en los hogares, estas fueron encontradas en botas y zapatos lo que sugiere una contaminación previa en el exterior del hogar⁹³.

Weese JS *et al.* encontraron presencia de esporas en la cocina y nevera lo que sugiere que los alimentos puedan estar contaminados⁹⁴.

Al saif y Brazier documentaron que el microorganismo es ubicuo, presente en entornos naturales y sobre todo en plantas de tratamiento de agua donde se trata la materia fecal humana como residuo⁹⁵.

4.3.3 Comida

La presencia de cepas toxígenas en alimentos listos para el consumo donde incluimos carne, vegetales así como la resistencia de estas esporas a condiciones adversas de temperatura demuestran la presencia de este patógeno en las comidas, aunque actualmente no hay suficiente evidencia epidemiológica que vincule consumo de alimentos con infección por este patógeno⁹⁶.

5. CONCLUSIONES

1. En la última década, la epidemiología de la ICD ha sufrido un cambio dramático, con un incremento del número de casos y de gravedad de la infección en Estados Unidos, Canadá y Europa.

2. En la actualidad, poblaciones que se consideraban previamente de bajo riesgo para la ICD (jóvenes de la comunidad, puérperas, niños mayores de 2 años, etc.) se ven afectadas en un porcentaje mayor que en décadas pasadas.

3. Necesitamos conocer con mayor validez y precisión la incidencia de C-ICD en pacientes que estuvieron previamente sometidos a cuidados sanitarios. Se requiere nuevos trabajos que profundicen en este campo.

4. Hay varios factores de riesgo relacionados con la adquisición de este patógeno en la comunidad como los antibióticos y los inhibidores de la bomba de H⁺.

5. Niños, con menos de 2 años de edad colonizados por *C. difficile* y asintomáticos, pueden llegar a ser una potencial fuente de infección. Comorbilidades como enfermedades intestinales inflamatorias también pueden contribuir o facilitar la adquisición de este patógeno.

6. Para conocer la adquisición de *C. difficile* en la comunidad resulta fundamental determinar las vías de transmisión. Los animales han sido estudiados como fuente de transmisión pero no existe unanimidad a la hora de determinar la naturaleza zoonótica de la C-ICD o por el contrario existe un elemento común que afecta a animales y hombre por separado.

7. La comida y el medio ambiente representan posibles fuentes de transmisión. Es escasa la bibliografía relacionada con este tema por lo que ha resultado ser algo innovador e interesante, aún deben realizarse más estudios para poder

determinar la causa exacta de esto y poder diseñar modelos con medidas preventivas que eviten la C-ICD.



6. BIBLIOGRAFÍA

1. Bartlett JG. Historical perspectives on studies of *Clostridium difficile* and *C. difficile* infection. *Clin Infect Dis.* 2008; 46 Suppl. 1:S4–11.
2. Allan SD, Emery, C.L., Siders J.A. (1999) *Clostridium*. In: Murray PR (ed) *Manual of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology, Washington, pp. 655-660
3. Songer J. G., Trinh H. T., Killgore G. E., Thompson A. D, McDonald L. D, y Limbago B. M. 2009. *Clostridium difficile* in retail meat products, USA, 2007. *Emerging Infectious Diseases.* 15:819-821.
4. Sunenshine RH, McDonald LC. *Clostridium difficile*-associated disease: new challenges from an established pathogen. *Cleve Clin J Med.* 2006; 73:187–97
5. Hernández-Rocha C, Naour S, Álvarez-Lobos M, Paredes-Sabja D. Infecciones causadas por *Clostridium difficile*: una visión actualizada. *Revista chilena de infectología.* 2012; 29:434-45.
6. Carroll KC, Bartlett JG. Biology of *Clostridium difficile*: implications for epidemiology and diagnosis. *Annu Rev Microbiol.* 2011; 65:501–21
7. Elseviers MM, Van Camp Y, Nayaert S, Duré K, Annemans L, Tanghe A, et al. Prevalence and management of antibiotic associated diarrhea in general hospitals. *BMC Infectious Diseases;* 15(1).
8. (Alfa MJ, Kabani A, Lyerly D, Moncrief S, Neville LM, Al-Barrak A, Harding GK, Dyck B, Olekson K, Embil JM, (2000 Jul) Characterization of a toxin A-negative, toxin B-positive strain of *Clostridium difficile* responsible for a nosocomial outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *J Clin Microbiol* 38: 2706-2714.
9. Moncrief JS, Zheng L, Neville LM, Lyerly DM, (2000 Aug) Genetic characterization of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* isolates by PCR. *J Clin Microbiol* 38: 3072-3075.
10. Rupnik M, Kato N, Grabnar M, Kato H, (2003 Mar) New types of toxin A-negative, toxin B-positive strains among *Clostridium difficile* isolates from Asia. *J Clin Microbiol* 41: 1118-1125).
11. Rupnik M, Wilcox MH, Gerding DN. *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol.* 2009; 7:526–36.
12. Carroll KC, Bartlett JG. Biology of *Clostridium difficile*: implications for epidemiology and diagnosis. *Annu Rev Microbiol.* 2011; 65:501–21.
13. Jank T, Giesemann T, Aktories K. Rho-glucosylating *Clostridium difficile* toxins A and B: new insights into structure and function. *Glycobiology.* 2007; 17:15R–22R.
14. Voth DE, Ballard JD. *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. *Clin Microbiol Rev.* 2005; 18:247–63
15. Voth DE, Ballard JD. *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. *Clin Microbiol Rev.* 2005; 18:247–63
16. Bacci S, Molbak K, Kjeldsen MK, Olsen KE. Binary toxin and death after *Clostridium difficile* infection. *Emerg Infect Dis.* 2011; 17:976–82.
17. Sunenshine RH, McDonald LC. *Clostridium difficile*-associated disease: new challenges from an established pathogen. *Cleve Clin J Med.* 2006; 73:187–97.
18. Shannon-Lowe J, Matheson NJ, Cooke FJ, Aliyu SH. Prevention and medical management of *Clostridium difficile* infection. *BMJ.* 2010; 340:c1296.

19. Bartlett JG, (1992) Antibiotic-associated diarrhea. *Clinical infectious diseases an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 15: 573-581
20. Kelly CP, LaMont JT, (2008) *Clostridium difficile*--more difficult than ever. *The New England journal of medicine* 359: 1932-1940.
21. Freeman J, Bauer MP, Baines SD, Corver J, Fawley WN, Goorhuis B, et al. The changing epidemiology of *Clostridium difficile* infections. *Clin Microbiol Rev.* 2010; 23:529–49
22. Arroyo LG, Kruth SA, Willey BM, Staempfli HR, Low DE, Weese JS, (2005) PCR ribotyping of *Clostridium difficile* isolates originating from human and animal sources. *Journal of medical microbiology* 54: 163-166
23. Pelaez T, Alcalá L, Blanco JL, Alvarez-Perez S, Marin M, Martín-Lopez A, Catalan P, Reigadas E, Garcia ME, Bouza E, (2013) Characterization of swine isolates of *Clostridium difficile* in Spain: a potential source of epidemic multidrug resistant strains? *Anaerobe* 22: 45-49
24. Kuijper EJ, Coignard B, Tuñón P. Emergence of *Clostridium difficile* associated disease in North America and Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2006; 12:2–18.
25. Kelly CP, LaMont JT. *Clostridium difficile* – more difficult than ever. *N Engl J Med.* 2008; 359:1932–40.
26. Kuijper E, Coignard B, Brazier J, Suetens C, Drudy D, Wiuff C, et al. Update of *Clostridium difficile*-associated disease due to PCR ribotype 027 in Europe. *Euro Surveill.* 2007; 12:163–6.
27. Warny M, Pepin J, Fang A, Killgore G, Thompson A, Brazier J, et al. Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. *Lancet.* 2005; 366: 1079- 84.
28. Health Protection Agency. Outbreak of *Clostridium difficile* infection in a hospital in south east England. *Commun Dis Rep Wkly* 2005; 15(25): 23/06/2005.
29. Marin M, Martín A, Alcolea A, Iglesias C, Alcalá L, Pelaez T, Sanchez-Somolinos M, Bouza E, (2013) First case of autochthonous *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 detected in Spain. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*
30. Alcalá L. RE, Marín M., Martín A., Catalán P., Bouza E., (2014) Multicenter Study of *Clostridium difficile* infection in Spain: an Update of the Underdiagnosis of *Clostridium difficile* infection in a Whole Nation. 23rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases P0741
31. Marin M, Martín A, Alcolea A, Iglesias C, Alcalá L, Pelaez T, Sanchez-Somolinos M, Bouza E, (2014) First case of autochthonous *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 detected in Spain. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica* 32: 355-358
32. Riggs MM, Sethi AK, Zabarsky TF, Eckstein EC, Jump RL, Donskey CJ, (2007) Asymptomatic carriers are a potential source for transmission of epidemic and nonepidemic *Clostridium difficile* strains among long-term care facility residents. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 45: 992-998
33. Rodríguez-Pardo D, Mirelis B, Navarro F. Infecciones producidas por *Clostridium difficile*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* Abril de 2013; 31(4):254-63.
34. Alcalá L, Betriu C, García Sánchez J, Reig M. Bacterias anaerobias. *Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.*
35. Alcalá Hernández L, Marín Arriaza M, Mena Ribas A, Niubó Bosh J. Diagnóstico microbiológico de la infección por *Clostridium difficile*. 53. *Procedimientos en Microbiología Clínica. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).* 2015.

36. Li R, Lu L, Lin Y, Wang M, Liu X. Efficacy and Safety of Metronidazole Monotherapy versus Vancomycin Monotherapy or Combination Therapy in Patients with Clostridium difficile Infection: A Systematic Review and Meta-Analysis. Deshpande A, editor. PLOS ONE. 7 de octubre de 2015; 10(10):e0137252.
37. Scott LJ. Fidaxomicin: A Review of Its Use in Patients with Clostridium difficile Infection. Drugs. Octubre de 2013; 73(15):1733-47.
38. Petrof EO, Khoruts A. From stool transplants to next-generation microbiota therapeutics. Gastroenterology. 2014; 146:1573-1582.
39. Eiseman B, Silen W, Bascom GS, Kauvar AJ. Fecal enema as an adjunct in the treatment of pseudomembranous enterocolitis. Surgery. 1958; 44:854-859.
40. Anand A, Bashey B, Mir T, Glatt AE, (1994) Epidemiology, clinical manifestations, and outcome of Clostridium difficile-associated diarrhea. The American journal of gastroenterology 89: 519-523
41. Freeman J, Bauer MP, Baines SD, Corver J, Fawley WN, Goorhuis B, Kuijper EJ, Wilcox MH, (2010) The changing epidemiology of Clostridium difficile infections. Clinical microbiology reviews 23: 529-549
42. Bauer MP, Goorhuis A, Koster T, Numan-Ruberg SC, Hagen EC, Debast SB, Kuijper EJ, van Dissel JT, (2008) Community-onset Clostridium difficile-associated diarrhoea not associated with antibiotic usage--two case reports with review of the changing epidemiology of Clostridium difficile-associated diarrhoea. The Netherlands journal of medicine 66: 207-211
43. Songer JG, Anderson MA, (2006) Clostridium difficile: an important pathogen of food animals. Anaerobe 12: 1-4
44. Kuijper E.J. y Tüll P (European Study Group for Clostridium difficile (ESGCD) y European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC)). 2006. Emergence of Clostridium difficile-associated disease in Canada, the United States of America and Europe. Second concept. 3 de Marzo.
45. Barbut F. y Petit J. C. 2001. Epidemiology of Clostridium difficile-associated infections. Clinical Microbiology and Infection. 7:405-410.
46. Wilson KH, (1993) The microecology of Clostridium difficile. Clin Infect Dis 16 Suppl 4: S214-218.
47. Bartlett J. G. 1994. Clostridium difficile: history of its role as an enteric pathogen and the current state of knowledge about the organism. Clinical Infection Diseases. 18:S265-272.
48. Walk S. T. y Young V. B. 2008. Emerging insights into antibiotic-associated diarrhea and Clostridium difficile infection through the lens of microbial ecology. Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases. 2008: 1-7.
49. Bouza E., Muñoz P. y Alonso R. 2005. Clinical manifestations, treatment and control of infections caused by Clostridium difficile. Clinical Microbiology and Infection. 11:57-64.
50. Briceño I. García P., Álvarez M., Ferres M. y Quiroga T. 2000. Diarrea asociada a Clostridium difficile: evaluación de varios métodos de diagnóstico. Revista Chilena de Infectología. 17:313-320.
51. J. Lucado CG, A. Elixhauser (2012) Clostridium difficile infections (CDI) in hospital stays. Healthcare Cost and Utilization Project. . Agency for Healthcare Research and Quality Statistical brief
52. Severe Clostridium difficile-associated disease in populations previously at low risk--four states, 2005. MMWR Morbidity and mortality weekly report 54: 1201-1205
53. Bignardi G. E. y Settle C. 2008. Different ribotypes in community-acquired Clostridium difficile. The Journal of Hospital Infection. 70: 96-98.

54. Bauer MP, Goorhuis A, Koster T, Numan-Ruberg SC, Hagen EC, Debast SB, Kuijper EJ, van Dissel JT, (2008) Community-onset *Clostridium difficile*-associated diarrhoea not associated with antibiotic usage--two case reports with review of the changing epidemiology of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea. *The Netherlands journal of medicine* 66: 207-211
55. 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). *Infection Control and Hospital Epidemiology*. Mayo de 2010; 31(5):431-55.
56. XIX Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Sevilla; 28-30 de Mayo de 2015. Madrid: elsevier; 2015
57. Reigadas Ramírez E, Reigadas Ramírez E. Estudio de la infección «*Clostridium difficile*»: incidencia, epidemiología, características clínicas, factores de riesgo de gravedad y recurrencia. [Madrid, España]: Universidad Complutense de Madrid; 2016.
58. Bauer MP, Notermans DW, van Benthem BH, Brazier JS, Wilcox MH, Rupnik M, et al. *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey. *Lancet* ((London, England)). 2011; 377(9759):63–73 (Epub 2010/11/19).
59. Kutty PK, Woods CW, Sena AC, Benoit SR, Naggie S, Frederick J, et al. Risk factors for and estimated incidence of community-associated *Clostridium difficile* infection, North Carolina, USA. *Emerg Infect Dis*. 2010; 16(2):197–204
60. Lessa FC. Community-associated *Clostridium difficile* infection: how real is it? *Anaerobe*. 2013; 24:121–3.
61. Allard R, Dascal A, Camara B, Letourneau J, Valiquette L. Community-acquired *Clostridium difficile* associated diarrhea, Montreal, 2005–2006: frequency estimates and their validity. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2011; 32(10):1032–4
62. Babey K, Kelton S, Milne WK, Muileboom J, Voth B, Kelly L, et al. *Clostridium difficile* infection in rural Ontario: a retrospective multisite population-based study. *Can J Rural Med*. 2015; 20(4):117-20.
63. Freedberg DE, Abrams JA. *Clostridium difficile* infection in the community: Are proton pump inhibitors to blame? *World J Gastroenterol* 2013; 19:6710-3.
64. Dial S, Delaney JA, Barkun AN, et al. Use of gastric acid-suppressive agents and the risk of community-acquired *Clostridium difficile*-associated disease. *JAMA* 2005; 294:2989-95.
65. Jacobson BC, Ferris TG, Shea TL, et al. Who is using chronic acid suppression therapy and why? *Am J Gastroenterol* 2003; 98:51-8.
66. Janarthanan S, Ditah I, Adler DG, et al. *Clostridium difficile*-associated diarrhea and proton pump inhibitor therapy: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2012; 107:1001-10.
67. Kwok CS, Arthur AK, Anibueze CI, et al. Risk of *Clostridium difficile* infection with acid suppressing drugs and antibiotics: meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2012; 107:1011-9.
68. Marwick CA, Yu N, Lockhart MC, et al. Community-associated *Clostridium difficile* infection among older people in Tayside, Scotland, is associated with antibiotic exposure and care home residence: cohort study with nested case-control. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68:2927-33.
69. Bloomfield LE, Riley TV. Epidemiology and Risk Factors for Community-Associated *Clostridium difficile* Infection: A Narrative Review. *Infectious Diseases and Therapy*. Septiembre de 2016; 5(3):231-51.
70. Deshpande A, Pasupuleti V, Thota P, Pant C, Rolston DD, Sferra TJ, et al. Community-associated *Clostridium difficile* infection and antibiotics: a meta analysis. *J Antimicrob Chemother*. 2013; 68(9):1951–61.

71. Wilcox MH, Mooney L, Bendall R, Settle CD, Fawley WN. A case-control study of community-associated *Clostridium difficile* infection. *J Antimicrob Chemother.* 2008; 62(2):388–96.
72. 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(9):1141-51
73. Dial S, Delaney J, Barkan A, Suissa S. Use of gastric acid-suppressive agents and the risk of community-acquired *Clostridium difficile*-associated disease. *J Am Med Assoc.* 2005; 294(23):2989–95.
74. Esposito A, Agraharkar M, Pitts W. Community-acquired, antibiotic unassociated, *Clostridium difficile* colitis: report of four patients. *Infect Dis Clin Pract.* 1997; 6(6):385–90.
75. Collins CE, Ayturk MD, Flahive JM, Emhoff TA, Anderson FA, Jr., Santry HP. Epidemiology and outcomes of community-acquired *Clostridium difficile* infections in Medicare beneficiaries. *J Am Coll Surg.* 2014; 218(6):1141–7 e1
76. Chitnis AS, Holzbauer SM, Belflower RM, Winston LG, Bamberg WM, Lyons C, et al. Epidemiology of community-associated *Clostridium difficile* infection, 2009 through 2011. *JAMA Intern Med.* 2013; 173(14):1359–67.
77. Hall I, O'Toole E. Intestinal flora in new-born infants: with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. *Am J Dis Child.* 1935; 49:390–402.
78. Denno DM, Shaikh N, Stapp JR, Qin X, Hutter CM, Hoffman V, et al. Diarrhea etiology in a pediatric emergency department: a case control study. *Clin Infect Dis.* 2012; 55(7):897–904
79. Ricciardi R, Ogilvie JW Jr, Roberts PL, Marcello PW, Concannon TW, Baxter NN. Epidemiology of *Clostridium difficile* colitis in hospitalized patients with inflammatory bowel diseases. *Dis Colon Rectum.* 2009; 52(1):40–5
80. Otten AM, Reid-Smith RJ, Fazil A, Weese JS. Disease transmission model for community-associated *Clostridium difficile* infection. *Epidemiol Infect.* 2010; 138(6):907–14.
81. Songer JG. Clostridia as agents of zoonotic disease. *Vet Microbiol.* 2010; 140(3–4):399–404
82. Wegener HC. Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. *Curr Opin Microbiol.* 2003; 6(5):439–45
83. Songer JG. The emergence of *Clostridium difficile* as a pathogen of food animals. *Anim Health Res Rev/ Conf Res Work Anim Dis.* 2004; 5(2):3216
84. Weese J. S., Staempfli H. R., Prescott J. F., Kruth S. A., Greenwood S. J. y Weese H. E. 2001a. The roles of *Clostridium difficile* and enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in diarrhea in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine.* 15:374–378.
85. Marks S. L. y Kather E. J. 2003. Antimicrobial susceptibilities of canine *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* isolates to commonly utilized antimicrobial drugs. *Veterinary Microbiology.* 94: 39–45.
86. Songer J. G., Post K. W., Larson D. J., Jost B. H. y Glock R. D. 2000. Infection of neonatal swine with *Clostridium difficile*. *Swine Health and Production.* 8:185-189.
87. Jones M. A. y Hunter D. 1983. Isolation of *Clostridium difficile* from pigs. *Veterinary Record.* 112:253.
88. Pirs T., Ocepek M. y Rupnik M. 2008. Isolation of *Clostridium difficile* from food animals in Slovenia. *Journal of Medical Microbiology.* 57:790–792.
89. Rodriguez-Palacios A., Stämpfli H. R., Duffield T., Peregrine A. S., Trotz-Williams L. A., Arroyo L. G., Brazier J. S. y Weese J. S. 2006. *Clostridium difficile* PCR ribotypes in calves, Canada. *Emerging Infectious Diseases.* 12: 1730-1736.
90. Simango C. 2006. Prevalence of *Clostridium difficile* in the environment in a rural community in Zimbabwe. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 100:1146—1150.

91. Orchard J. L., Fekety R. y Smith J. R. 1983. Antibiotic-associated colitis due to *Clostridium difficile* in a Kodiak bear. *American Journal of Veterinary Research*. 44:1547-1548.
92. Alderete PA, García Sánchez ME, Blanco Cancelo JL. *Clostridium difficile*: prevalencia e importancia ecológica en animales domésticos y fauna salvaje
93. Alam MJ, Anu A, Walk ST, Garey KW. Investigation of potentially pathogenic *Clostridium difficile* contamination in household environs. *Anaerobe*. 2014; 27:31–3.
94. Weese JS, Finley R, Reid-Smith RR, Janecko N, Rousseau J. Evaluation of *Clostridium difficile* in dogs and the household environment. *Epidemiol Infect*. 2010; 138(8):1100–4.
95. Al Saif N, Brazier JS. The distribution of *Clostridium difficile* in the environment of South Wales. *J Med Microbiol*. 1996; 45(2):133–7.
96. Deng K, Plaza-Garrido A, Torres JA, Paredes-Sabja D. Survival of *Clostridium difficile* spores at low temperatures. *Food Microbiol*. 2015; 46:218–21

