



BOLETIN

Instituto de Salud Pública de Chile

Vol. 4, No. 4, Abril 2014.

Vigilancia de laboratorio de *Clostridium difficile*. Chile, 2012 – 2013.

1. Antecedentes

Clostridium difficile, es un bacilo Gram positivo formador de esporas, anaerobio obligado, productor de toxinas que puede existir en estado vegetativo o esporulado (1). *Clostridium difficile* fue identificado en 1935 como parte de la microbiota normal de recién nacidos. En 1977, fue llamado *C. difficile* por Hall y O'Toole para reflejar la dificultad en su aislamiento atribuible a su crecimiento lento, en comparación con otras especies del género *Clostridium*. Las esporas son resistentes a los cambios físicos, altas temperaturas, luz ultravioleta y exposición a desinfectantes que no contienen cloruros así su capacidad para esporular aumenta. Se ha aislado por meses en centros de salud y por más de 40 días en pacientes después del egreso hospitalario (2).

Su importancia en Salud Pública radica en que durante las últimas tres décadas ha alcanzado un estado epidémico con aumento de la incidencia y gravedad. La infección por *C. difficile* (ICD) está entre las causas más comunes de infección adquirida en el hospital (3). El Centro de Control de Enfermedades (CDC), señala que en Estados Unidos es un problema grave en hospitales, hogares de ancianos y centros de atención ambulatoria, causando 14.000 muertes anualmente y enormes costos hospitalarios (4). Además, han surgido nuevos factores de riesgo para la ICD, y en los últimos años se ha descrito una nueva cepa hipervirulenta (3) que ha producido un cambio en la epidemiología de la ICD; ha aumentado la tasa de incidencia y severidad en los brotes. En EE.UU.

y Canadá entre 2002 y 2006, los brotes fueron más severos y periódicos, aumentando el número de pacientes con diagnóstico de "infección intestinal por *Clostridium difficile*". La mortalidad a 30 días atribuibles a ICD durante este periodo, fue del 6,9%. Los agentes etiológicos de ambos brotes fueron cepas casi idénticas de *C.difficile* conocida de forma diversa por su patrón de electroforesis en gel de campo pulsado, NAP1 (PFGE tipo 1 de Norteamérica); o por su designación ribotipo, 027; ahora se la designa comúnmente "NAP1/027" (5).

Es importante destacar que no todos los individuos colonizados desarrollan enfermedad por *C. difficile*, debido a que la patogenicidad de esta bacteria está directamente relacionada con la expresión de sus factores virulencia, asociado a la competencia inmunitaria del huésped (4).

Las enfermedades que resultan de la infección por *C.difficile* son colitis pseudo membranosa, megacolon tóxico, perforación del colon y sepsis. Los principales síntomas incluyen diarrea acuosa, fiebre, náuseas y dolor abdominal.

El riesgo de enfermedad aumenta en pacientes con exposición a antibióticos, larga estadía en establecimientos de salud, enfermedad subyacente grave, condiciones de inmunosupresión y edad avanzada (1).

Las principales vías de transmisión de *C. difficile* son por contacto directo con una persona infectada o colonizada, o por contacto indirecto con una superficie contaminada con esporas (2).

En relación con la patogénesis de *C. difficile*, se requieren varios factores para que cause enfermedad. El primero y más importante es la alteración de la microbiota intestinal normal, generado por el uso de antibióticos, especialmente clindamicina, penicilinas, cefalosporinas y recientemente fluoroquinolonas, entre otros. Una vez que se adhiere a los enterocitos utilizando las adhesinas, el resultado es la colonización. Posteriormente, se produce la liberación de toxinas A y B, que causan múltiples efectos, desencadenando la cascada de inflamación y manifestaciones clínicas de la enfermedad (6).

Los métodos para el diagnóstico de ICD pueden dividirse en tres categorías, pruebas para la detección de productos del agente o efectos de dichos productos directo de las deposiciones (detección de glutamato deshidrogenasa, detección de toxinas, ensayo de citotoxicidad), pruebas para detección de sus genes principalmente dirigidos a los que codifican las toxinas (tcdA, tcdB) y cultivo para aislamiento de cepas toxigénicas.

El procedimiento diagnóstico considerado estándar de referencia es el cultivo toxigénico, en el que a partir de aislados de *C. difficile* se realiza un ensayo de citotoxicidad en líneas celulares. Existen variaciones a este tradicional método que consisten en la detección de toxinas in vitro a través de PCR o EIA desde el aislado. El ensayo de citotoxicidad directo de deposiciones no es considerado en la actualidad el estándar de referencia y a pesar de ser más rápido que el cultivo toxigénico, ambas son técnicas laboriosas y no accesibles para el diagnóstico de rutina (7).

Existen disponibles tests de enzimoimmunoanálisis (EIA) para detección de toxina A y para detección de toxina A + B de *Clostridium difficile*, son metodologías de bajo costo comparados con métodos moleculares y menos laboriosas, si se comparan con técnicas de referencia, por lo que constituyen una herramienta ampliamente utilizada en los laboratorios de carácter asistencial en nuestro país. Según lo descrito en la revisión sistemática de Crobach et al, cuando se utiliza el ensayo de citotoxicidad en cultivo celular como estándar de referencia, se describe una sensibilidad que varía entre 31 a 99% y su especificidad entre 65 a 100 % y cuando se utiliza el cultivo toxigénico como estándar de referencia la sensibilidad es aún menor con cifras que varían entre 32 a 79% y una especificidad entre 84 a 100% (7). Los test EIA disponibles resultan ser bastante específicos, pero poco sensibles en comparación con las cifras descritas en la literatura para el test de Enzimoimmunoanálisis (EIA) para detección de glutamato deshidrogenasa (GDH) y la amplificación de ácidos nucleicos de genes de *C. difficile* (8, 9 10).

Actualmente también están disponibles pruebas de inmunoensayo para detectar Glutamato deshidrogenasa (GDH), enzima producida por todas las cepas de *C. difficile*, por lo que el test de Enzimoimmunoanálisis que la detecta directamente desde las deposiciones, revela la presencia de *C. difficile* tanto toxigénico como no toxigénico. Presenta menor especificidad que los test de enzimoimmuno ensayo (EIA) para detección de toxina A y/o B y que el test de amplificación de ácidos nucleicos de genes de toxina de *C. difficile* y su Valor predictivo positivo es inaceptablemente bajo aún en condiciones de alta prevalencia, con cifras de 71% en prevalencia de 50% (7, 11). Sin embargo, el alto Valor predictivo negativo de este test descrito entre un 95 a 100% y el hecho de que esta cifra no varía significativamente entre prevalencias de 5 y 20% de infección, lo transforma en un buen candidato para incluirlo como elemento de descarte en un algoritmo diagnóstico.

La amplificación de ácidos nucleicos de genes de toxina de *C. difficile* a través de PCR en tiempo real es una técnica sensible, específica, y es un método rápido de diagnóstico, sin embargo, no es utilizado ampliamente en los laboratorios clínicos de nuestro país principalmente por el alto costo asociado a su implementación y uso. En el meta-análisis de Deshpande en el que se analizaron un total de 19 estudios que cumplieron criterios de elegibilidad, se observó una sensibilidad de 90% (IC95: 88-91%), especificidad de 96% (IC 95 96-97%), con Odds Ratio diagnóstica (DOR) de 278.23. A pesar de la heterogeneidad observada la superioridad del desempeño de este test es constante en la mayoría de los estudios y se observa que la PCR tiene un alto grado de precisión (10,12).

En Chile, los brotes de infecciones gastrointestinales por *C. difficile* aparecen en las notificaciones nacionales desde el año 2006 en número reducido, con un incremento brusco y significativo desde el año 2010 en que se notificaron seis brotes y 31 en el año 2012, similar a lo observado en Europa y Norteamérica (13).

El estudio genético de los aislamientos de *C. difficile* realizado en el Instituto de Salud Pública de Chile, integró dos herramientas de Epidemiología Molecular: Electroforesis de Campo Pulsado (PFGE) y Estudio Multilocus (MLST), lográndose identificar en las cepas estudiadas la predominancia del clon 001, demostrándose que corresponde a una variante del clon internacional NAP-1, reportado por hospitales de países desarrollados (14, 15).

2. Materiales y métodos

Mediante el Ord 709 de ISP de fecha 25 de abril de 2012, se informó la disponibilidad en el ISP de herramientas de caracterización microbiológica y molecular para apoyar el estudio de brotes por *Clostridium difficile*, estableciéndose una vigilancia de laboratorio en casos de brotes de infecciones asociadas a la atención en salud causados por este agente.

Se analizó la base de datos correspondiente a todas las muestras recibidas en el ISP para la confirmación de *C. difficile* por el Laboratorio de Agentes Emergentes y Zoonóticos, en el periodo 2012 - 2013.

El Laboratorio de Agentes Emergentes y Zoonóticos, realiza la confirmación microbiológica mediante cultivo de muestras de deposición en medio selectivo, previo shock etanólico de la muestra e identificación de las colonias sospechosas mediante pruebas bioquímicas tradicionales y espectrometría de masas MALDI-TOF.

Los aislamientos obtenidos fueron sometidos a un estudio de caracterización, el cual incluyó la subtipificación molecular y estudio de susceptibilidad antimicrobiana. Las cepas fueron sometidas a subtipificación genética por medio de la prueba de electroforesis de campo pulsado, utilizando un protocolo internacional estandarizado provisto por el Institut National de Santé Publique du Québec, Canadá (INSPQ). Este análisis utilizó la enzima *SmaI*, los perfiles obtenidos fueron analizados a través del programa bioinformático Bionumerics,

y fueron almacenados en una librería genética nacional. Los subtipos obtenidos fueron codificados, asignándose un código numérico a cada nuevo subtipo identificado. Como parte del proceso de estandarización una muestra de estos perfiles fue analizada en el INSPQ utilizando el mismo programa bioinformático. La genotipificación del gen regulador de la producción de toxinas *tcdC*, fue realizada a través de la secuenciación automatizada de este gen, en búsqueda de deleciones asociadas a cepas hipervirulentas o epidémicas.

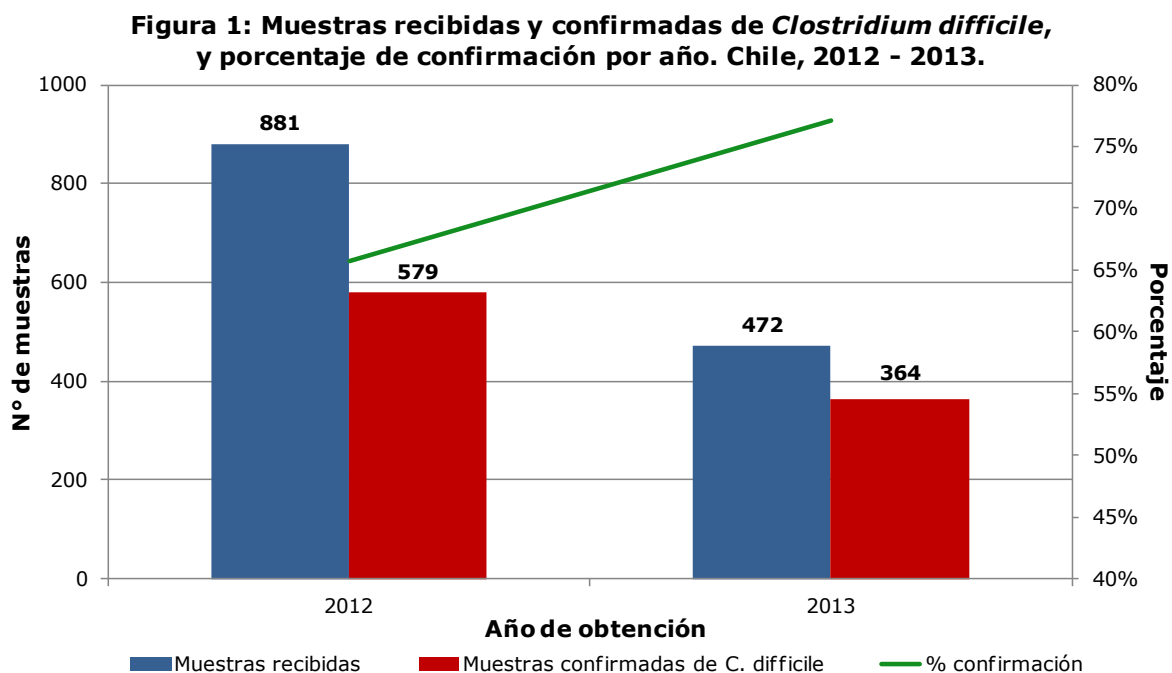
Se realizó análisis de susceptibilidad antimicrobiana para metronidazol y vancomicina por el método de dilución en agar, determinándose concentración inhibitoria mínima (CIM) en una muestra representativa de las cepas obtenidas y de acuerdo a los estándares del Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Los resultados fueron analizados utilizando los puntos de corte vigentes provistos por el CLSI (metronidazol) y EUCAST (vancomicina). El método de susceptibilidad por dilución en agar fue implementado en el laboratorio de referencia del Instituto de Salud pública de Chile, bajo apoyo técnico del Institut National de Santé Publique du Québec (INSPQ). Una muestra de aislamientos fue sometida a comparación interlaboratorio.

El análisis estadístico se realizó por año epidemiológico, según fecha de obtención de muestra. Los datos se capturaron y procesaron en el paquete Excel 2007 y el software estadístico para el análisis de los datos, Stata 12. Las bases de datos se depuraron eliminando los registros correspondientes a un mismo paciente, sin embargo se mantuvieron cuando hubo un nuevo aislamiento en un período mayor o igual a 30 días.

3. Resultados vigilancia de *Clostridium difficile* 2012 – 2013

En el periodo 2012 – 2013, se recibió un total de 1.353 muestras para confirmación de *C. difficile*. De estas, el 69,7% fue confirmada como positiva.

El año 2012 se recibieron y confirmaron una mayor cantidad de muestras que el año 2013. El porcentaje de confirmación fue superior en el año 2013 (77,1%) en comparación con el 2012 (65,7%).



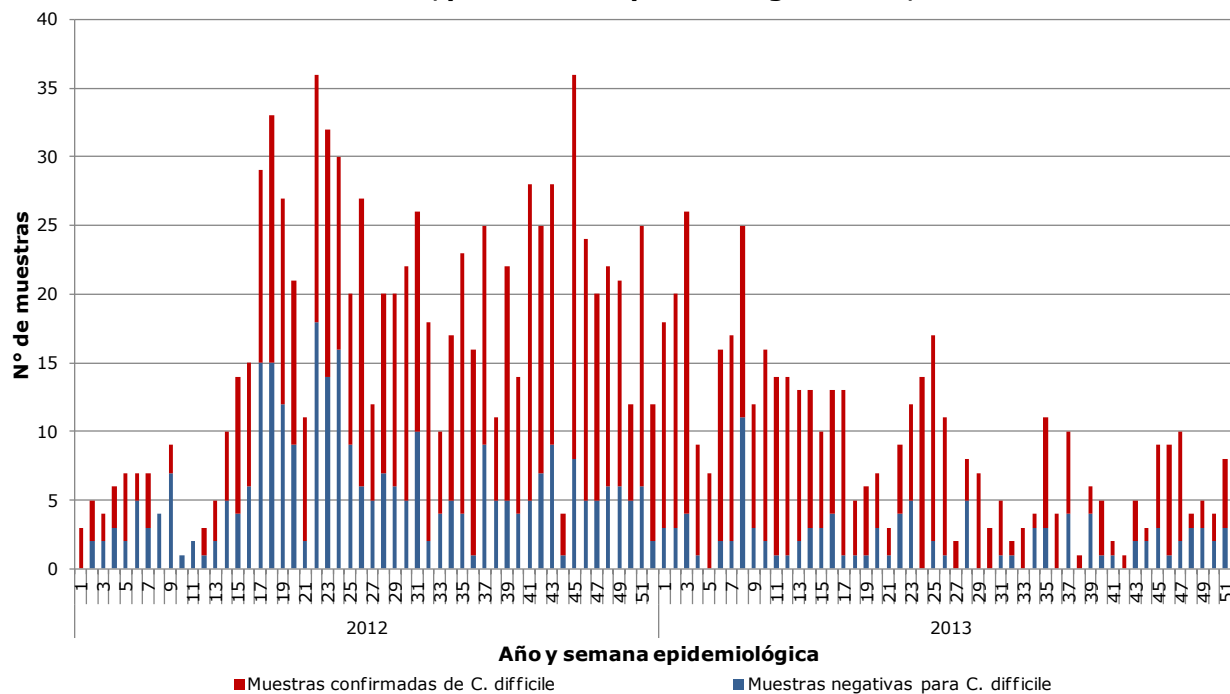
Muestras recibidas y confirmadas de *C. difficile*, por semana epidemiológica.

La figura 2 refleja la distribución de las muestras recibidas para estudio de *C. difficile* según resultado y semana epidemiológica por fecha de obtención de muestra.

Se observó una disminución en el año 2013 tanto del número de muestras recibidas como confirmadas de *C. difficile*. El año 2012 el promedio de muestras confirmadas de *C. difficile* por semana fue de 11,8 muestras,

mientras que el año 2013 el promedio de muestras confirmadas fue de 7 muestras por semana.

Figura 2: Resultado de las muestras recibidas para confirmación de *Clostridium difficile*, por semana epidemiológica. Chile, 2012 - 2013.

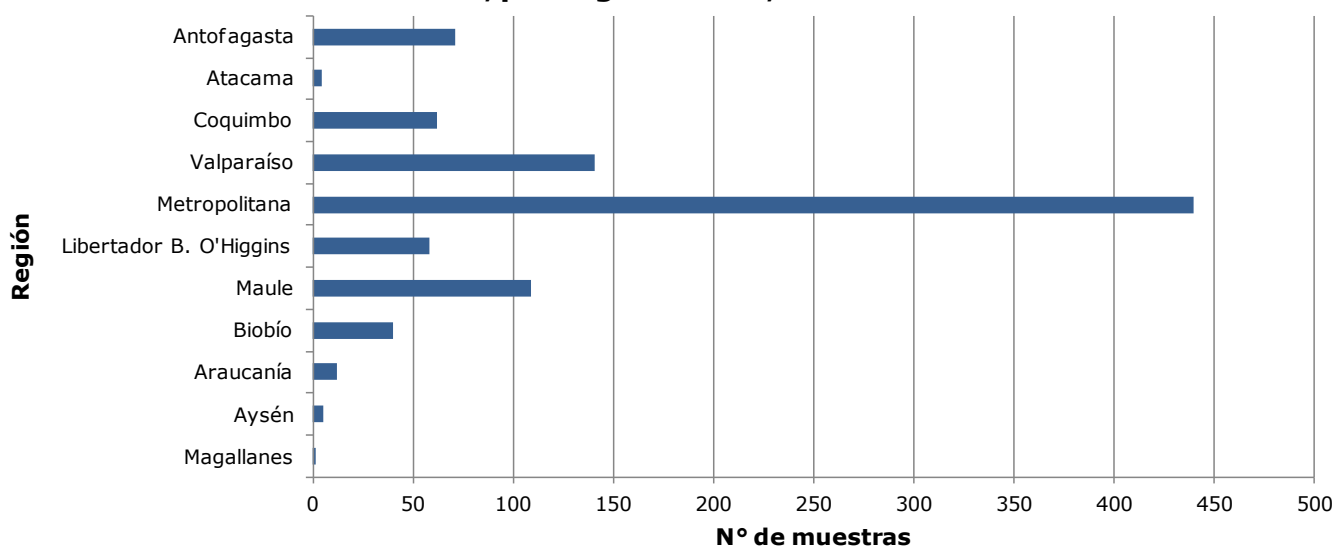


Fuente: Laboratorio de Agentes Emergentes y Zoonóticos. Instituto de Salud Pública, 2014.

Muestras recibidas y confirmadas de *C. difficile*, por región.

En la figura 3 se observa la distribución de las muestras confirmadas de *C. difficile* por región. El 46,7% de las muestras provenían de centros asistenciales de la Región Metropolitana. Le siguen en frecuencia las regiones de Valparaíso, Maule y Antofagasta, con porcentajes de 15,0%, 11,6% y 7,5%, respectivamente.

Figura 3: Distribución de muestras confirmadas de *Clostridium difficile*, por región. Chile, 2012- 2013.



Fuente: Laboratorio de Agentes Emergentes y Zoonóticos. Instituto de Salud Pública, 2014.

Los mayores porcentajes de confirmación del periodo se observaron en cepas provenientes de centros asistenciales de las regiones de Coquimbo, Antofagasta y Metropolitana (tabla 1).

Tabla 1: Muestras recibidas, confirmadas de *Clostridium difficile* y porcentaje de confirmación por año. Chile, 2012 - 2013.

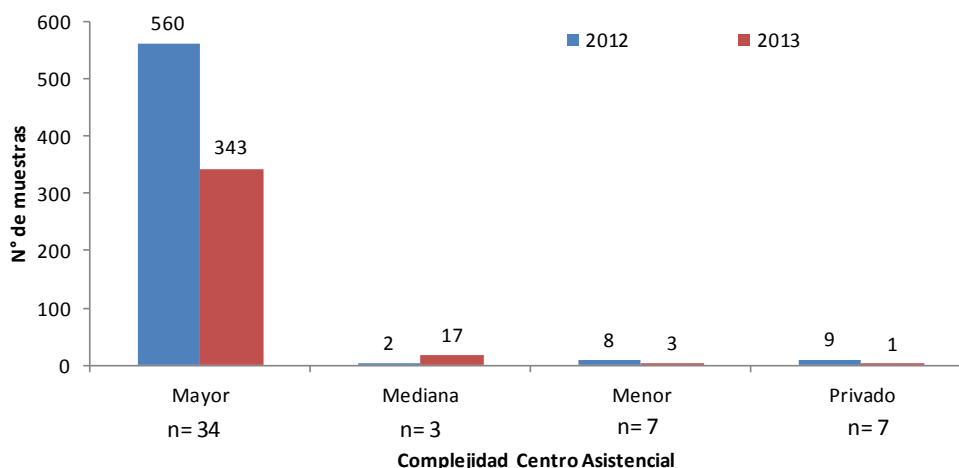
Región	2012			2013			2012 - 2013		
	R	C	%	R	C	%	R	C	%
Antofagasta	64	53	82,8%	21	18	85,7%	85	71	83,5%
Atacama	8	4	50,0%	0	0	-	8	4	50,0%
Coquimbo	17	14	82,4%	50	48	96,0%	67	62	92,5%
Valparaíso	180	116	64,4%	38	25	65,8%	218	141	64,7%
Metropolitana	381	264	69,3%	224	176	78,6%	605	440	72,7%
Libertador B, O'Higgins	72	46	63,9%	16	12	75,0%	88	58	65,9%
Maule	97	67	69,1%	71	42	59,2%	168	109	64,9%
Biobío	12	3	25,0%	44	37	84,1%	56	40	71,4%
Araucanía	40	12	30,0%	0	0	-	40	12	30,0%
Los Lagos	4	0	0,0%	0	0	-	4	0	0,0%
Aysén	5	0	0,0%	7	5	71,4%	12	5	41,7%
Magallanes	1	0	0,0%	1	1	100,0%	2	1	50,0%
Total	881	579	65,7%	472	364	77,1%	1353	943	69,7%

*R: muestras recibidas, C: muestras confirmadas, %: porcentaje de confirmación.

Fuente: Laboratorio de Agentes Emergentes y Zoonóticos. Instituto de Salud Pública, 2014.

En el periodo 2012 - 2013, el 95,8% de las muestras confirmadas de *C. difficile* proceden de centros asistenciales de mayor complejidad (figura 4).

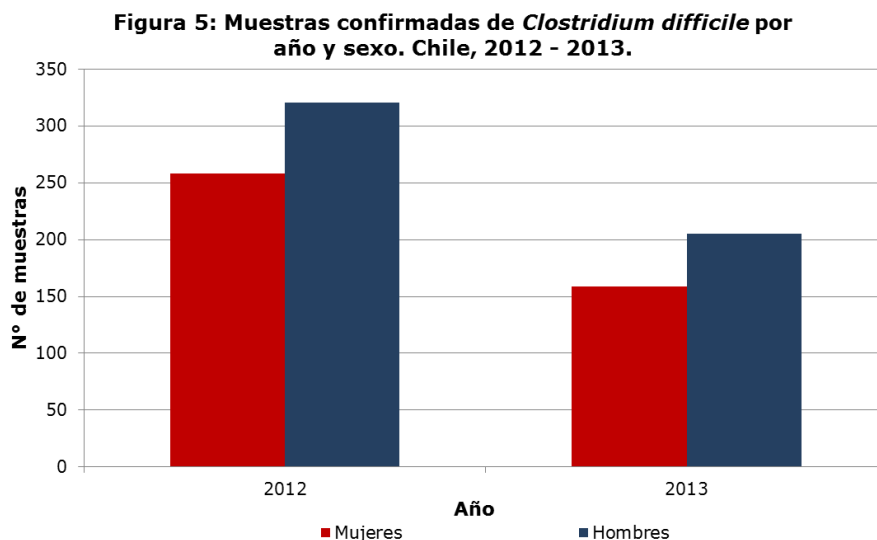
Figura 4: Muestras confirmadas de *Clostridium difficile* por año y complejidad del centro asistencial de procedencia. Chile, 2012 -2013.



Fuente: Laboratorio de Agentes Emergentes y Zoonóticos. Instituto de Salud Pública, 2014.

Muestras confirmadas de *C. difficile* por sexo.

En el periodo 2012 – 2013, el 55,8% de muestras confirmadas de *C. difficile* correspondió a los hombres y 44,2% a las mujeres (figura 5).

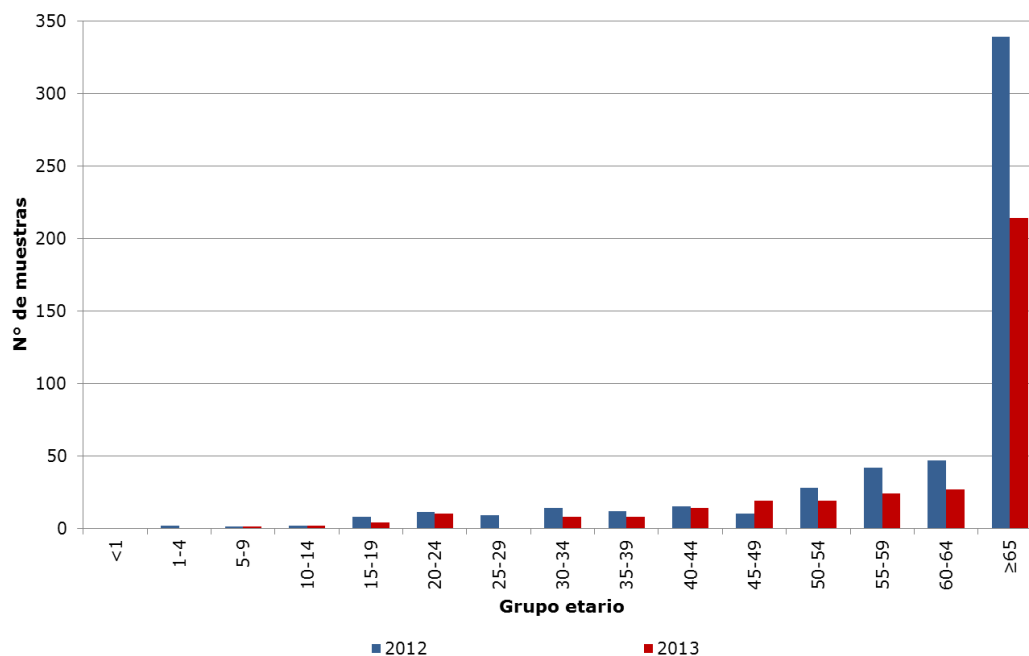


Muestras confirmadas de *C. difficile* por grupo etario.

En el total de muestras confirmadas de *C. difficile* en el periodo de estudio con información de la edad (n=890), el grupo etario más frecuente fue el de adultos mayores de 65 o más años, con el 62,1% del total de muestras confirmadas. Le sigue en frecuencia los grupos de 60 a 64 años y 55 a 59 años, con porcentajes de 8,3% y 7,4% respectivamente.

Se observó una distribución similar de las muestras por grupo etario los dos años del periodo (figura 6).

Figura 6: Distribución de muestras confirmadas de *Clostridium difficile* por año y grupo etario. Chile, 2012 - 2013.



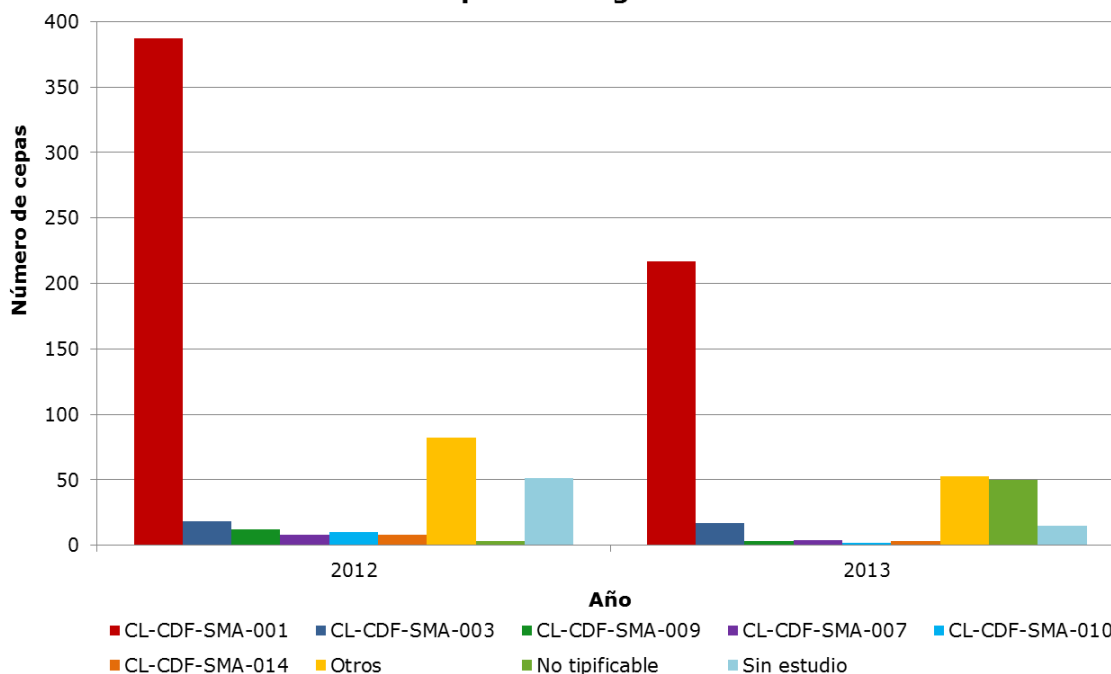
Fuente: Laboratorio de Agentes Emergentes y Zoonóticos. Instituto de Salud Pública, 2014.

Caracterización genética de *Clostridium difficile*.

Se realizó la subtipificación genética por Electroforesis de Campo Pulsado (PFGE) al 93,0% (877/943) de las muestras confirmadas de *C. difficile*. El subtipo genético denominado localmente como CL-CDF-SMA-001 representó el 73,3% (387/528) de las cepas estudiadas el 2012, y el 62,2% (217/349) de las cepas estudiadas el 2013. El resto de los clones identificados no se observaron en más de 35 cepas en todo el periodo.

La figura 7 muestra la distribución de las cepas de *C. difficile* según subtipificación genética.

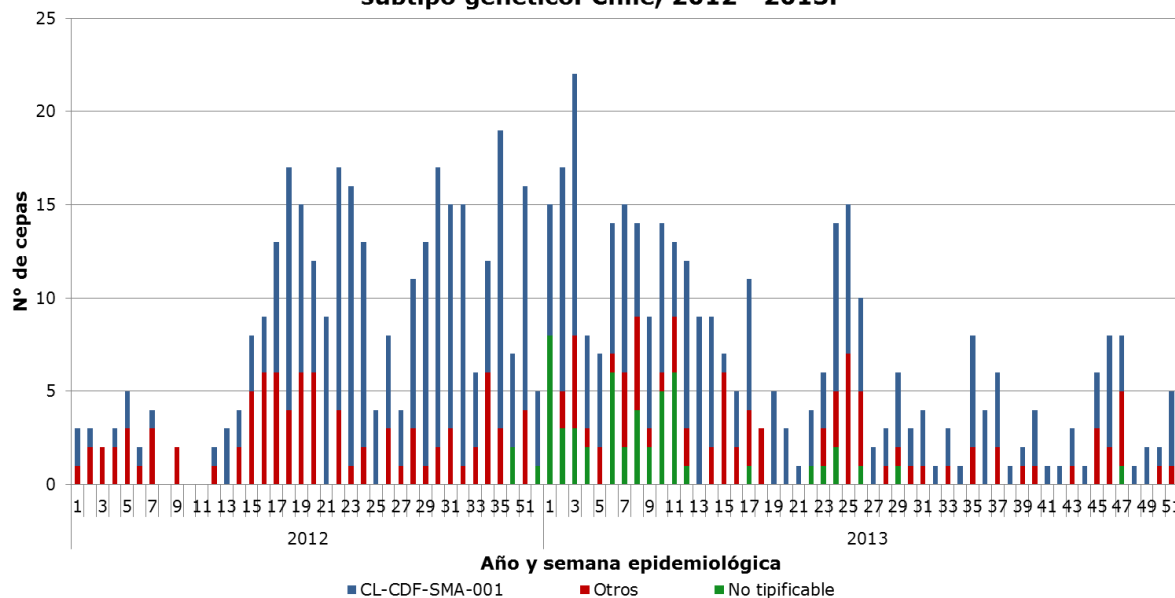
Figura 7: Distribución de cepas de *Clostridium difficile* por subtipificación genética.



Fuente: Subdepartamento de Genética Molecular. Instituto de Salud Pública, 2014.

En la semana epidemiológica N°15 del año 2012, comenzó el aumento de las cepas correspondientes al clon CL-CDF-SMA-001 (figura 8).

Figura 8: Distribución semanal de cepas de *Clostridium difficile* por subtipo genético. Chile, 2012 - 2013.



Fuente: Subdepartamento de Genética Molecular. Instituto de Salud Pública, 2014.

La tabla 2 muestra la cantidad y porcentaje de cepas de *C. difficile* CL-CDF-SMA-001, para cada año del periodo, del total de cepas que fueron estudiadas por Electroforesis de Campo Pulsado (PFGE) por región. Se aisló el subtipo genético CL-CDF-SMA-001 en la mayoría de las regiones, siendo el perfil dominante.

Tabla 2: Cantidad y porcentaje de cepas de *Clostridium difficile* CL-CDF-SMA-001 por región y año. Chile, 2012 - 2013.

Región	2012			2013		
	Total cepas estudiadas	CL-CDF-SMA-001	%	Total cepas estudiadas	CL-CDF-SMA-001	%
Antofagasta	45	40	88,9%	18	10	55,6%
Atacama	4	4	100,0%	0	0	-
Coquimbo	11	10	90,9%	47	41	87,2%
Valparaíso	107	92	86,0%	24	17	70,8%
Metropolitana	236	154	65,3%	170	95	55,9%
Libertador B. O'Higgins	46	36	78,3%	12	6	50,0%
Maule	65	50	76,9%	41	30	73,2%
Biobío	2	0	0,0%	31	17	54,8%
Araucanía	12	1	8,3%	0	0	-
Aysén	0	0	-	5	1	20,0%
Magallanes	0	0	-	1	0	0,0%
Total	528	387	73,3%	349	217	62,2%

Fuente: Subdepartamento de Genética Molecular. Instituto de Salud Pública, 2014.

El perfil de electroforesis CL-CDF-SMA-001, se comparó con la base de datos molecular de Quebec (Institut National de Santé Publique du Québec, INSPQ), lo que permitió determinar una cercanía genética a través de la presencia de tan solo tres bandas de diferencia en relación al perfil de electroforesis de campo pulsado del tipo NAP-1. Análisis posteriores a través de MLST (secuenciación de multilocus) de 5 cepas correspondientes a este subtipo genético revelaron que este corresponde al tipo de secuencia ST1, mismo tipo de secuencia (ST) asociado a NAP-1, lo que confirma su nexo filogenético con este clon epidémico y la presencia de una variante local NAP-1 en nuestro país.

Dada la asociación de la delección descrita en la literatura del gen *tcdC* (gen regulador de la producción de toxinas) con el clon epidémico NAP1 y con la finalidad de complementar la caracterización molecular de este agente, se realizó la genotipificación por secuenciación del gen regulador *tcdC* de cepas estudiadas por PFGE durante el 2012 y 2013 respectivamente. A través de este

se estudió la presencia de deleción de 18 nucleótidos en 845 cepas, y la presencia de deleción puntual en posición 117, en 751 cepas, del total de confirmadas en el periodo.

Se observó presencia de la deleción de 18 nucleótidos y de deleción puntual en posición 117, en el 100% de las cepas pertenecientes al subtipo genético CL-CDF-SMA-001, tanto en el año 2012 como en 2013. Ambas deleciones fueron observadas en menor frecuencia, en otros subtipos genéticos (tabla 3).

Tabla 3: Presencia de deleción de 18 nucleótidos y deleción en la posición 117 en gen *tcdC* en cepas de *Clostridium difficile* según subtipo genético y año. Chile, 2012 - 2013.

Subtipo genético	2012					
	Deleción 18 nt			Deleción 117 nt		
	Total cepas estudiadas	n	%	Total cepas estudiadas	n	%
CL-CDF-SMA-001	375	375	100,0%	329	329	100,0%
OTROS	127	18	14,2%	78	8	10,3%
NT	3	2	66,7%	3	2	66,7%
Subtipo genético	2013					
	Deleción 18 nt			Deleción 117 nt		
	Total cepas estudiadas	n	%	Total cepas estudiadas	n	%
CL-CDF-SMA-001	213	213	100,0%	214	214	100,0%
OTROS	79	10	12,7%	79	8	10,1%
NT	48	24	50,0%	48	23	47,9%

Fuente: Subdepartamento de Genética Molecular. Instituto de Salud Pública, 2014.

Susceptibilidad antimicrobiana

En el periodo de estudio, se analizó la susceptibilidad antimicrobiana de 410 cepas confirmadas de *C. difficile*: 203 correspondientes al año 2012 y 207 al año 2013.

En ambos años de estudio, se observó 100% de sensibilidad a metronidazol en las cepas estudiadas (estándar CLSI M100 S23 2013). Respecto a vancomicina, se detectó una cepa correspondiente al año 2012, con CIM 4 µg/mL, lo cual corresponde a susceptibilidad reducida, según estándar EUCAST 2013 para vancomicina. Este hallazgo fue confirmado por el INSPQ (tabla 4).

Tabla 4: Susceptibilidad antimicrobiana de cepas confirmadas de *Clostridium difficile* . Chile, 2012 - 2013

Antimicrobiano		2012	2013	2012 - 2013
Metronidazol	% S	100,0%	100,0%	100,0%
	n	201	360	561
Vancomicina	% S	99,5%	100,0%	99,8%
	% SR	0,5%	0,0%	0,2%
	n	203	359	562

*%S: porcentaje de sensibilidad, % SR: porcentaje de susceptibilidad reducida, n: total cepas estudiadas.

Fuente: Laboratorio de Agentes Emergentes y Zoonosis. Instituto de Salud Pública, 2014.

4. Conclusión

En el periodo de estudio 2012 – 2013, se confirmó un total de 943 muestras de *C. difficile* del total de 1.353 muestras recibidas para estudio en el ISP (69,7%). El porcentaje de confirmación fue superior en el año 2013 (77,1%) en comparación con el 2012 (65,7%). El 46,7% de las muestras confirmadas de *C. difficile* provenían de la Región Metropolitana.

Del total de muestras confirmadas el 95,8% procedían de centros asistenciales de mayor complejidad.

Considerando la totalidad del periodo estudiado, el grupo etario en que se confirmó el mayor número de cepas fue el de 65 o más años, seguido por los de 60 a 64 años, y de 55 a 59 años. En cuanto a la distribución por sexo, predominó el sexo masculino con el 55,8%.

En cuanto a la susceptibilidad antimicrobiana, se observó que un 100% de las cepas estudiadas resultaron sensibles a metronidazol. Respecto de vancomicina, se observó susceptibilidad reducida en una cepa confirmada el año 2012, y el resto de las cepas analizadas resultaron sensibles a este antimicrobiano.

En el análisis de subtipificación genética a través de Electroforesis de Campo Pulsado se observó que el 68,9% de las cepas estudiadas por este método en todo el periodo correspondían al clon CL-CDF-SMA-001. Este perfil de

electroforesis presenta nexo filogenético con el clon epidémico NAP-1, lo que sumado a los hallazgos en el gen *tcdC*, tales como la presencia de delección de 18 nucleótidos y de delección puntual en posición 117 en el 100% de las cepas pertenecientes a este perfil genético, revela la presencia de una variante NAP-1 en el país.

5. Bibliografía

1. Center for Disease Control. *Clostridium difficile* infection. Accesible en URL: <http://www.cdc.gov/HAI/organisms/cdiff/Cdiff>. Consultada el 01 abril de 2014.
2. Khanna S. y Darrell S. *Clostridium difficile* Infection: Management Strategies for a Difficult Disease. *Ther Adv Gastroenterol*. 2014; 7(2):72 – 86.
3. Vital Signs: Stopping *C. difficile* Infections. Marzo 2012. Accesible en URL: <http://www.cdc.gov/features/vitalsigns/c.diff/>. Consultada el 01 abril de 2014.
4. Blanco A., Ruiz O., Otero W. y Gómez M. Infección por *Clostridium difficile* en ancianos. *Rev Col Gastroenterol* / 28 (1) 2013.
5. Cohen S., Gerding D., Johnson S., Kelly C., Loo V., McDonald C., Pepin J. y Wilcox M. Guías de práctica clínica para la infección por *Clostridium difficile* en adultos: actualización 2010. Sociedad de Salud Epidemiológica de Norteamérica (SHEA) y Sociedad de Enfermedades Infecciosas de Norteamérica (IDSA). Source: *Infection Control and Hospital Epidemiology*, Vol. 31, No. 5 (May 2010), pp. T1-T28. Source: *Infection Control and Hospital Epidemiology*, Vol. 31, No. 5 (May 2010), pp. T1-T28 Accesible en URL: <http://www.jstor.org/stable/10.1086/657453>. Consultada el 01 de abril de 2014.

6. Guidance on Prevention and Control of *Clostridium difficile* Infection (CDI) in Care Settings in Scotland Health Protection Network Revised January 2014. Accesible en URL:
<http://www.hps.scot.nhs.uk/haic/sshaip/clostridiumdifficile>
Consultada el 01 abril de 2014.
7. Crobach MJ, Dekkers OM, Wilcox MH, Kuiper EJ. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: data review and recommendations for diagnosisng *Clostridium difficile* infection (CDI). Clin Microbiol Infect. 2009; 15 (12):1053-66.
8. Planche T, Aghaizu A, Holliman R et al. Diagnosis of *Clostridium difficile* infection by toxin detection Kits: a systematic review. Lancet Infect Dis. 2008; 8 (12): 777-84.
9. Shetty N, Wren MWD, Coen PG. The role of glutamate dehydrogenase for the detection of *Clostridium difficile* in faecal samples: a meta-analysis. J Hosp Infect. 2011 Jan;77(1):1-6.
10. O'Horo J, Jones A, Sternke M et al. Molecular techniques for diagnosis of *Clostridium difficile* infection: Systematic Review and Meta-análisis.
11. Surawicz CM, Brandt LJ, Binion DG et al. Guidelines for diagnosis, treatment, and prevention of *Clostridium difficile* infections. Am J Gastroenterol. 2013; 108(4): 478-98.
12. Deshapende A, Pasapuleti V, Rolson DD et al. Diagnostic accuracy of real-time polymerase chain reaction in detection of *Clostridium difficile* in the stool samples of patients with suspected *Clostridium difficile* infection: a meta-analysis. Clin Infect Dis. 2011; 53(7):81-90.

13. Ministerio de Salud de Chile. Subsecretaría de Redes Asistenciales Norma para el manejo de brotes de diarreas por *Clostridium difficile*. Circular N° 30 del 24 de septiembre de 2013.
14. Instituto de Salud Pública de Chile. *Clostridium difficile*. Confirmación ISP. 9 de mayo de 2012. Accesible en URL: http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento/2012/10/presentacion_clostridium_difficile_mayo_2012.pdf Consultada el 01 abril de 2014.
15. Estudio de brotes *C. difficile*. ORD N° 0709 del 24 de abril de 2012. Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia. Instituto de Salud Pública de Chile.

Agradecimientos

Agradecemos especialmente a todas las personas que han participado en la recolección, envío, recepción, procesamiento y registro de las muestras, así como aquellas que han participado en la revisión de este documento.