



Instituto de
Salud Pública
Ministerio de Salud

Gobierno de Chile

BOLETÍN VIGILANCIA DE LABORATORIO

Clostridium difficile. Chile 2013-2018

VOL 9 N° 9 SEPTIEMBRE DE 2019



Clostridium difficile. Chile 2013-2018

1. ANTECEDENTES

Clostridium difficile o *Clostridioides difficile* (*C. difficile*) (1) es un bacilo Gram positivo anaeróbico, productor de toxinas y formador de esporas (2). Este agente es ubicuo, sobretodo en hospitales e instituciones de cuidado a largo plazo (3). *C. difficile* puede formar parte de la microbiota habitual intestinal en recién nacidos sanos, sin embargo, es la principal causa de infecciones asociadas a la atención en salud y diarrea en pacientes hospitalizados (2). Así también, *C. difficile* es la causa más común de diarrea asociada con el uso de antimicrobianos (4).

Este agente infecta tanto a seres humanos como animales, la vía de transmisión es fecal-oral y en pacientes hospitalizados se puede producir por ingestión de esporas de otros pacientes, a través de manos del personal de salud, fómites o superficies ambientales (2).

El estado de portador puede ser sintomático o asintomático, donde la colonización fecal aumenta en proporción a la duración de la hospitalización, siendo \geq a 20% en pacientes adultos con más de dos semanas de permanencia, mientras en la comunidad la portación es de sólo entre 1 y 3% (3). En niños, especialmente en menores de 1 año, la portación de *C. difficile* en deposiciones es muy superior a los adultos, alcanzando en promedio un 37%, con rangos descritos entre un 25-80%, pero a pesar de esta alta colonización, la presentación de diarrea aguda antes del año de vida es muy infrecuente (5).

Un estudio de carga de enfermedad (Lessa 2015), estimó 453.000 infecciones por *C. difficile* en Estados Unidos y 29.300 muertes en el año 2011 (6). Un 65,8% de estas infecciones estaban asociadas a atenciones de salud y un 24,2% se iniciaron durante hospitalizaciones (6).

El cuadro clínico por *C. difficile* abarca desde diarrea moderada hasta megacolon tóxico y colitis pseudomembranosa con riesgo vital (4). Este cuadro diarreico aparece frecuentemente tras el uso de antimicrobianos, especialmente clindamicina, cefalosporinas y fluoroquinolonas (7). Estos antibióticos producen alteración de la microbiota intestinal, creando un ambiente que favorece la germinación y crecimiento vegetativo de *C. difficile* (8). Otros factores de riesgo asociados a *C. difficile* son edad mayor a 65 años, hospitalizaciones prolongadas, comorbilidades como enfermedad inflamatoria intestinal, inmunodeficiencia, malnutrición, obesidad, hipoalbuminemia, cirugías gastrointestinales, alimentación por sonda enteral, administración de medicamentos antiácidos e infección con *C. difficile* previa (2,3,9). Asimismo, se estima que el 15 a 35% de las personas infectadas por *C. difficile*, presenta recaídas (10). Actualmente, existen dos vacunas que están en fase III de investigación a nivel mundial (11).

Los principales factores de virulencia de *C. difficile* son las toxinas A y B, codificadas por los genes *tcdA* y *tcdB*, respectivamente. La expresión de ambos genes está regulada en forma positiva por *tcdR* y en forma negativa por el gen *tcdC*. En relación a las alteraciones genéticas en el gen *tcdC*, destacan las deleciones de 18, 39 o 54 nucleótidos y la deleción puntual en la posición 117 (eliminación de 1 pb) o la transición de citosina a timina en la posición 184 (12). La deleción en posición 117 del gen *tcdC*, provoca

la hiperexpresión de toxinas, alcanzando aproximadamente una producción 16 veces mayor de toxina A y 23 veces más de toxina B, en comparación a una cepa control (13).

En la última década, ha emergido el ribotipo 027, también denominado The North American Pulsed-field gel electrophoresis type 1, restriction endonuclease analysis type B1, polymerase chain reaction ribotype 027 (NAP1/B1/027), constituyendo una de las cepas predominantes en Europa y Norte América (14). En esta última zona, registra una prevalencia de alrededor del 22% - 36% y siendo la cepa más frecuente asociada a brotes por *C. difficile* (14). Este ribotipo se caracteriza por presentar una delección en posición 117 del gen *tcdC*, además de susceptibilidad reducida a metronidazol, rifampicina, moxifloxacina, clindamicina, imipenem y cloranfenicol (15).

Así también, se ha descrito que la cepa NAP1/B1/027, está asociada a cuadros clínicos de mayor severidad, largos períodos de convalecencia y mayor tasa de mortalidad. Por otra parte, esta cepa ha aumentado la incidencia en pacientes que no presentan los factores de riesgo descritos para este agente (12).

En Chile, el boletín de vigilancia *C. difficile* 2012-2013, describe que el 68,9% de las cepas analizadas con subtipificación genética a través de Electroforesis de Campo Pulsado, correspondían al denominado localmente clon CL-CDF-SMA-001. Este perfil, presenta nexos filogenéticos con el clon epidémico NAP-1, revelando la presencia de esta variante en el país (16).

2. MATERIAL Y METODO

Mediante el Ord. N° 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 *C. 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 confirmación de *C. difficile* por el Laboratorio de Agentes Emergentes y Zoonóticos, en el periodo 2013-2018.

El laboratorio de Agentes Emergentes y Zoonóticos de la sección Bacteriología, realiza la confirmación microbiológica mediante cultivo anaerobio de muestras de deposición, sometiendo las muestras a shock etanólico y siembra en un medio selectivo enriquecido. La identificación de las colonias sospechosas se realiza mediante pruebas bioquímicas tradicionales y espectrometría de masas MALDI-TOF.

Los aislamientos obtenidos fueron sometidos a un estudio de caracterización, el cual incluyó detección de toxinas, detección de genes que codifican para toxinas, subtipificación molecular y estudio de susceptibilidad antimicrobiana.

La detección de toxinas A y B se realizó mediante inmunocromatografía, y a partir del año 2018 se realiza detección de genes *tcdA* y *tcdB* mediante reacción en cadena de la polimerasa.

La subtipificación genética se realizó por medio de la prueba de electroforesis de campo pulsado, utilizando el 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 anteponiendo las siglas CL-CDF-SMA al número de clon. 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 genética automatizada por método de Sanger, en búsqueda de mutaciones asociadas a cepas hipervirulentas o epidémicas. El análisis bioinformático fue mediante comparación nucleotídica y amniacídica.

Se realizó la prueba 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 clínica. 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.

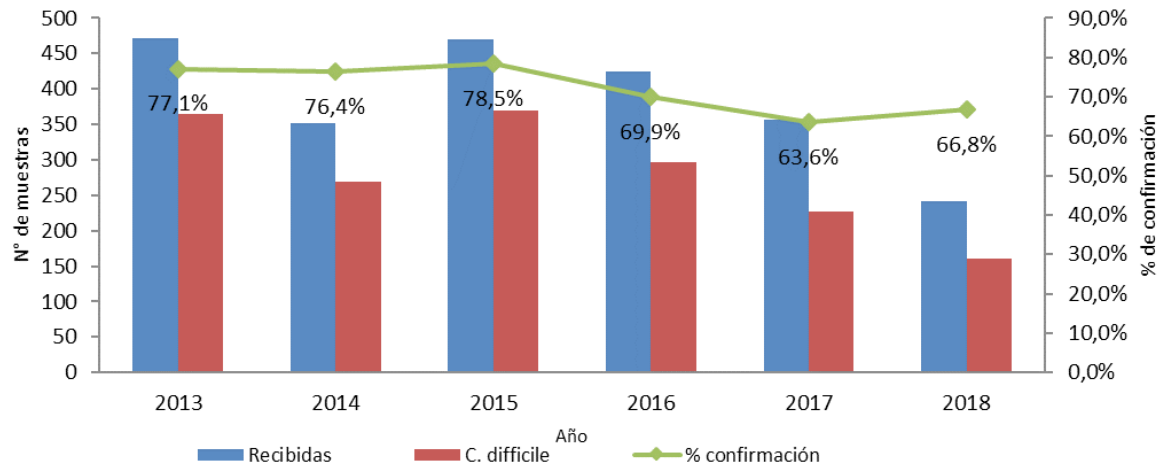
3. LIMITACIONES:

Considerando que la información se recopiló mediante un plan de vigilancia, y no mediante un plan de muestreo estadístico, cuyo fin es representar de manera apropiada a la población bajo estudio, es que las herramientas estadísticas aplicables al conjunto de datos son limitadas, incluyendo las metodologías en el plano inferencial.

4. RESULTADOS

En el periodo 2013 -2018 se recibió un total de 2.317 muestras para confirmación de *C. difficile*, de éstas 72,8% (1.687/2.317) fueron confirmadas. El mayor número de muestras recibidas correspondió al año 2013 (472). Sin embargo, el mayor porcentaje de confirmación se registró en el año 2015 con 78,5% (369/470) (Figura 1).

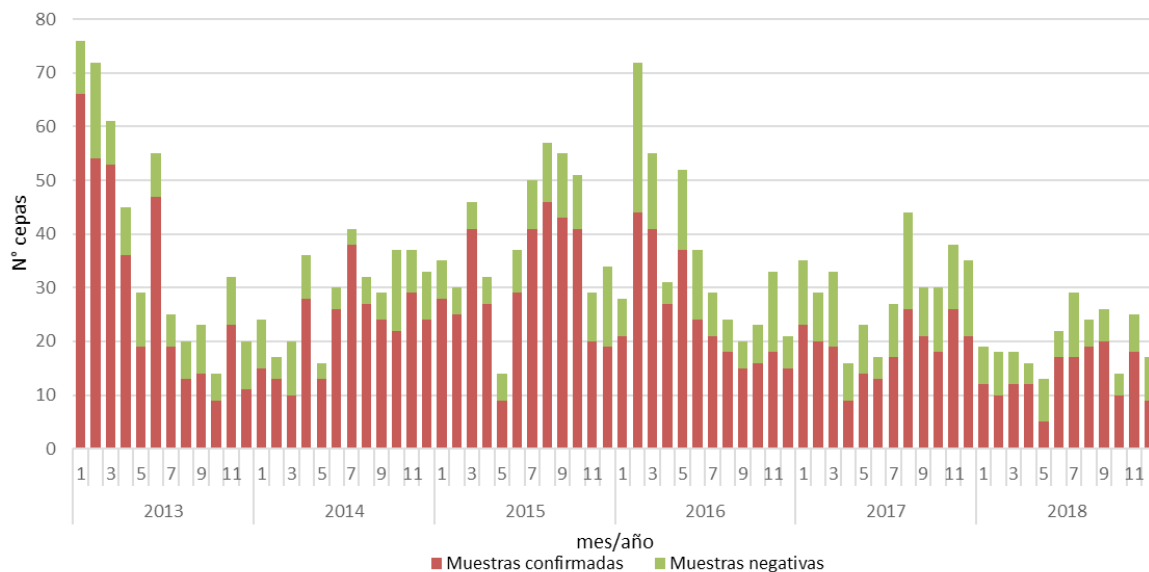
Figura 1: Muestras recibidas y confirmadas de *C. difficile*, según fecha de obtención. Chile 2013-2018.



Fuente: Laboratorio de Agentes Emergentes y Zoonóticos. Sección Bacteriología. Instituto de Salud Pública de Chile.

La Figura 2 indica las muestras recibidas de acuerdo a la fecha de obtención. Se observó un aumento de las muestras confirmadas entre las SE N° 1 a 3 del año 2013, SE N° 7 a 10 del año 2015 y SE N° 2 y 3 del año 2016.

Figura 2: Muestras recibidas y confirmadas de *C. difficile*, según mes de obtención. Chile 2013-2018.



Fuente: Laboratorio de Agentes Emergentes y Zoonóticos. Sección Bacteriología. Instituto de Salud Pública de Chile.

El 39,1% (907/2.317) de las muestras recibidas fueron derivadas desde establecimientos de la Región Metropolitana, el 64,4% (584/907) de ellos correspondientes al Servicio de Salud Metropolitano Sur y el 17,2% (156/907) al Metropolitano Central. Del total de muestras recibidas, el 98,2% (2.275/2.317) fueron derivadas desde establecimientos públicos, 1,7% (40/2.317) de establecimientos privados y 0,1% (2/2.317) de establecimientos públicos no pertenecientes al Sistema Nacional de Servicios de Salud (SNSS) (Tabla 1).

Tabla 1: Muestras recibidas y confirmadas de *C. difficile*, según región y servicio de salud de procedencia. Chile 2013-2018.

Región	Servicio de Salud	2013		2014		2015		2016		2017		2018		Total	
		R	C	R	C	R	C	R	C	R	C	R	C	R	C
Arica y Parinacota	Arica	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	3	0
Tarapacá	Iquique	0	0	8	3	17	10	20	12	23	16	26	12	94	53
Antofagasta	Antofagasta	21	18	39	29	8	7	0	0	0	0	0	0	68	54
Atacama	Atacama	0	0	0	0	0	0	1	1	2	0	0	0	21	3
	Privado	0	0	0	0	5	0	13	2	0	0	0	0		
Coquimbo	Coquimbo	50	48	6	5	1	1	2	2	2	0	0	0	62	57
	Privado	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0		
Valparaíso	Valparaíso San Antonio	10	5	3	3	5	4	6	3	8	5	8	7	264	207
	Viña del Mar-Quillota	27	20	43	34	72	60	46	36	16	14	16	14		
	Aconcagua	1	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0		
	Privado	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0		
Metropolitana	Metropolitano Central	19	18	2	1	31	27	33	31	34	25	37	29	907	703
	Metropolitano Occidente	31	25	1	0	5	2	4	0	3	0	0	0		
	Metropolitano Norte	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	Metropolitano Oriente	23	18	8	7	7	6	7	5	11	11	2	2		
	Metropolitano Sur	137	106	147	124	47	44	106	78	93	64	54	39		
	Metropolitano Surorientado	13	8	0	0	11	11	0	0	17	5	8	7		
	Metropolitano Oriente	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	Privado	1	1	11	7	2	2	0	0	0	0	0	0		
Otros*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0		
Libertador B. O'Higgins	O'Higgins	16	12	13	12	10	6	13	10	1	1	0	0	56	41
	Privado	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0		
Maule	Maule	71	42	44	28	174	146	120	91	109	68	82	48	602	424
	Privado	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0		
Biobío	Concepción	13	9	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	125	100
	Talcahuano	3	3	4	2	0	0	3	0	0	0	0	0		
	Arauco	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	Biobío	28	25	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	Ñuble	0	0	4	3	47	37	15	14	6	6	0	0		
Araucanía	Araucanía Norte	0	0	0	0	0	0	0	0	7	2	1	1	55	14
	Araucanía Sur	0	0	3	2	23	5	20	4	1	0	0	0		
Los Ríos	Los Ríos	0	0	12	6	3	0	0	0	0	0	2	0	17	6
Los Lagos	Reloncaví	0	0	0	0	0	0	7	7	13	5	3	2	23	14
Aysén	Aysén	7	5	1	0	1	1	0	0	9	4	0	0	18	10
Magallanes	Magallanes	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1
	Privado	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0		
Total		472	364	352	269	470	369	425	297	357	227	241	161	2.317	1.687

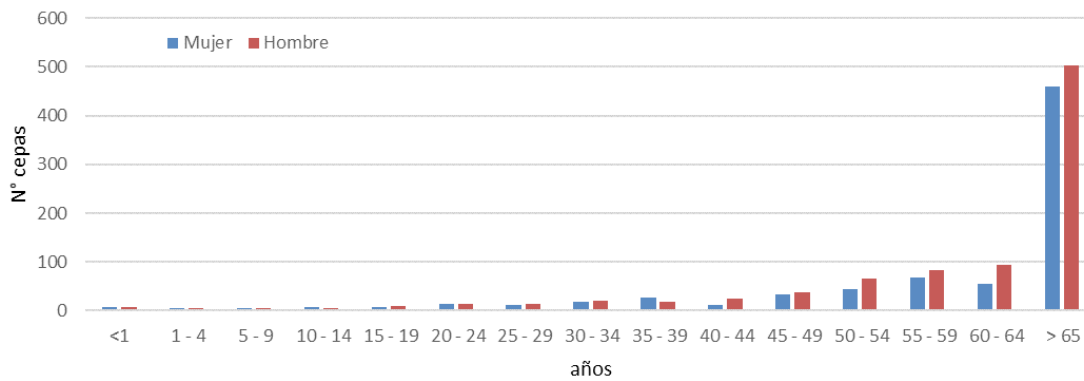
* Otros: Establecimientos públicos no pertenecientes al Sistema Nacional de Servicios de Salud

R: Muestras Recibidas C: Muestras Confirmadas

Fuente: Laboratorio de Agentes Emergentes y Zoonóticos. Sección Bacteriología. Instituto de Salud Pública de Chile

Del total de muestras confirmadas (1.687), el 46,1% (777/1.687) fueron aisladas desde mujeres y el 53,9% (910/1.687) desde hombres. Respecto a la edad, una muestra no contaba con este dato. De las muestras que disponían de información se observó que el 57,2% (964/1.686) procedían de personas de 65 y más años (Figura 3).

Figura 3: Muestras confirmadas de *C. difficile* según sexo y grupo etario. Chile 2013-2018.



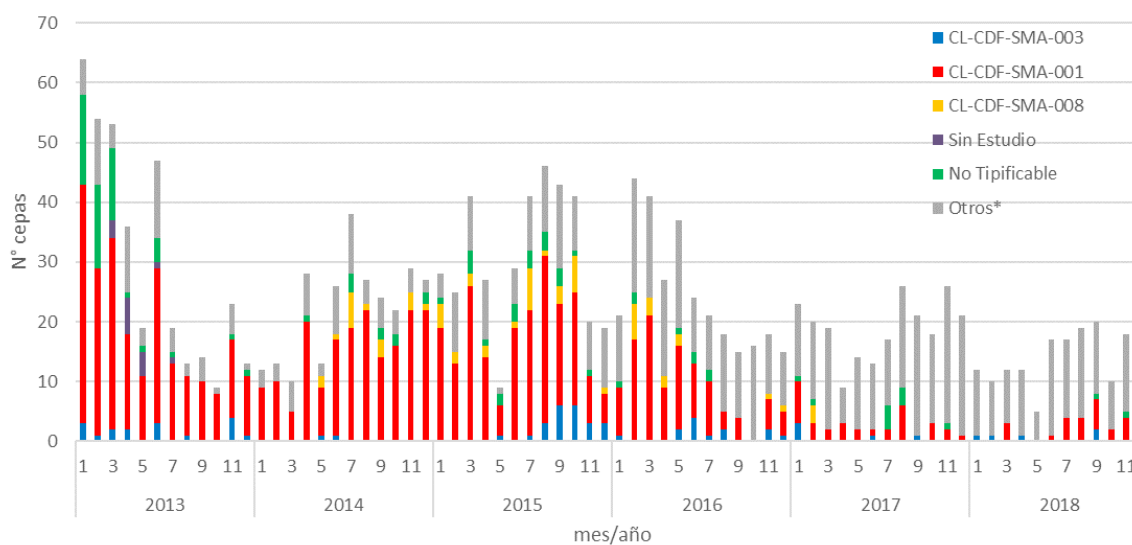
* Un caso sin dato de edad

Fuente: Laboratorio de Agentes Emergentes y Zoonóticos. Sección Bacteriología. Instituto de Salud Pública de Chile.

Se realizó la subtipificación genética por Electroforesis de Campo Pulsado (PFGE) al 99,1% (1.672/1.687) de las muestras confirmadas de *C. difficile*. Las cepas no aptas para estudio mediante PFGE (n=15) correspondieron al año 2013.

De las cepas estudiadas, el 6,1% (102/1.672) fueron no tipificables, mientras que el subtipo genético denominado localmente como CL-CDF-SMA-001 representó el 45,2% (756/1.672), el 3,9% (67/1.672) correspondió al subtipo CL-CDF-SMA-003, el 3,8% (64/1.672) al subtipo CL-CDF-SMA-008. El resto de los clones identificados representa el 40,9% (684/1.672) de las cepas estudiadas y agrupa 181 subtipos distintos con frecuencias de hasta 48 cepas en el periodo analizado (Figura 4).

Figura 4: Muestras confirmadas de *C. difficile*, según subtipo genético y mes de obtención Chile 2013-2018.

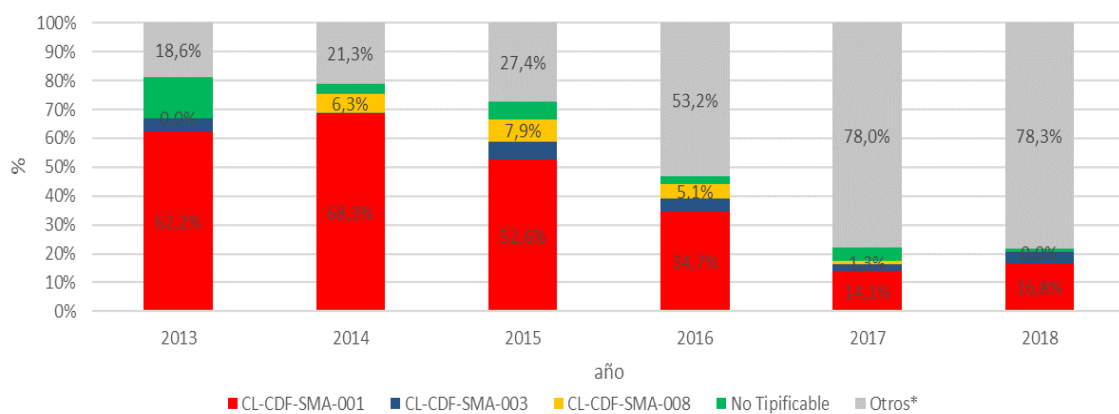


* Otros: agrupa 181 subtipos genéticos distintos, con frecuencias entre 1 y 48 cepas.

Fuente: Subdepartamento de Genética Molecular. Instituto de Salud Pública de Chile

Al analizar las cepas pertenecientes al subtipo CL-CDF-SMA-001, se observó que éste fue prevalente en los años 2013, 2014 y 2015, representando el 62,2% (217/349), 68,3% (183/268) y 52,6% (194/369), respectivamente. Tanto en el año 2013 como en el 2018, no se identificó el subtipo CL-CDF-SMA-008. En el resto de los años, este subtipo disminuyó su representación porcentual, predominando la categoría de "Otros", sin que algún subtipo sea prevalente (Figura 5).

Figura 5: Representación porcentual de los subtipos genéticos de cepas de *C. difficile*, según año de obtención. Chile 2013-2018



* Otros: agrupa 181 subtipos genéticos distintos, con frecuencias entre 1 y 48 cepas.
Fuente: Subdepartamento de Genética Molecular. Instituto de Salud Pública de Chile

Los resultados del estudio de secuenciación del gen *tcdC* (gen regulador de la producción de toxinas), indican que el 2,7% (45/1.687) de las cepas confirmadas fueron no tipificables. La delección de 18 nucleótidos y delección puntual en el nucleótido 117 fueron prevalentes y se identificaron en el 100% de las cepas correspondientes a los subtipos genéticos CL-CDF-SMA-001 y CL-CDF-SMA-008. Además, ambas delecciones fueron observadas en menor frecuencia, en otros subtipos genéticos (Tabla 2).

Tabla 2: Secuenciación del gen *tcdC* en cepas de *C. difficile* según subtipo genético y año. Chile, 2013-2018.

Subtipo Genético	D nt 117 - D 18 nt (340-357)	wild type	Otras	No tipificable	Total
CL-CDF-SMA-001	756	0	0	0	756
CL-CDF-SMA-003	0	67	0	0	67
CL-CDF-SMA-008	64	0	0	0	64
Otros	90	489	71	33	683
No tipificable	38	51	2	11	102
No aptas para estudio	6	8	0	1	15
Total	954	615	73	45	1687

Fuente: Subdepartamento de Genética Molecular. Instituto de Salud Pública de Chile.

El estudio de la presencia de las Toxinas A y B de las cepas con fecha de obtención 2014 al 2017, indica que ambas están presentes en las cepas correspondientes a los subtipogenéticos CL-CDF-SMA-001 y CL-CDF-SMA-008, ambas toxinas también fueron identificadas en menor frecuencia en otros subtipos genéticos. Del mismo modo, en las cepas del año 2018, se identificó la presencia del gen *tcdA* y *tcdB* en el subtipo genético CL-CDF-SMA-001.

Se realizó el estudio de susceptibilidad antimicrobiana de cepas correspondientes al año 2013 al 2017, observando 100% de sensibilidad a metronidazol. Se detectó una cepa con susceptibilidad reducida a vancomicina, según EUCAST, en los años 2013, 2016 y 2017 (Tabla 3).

Tabla 3 Susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *C. difficile*. Chile, 2013-2017.

Antimicrobiano		2013	2014	2015	2016	2017
Metronidazol	%S	100%	100%	100%	100%	100%
	n	361	102	34	294	127
Vancomicina	%S	99,7%	100,0%	100,0%	99,7%	99,2%
	%SR	0,3%	0,0%	0,0%	0,3%	0,8%
	n	360	102	34	294	127

%S: Porcentaje cepas sensibles

n: Número de cepas estudiadas

%SR: Porcentaje de cepas con susceptibilidad reducida

Fuente: Laboratorio de Agentes Emergentes y Zoonosis. Sección Bacteriología. Instituto de Salud Pública de Chile.

5. SÍNTESIS DE RESULTADOS:

Entre enero de 2013 y diciembre de 2018 se confirmaron 1.687 cepas de *C. difficile*, lo que representa el 72,8% de las cepas recibidas en el periodo, observando un aumento de las muestras confirmadas entre las SE N° 1 a 3 del año 2013, SE N°7 a 10 del año 2015 y SE N°2 y 3 del año 2016.

El 98,2% de las cepas recibidas fueron derivadas desde establecimientos públicos, 1,7% de establecimientos privados y 0,1% de establecimientos públicos no pertenecientes al Sistema Nacional de Servicios de Salud (SNSS). El 39,1% (907/2.317) de las muestras recibidas fueron derivadas desde establecimientos de la Región Metropolitana.

El 46,1% de las cepas confirmadas fueron aisladas desde muestras correspondientes a mujeres y el 53,9% de hombres. El 57,2% de las cepas confirmadas procedían de personas de 65 y más años.

El subtipo genético denominado localmente como CL-CDF-SMA-001 fue prevalente en los años 2013 al 2015 (fenómeno expansivo), disminuyendo en los años posteriores, en los que no se observó prevalencia de un subtipo genético específico.

Los resultados del estudio de secuenciación del gen *tcdC* (gen regulador de la producción de toxinas) indican que las cepas correspondientes a los subtipos genéticos CL-CDF-SMA-001 y CL-CDF-SMA-008 presentaron la delección de 18 nucleótidos y delección en el nucleótido 117. Ambas delecciones fueron observadas en menor frecuencia, en otros subtipos genéticos.

Asimismo, se observó que las cepas de los subtipos genéticos CL-CDF-SMA-001 y CL-CDF-SMA-008 presentaron los genes *tcdA* y *tcdB* y expresaron las toxinas A y B.

La susceptibilidad antimicrobiana ha permanecido estable, se observó 100% de sensibilidad a metronidazol. Se detectó una cepa con susceptibilidad reducida a vancomicina, según EUCAST, en los años 2013, 2016 y 2017.

6. REFERENCIAS:

1. Lawson PA, Citron DM, Tyrrell KL, Finegold SM. Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O'Toole 1935) Prévot 1938. *Anaerobe*. agosto de 2016;40:95-9.
2. Sartelli M, Di Bella S, McFarland LV, Khanna S, Furuya-Kanamori L, Abuzeid N, et al. 2019 update of the WSES guidelines for management of Clostridioides (*Clostridium*) difficile infection in surgical patients. *World Journal of Emergency Surgery*. 28 de febrero de 2019;14(1):8.
3. Gerding D. JS. Infección por *Clostridium difficile*, incluida colitis pseudomembranosa | Harrison. Principios de Medicina Interna, 20e | AccessMedicina | McGraw-Hill Medical [Internet]. Harrison. Principios de Medicina Interna, 20e. 2018 [citado 28 de junio de 2019]. Disponible en: <https://accessmedicina-mhmedical-com.uchile.idm.oclc.org/content.aspx?bookid=2461§ionid=208145280#1161981434>
4. Ryan K. RG. *Clostridium*, *Peptostreptococcus*, *Bacteroides* y otros anaerobios | Sherris. Microbiología médica, 6e | AccessMedicina | McGraw-Hill Medical [Internet]. Sherris, Microbiología Médica, 6e. 2017 [citado 28 de junio de 2019]. Disponible en: <https://accessmedicina-mhmedical-com.uchile.idm.oclc.org/content.aspx?bookid=2169§ionid=162983392#1143535859>
5. Rodríguez P, Cofré J. Diarrea asociada a *Clostridium difficile* en niños. *Rev chil infectol*. octubre de 2015;32(5):550-8.
6. Lessa FC, Mu Y, Bamberg WM, Beldavs ZG, Dumyati GK, Dunn JR, et al. Burden of *Clostridium difficile* Infection in the United States [Internet]. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1408913>. 2015 [citado 5 de marzo de 2019]. Disponible en: https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1408913?url_ver=Z39.88-2003&rft_id=ori%3Arid%3Aacrossref.org&rft_dat=cr_pub%3Dwww.ncbi.nlm.nih.gov
7. Arias ME, Tzoc ER, Hidalgo F. Enfermedad asociada a *Clostridium difficile* (EACD) en el Hospital Escuela Universitario y el IHSS. Enero a mayo 2016. 1. 26 de agosto de 2018;74-88.
8. Zhao S, Ghose-Paul C, Zhang K, Tzipori S, Sun X. Immune-based treatment and prevention of *Clostridium difficile* infection. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2 de diciembre de 2014;10(12):3522-30.
9. *Clostridium difficile* in the Hospital: Infection Prevention Considerations [Internet]. *Infectious Disease Advisor*. 2017 [citado 4 de marzo de 2019]. Disponible en: <https://www.infectiousdiseaseadvisor.com/home/decision-support-in-medicine/hospital-infection-control/clostridium-difficile-in-the-hospital-infection-prevention-considerations/>
10. Zhao S, Ghose-Paul C, Zhang K, Tzipori S, Sun X. Immune-based treatment and prevention of infection. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 10 de febrero de 2015;10(12):3522-30.
11. Xia Y, Tunis MC, Frenette C. Epidemiology of *Clostridioides difficile* infection in Canada: A six-year review to support vaccine decision-making [Internet]. Government of Canada; 2019. Disponible en: <https://www.canada.ca/en/public-health/services/reports-publications/canada-communicable-disease-report-ccdr/monthly-issue/2019-45/issue-7-8-july-4-2019/article-4-clostridioide-difficile-epidemiology-vaccine-burden-of-illness.html>
12. Persson S, Jensen JN, Olsen KEP. Multiplex PCR Method for Detection of *Clostridium difficile* *tcdA*, *tcdB*, *cdtA*, and *cdtB* and Internal In-Frame Deletion of *tcdC*. *Journal of Clinical Microbiology*. 1 de diciembre de 2011;49(12):4299-300.

13. cdiffoundation. Ribotypes and Prevalence of *Clostridium difficile* (C. diff) Hypervirulent Strain: NAP1/B1/027 [Internet]. C Diff Foundation. 2019 [citado 5 de marzo de 2019]. Disponible en: <https://cdiffoundation.org/2019/02/11/ribotypes-and-prevalence-of-clostridium-difficile-c-diff-hypervirulent-strain-nap1-b1-027/>
14. cdiffoundation. Ribotypes and Prevalence of *Clostridium difficile* (C. diff) Hypervirulent Strain: NAP1/B1/027 [Internet]. C Diff Foundation. 2019 [citado 5 de marzo de 2019]. Disponible en: <https://cdiffoundation.org/2019/02/11/ribotypes-and-prevalence-of-clostridium-difficile-c-diff-hypervirulent-strain-nap1-b1-027/>
15. Cureus | The Hypervirulent Strain of *Clostridium difficile*: NAP1/B1/027 - A Brief Overview [Internet]. [citado 19 de marzo de 2019]. Disponible en: <https://www.cureus.com/articles/17022-the-hypervirulent-strain-of-clostridium-difficile-nap1b1027---a-brief-overview#references>
16. Instituto de Salud Pública de Chile [Internet]. [citado 4 de julio de 2019]. Disponible en: <http://www.ispch.cl/boletines?title=clostridium>