

## Etiología anaerobia de la diarrea nosocomial asociada a antibióticos en adultos mayores

Evelyn Rodríguez-Cavallini<sup>1</sup>, María del Mar Gamboa-Coronado<sup>1</sup>, Zianne Camacho-Mora<sup>2</sup>, Marco Luis Herrera<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Investigación en Bacteriología Anaerobia y Centro de Enfermedades Tropicales, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica. <sup>2</sup>Caja Costarricense del Seguro Social, San José, Costa Rica

### RESUMEN

**Introducción.** *C. difficile* y *C. perfringens* son importantes agentes causales de diarrea asociada a antibióticos en adultos y niños en el mundo, incluyendo Costa Rica. Con este estudio, pretendemos ampliar las investigaciones en pacientes hospitalizados mayores de 60 años, quienes tienen más factores de riesgo y presentan cuadros de mayor severidad.

**Materiales y Métodos.** La presencia de *C. difficile* y de *C. perfringens* y sus enterotoxinas se determinó en 51 muestras de heces diarreicas durante 18 meses. Todos los aislamientos fueron estudiados por producción de toxinas y sensibilidad a los antibióticos.

**Resultados.** Se detectó la toxina A de *C. difficile* en 12 muestras (24%) y la enterotoxina de *C. perfringens* en 10 (20%). Se aisló *C. difficile* a partir de seis muestras (12%) y *C. perfringens* de 16 (31%). Todos los aislamientos de *C. difficile* fueron toxigénicos, pero sólo dos de *C. perfringens* lo fueron; en dos de las muestras se aislaron ambos agentes. Todas las cepas de *C. difficile* fueron sensibles a beta lactámicos, cloranfenicol y metronidazol, y la mayoría resistentes contra clindamicina. Un alto porcentaje de *C. perfringens* mostró resistencia contra beta lactámicos, cloranfenicol y metronidazol y, al igual que *C. difficile*, también contra clindamicina.

**Conclusiones.** De acuerdo con la detección de toxinas en heces, *C. difficile* y *C. perfringens* fueron los agentes etiológicos de 44% de los casos; lo que refuerza la necesidad de considerarlos en el diagnóstico de diarreas de adultos mayores hospitalizados. Es de interés resaltar la resistencia contra clindamicina en los aislamientos, puesto que se ha implicado como un factor de riesgo para el desarrollo de la diarrea. Además, el uso de metronidazol para el tratamiento de estas diarreas puede no ser adecuado si el agente es *C. perfringens*, pues el 25% fue resistente contra esta droga.

**Palabras clave:** diarrea nosocomial, antibióticos, *C. perfringens*, *C. difficile*, *B. fragilis*, enterotoxina, adultos mayores

### ABSTRACT

**Anaerobic etiology of nosocomial antibiotic associated diarrhea in elderly patients.**

**Introduction.** *C. difficile* and *C. perfringens* are important etiological agents of antibiotic associated diarrhea in adults and children worldwide, including Costa Rica. We intend to expand on previous research by including hospitalized patients over 60 years, to evaluate their additional factors and more severe illnesses.

**Materials and Methods.** Over an 18 month period 51 samples of diarrheic feces were screened

**Solicitud de sobretiros:** Evelyn Rodríguez-Cavallini, Laboratorio de Investigación en Bacteriología Anaerobia y Centro de Enfermedades Tropicales, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, Costa Rica, América Central. E-mail: evelyn.rodriguez@ucr.ac.cr

**Recibido:** el 11 de febrero de 2010. **Aceptado para publicación:** el 25 de marzo de 2010

Este artículo está disponible en <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb102113.pdf>

and cultured for *C. difficile* and *C. perfringens* enterotoxins. Every isolate was evaluated for toxin production and antibiotic susceptibility.

**Results.** *C. difficile* toxin A was detected in 12 samples (24%) and *C. perfringens* enterotoxin in 10 (20%). *C. difficile* was isolated from 6 samples (12%) and *C. perfringens* from 16 (31%). All *C. difficile* isolates and only two *C. perfringens* were toxigenic, but both agents were isolated from two samples. Every *C. difficile* isolate was sensitive to beta-lactam, chloramphenicol and metronidazole, but most were resistant to clindamycin. A high percentage of *C. perfringens* strains showed resistance to beta lactam antibiotics, chloramphenicol and metronidazole and like *C. difficile*, also clindamycin.

**Conclusions.** According to toxin detection in feces, *C. difficile* and *C. perfringens* were the etiological agents in 44% of the diarrhea cases, reinforcing the need to consider both agents for diagnosis of diarrhea in hospitalized elderly patients. Clindamycin resistance shown by many isolates should be noted, since it has been implicated as a risk factor for the development of diarrhea. Metronidazole may not be the best choice, since 25% of *C. perfringens* strains were also resistant to this drug.

**Key words:** nosocomial diarrhea, antibiotics, *C. perfringens*, *C. difficile*, *B. fragilis*, enterotoxin, elderly

## INTRODUCCIÓN

La aparición de diarreas nosocomiales, contraídas por los pacientes que reciben antibióticos, constituye un problema de salud a nivel mundial al ser causa importante de morbilidad y mortalidad (1). Se producen por distorsión de la flora intestinal normal al ingerir esos medicamentos, lo que favorece el establecimiento de patógenos o la proliferación de microorganismos ya existentes y, con ello, el desarrollo del cuadro diarreico conocido como diarrea asociada a los antibióticos (DAA) (2-4). Concomitantemente con la terapia

antimicrobiana, la edad avanzada de los pacientes (mayores de 60 años), cirugías intestinales, enemas, insuficiencia renal crónica, exposición a agentes antineoplásicos, antiácidos, procedimientos invasivos o el estado de inmunosupresión y la estancia hospitalaria prolongada son factores predisponentes (3,5,6).

Varios agentes anaerobios son considerados agentes etiológicos de DAA, destacándose como el más frecuente *Clostridium difficile*, que se ha relacionado con cuadros leves hasta muy severos, con colitis pseudomembranosa o megacolon tóxico (3,7). Esta bacteria es anaerobia, Gram positiva, esporulada, capaz de producir dos toxinas, denominadas A y B, y, en algunos casos, una toxina binaria (2), relacionadas con la producción de la diarrea. Aunque mucho menos estudiado, también *C. perfringens* ha sido implicado en esta patología (8); pero, a diferencia de *C. difficile*, los cuadros diarreicos que produce son menos severos, autolimitados en la mayoría de los casos y sin formación de pseudomembranas (9). Es también una bacteria anaerobia, Gram positiva y esporulada, que puede producir una enterotoxina durante el proceso de esporulación (10). Más recientemente, se informó que algunas cepas enterotoxigénicas de *Bacteroides fragilis*, bacteria anaerobia, Gram negativa, también son causantes de diarreas, aunque en porcentajes mucho menores que los referidos para los dos agentes anteriores (11).

Estudios previos realizados en Costa Rica, a partir de muestras diarreicas provenientes de adultos y niños, demostraron que *C. difficile* fue el agente etiológico de DAA en 30% de las muestras de adultos (12) y en 15% de las muestras de niños (13), en tanto que *C. perfringens* lo fue en 3% de las muestras de adultos (14) y en 7% de las de niños (13). No se han realizados estudios locales respecto a *B. fragilis*.

Pretendemos, con este estudio, ampliar las investigaciones en pacientes mayores de 60 años, población que tiene más factores de riesgo para desarrollar DAA y cuyos casos pueden llegar a ser de mayor severidad (15). Con ello,

## Anaerobios y diarrea nosocomial en adultos mayores

esperamos contribuir al conocimiento, diagnóstico y tratamiento de las diarreas nosocomiales en una población altamente susceptible a las diarreas. Dado que el diagnóstico de cuadros clínicos que involucran bacterias anaerobias no es usual en nuestro medio, los datos tendrán una especial relevancia para el manejo terapéutico de estos pacientes.

### MATERIALES Y MÉTODOS

Se investigaron 51 muestras de heces diarreicas obtenidas durante un período de 18 meses, provenientes de pacientes mayores de 60 años internados en un hospital nacional geriátrico de Costa Rica. Las muestras fueron consideradas por el centro hospitalario como nosocomiales y asociadas a antibióticos si provenían de pacientes con terapia antimicrobiana, que presentaron el cuadro diarreico, al menos, 72 horas después del internamiento. El 18% de los pacientes ya no estaba recibiendo terapia antimicrobiana al momento de la toma de muestra; el resto recibía uno o una combinación de los siguientes antibióticos: metronidazol (31%), quinolonas (25%), cefalosporinas (24%), amikacina (12%), clindamicina (8%), imipenem, trimetoprim-sulfa y vancomicina (6% c/u), gentamicina, claritromicina, penicilina y nitrofurantoína (4% c/u). El análisis de los expedientes no permitió detectar ningún patrón de prescripción en los pacientes estudiados.

Tan pronto como fue posible y antes de una hora, cada muestra se congeló a  $-80^{\circ}\text{C}$  y se mantuvo así hasta su envío, en hielo seco, al Laboratorio de Investigación en Bacteriología Anaerobia (LIBA) en la Universidad de Costa Rica; sólo se descongelaron antes de su uso.

Se determinó la presencia de toxinas directamente en las heces: toxina A de *C. difficile* mediante la utilización de la prueba de inmunocromatografía para toxina A (Oxoid®) y enterotoxina de *C. perfringens* mediante la prueba de aglutinación reversa pasiva con látex (Oxoid®), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Para el aislamiento de *C. difficile*, se mezcló 0.5 g de heces con 0.5 mL de alcohol absoluto, se homogeneizó y se dejó a temperatura ambiente por una hora. Transcurrido el tiempo, se inoculó una asada de la mezcla en agar fructosa cicloserina-cefoxitina (CCFA), que se incubó a  $35^{\circ}\text{C}$  por 72 horas en jarra de anaerobiosis. Simultáneamente, se realizó un enriquecimiento de 0.5 g de muestra en caldo infusión cerebro y corazón, prerreducido (CICC-PRAS), con cicloserina (250 mg/mL) y cefoxitina (8 mg/mL), incubado en anaerobiosis por 72 horas (12,13); éste se utilizó sólo si la muestra tratada con alcohol no mostró crecimiento, para lo cual se inoculó un nuevo plato de CCFA como se describió antes. Las colonias de bacilos Gram positivos, rizoides, irregulares, con aspecto de vidrio molido y gris opacas, se crecieron en agar sangre suplementado con vitamina K y hemina (ASS) para verificar la pureza y la presencia de fluorescencia amarillo verdosa y así identificarlas presuntivamente como *C. difficile* (16). La identificación definitiva se realizó con el sistema miniaturizado rapid ID32A (bioMérieux®), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Para el aislamiento de *C. perfringens*, se inoculó 1 g de heces en un tubo con 5 mL de CICC-PRAS, que se incubó a  $44^{\circ}\text{C}$  por 24 h. Los tubos con turbiedad y gas se inocularon en placas de agar oleandomicina polimixina sulfadiazina perfringens (OPSP), con sobrecapa de agar, y se incubaron a  $44^{\circ}\text{C}$  por 24 horas en jarras de anaerobiosis. Las colonias negras, características de *C. perfringens*, así como aquellas blancas con centro negro, se inocularon en CICC-PRAS y fueron incubados a  $44^{\circ}\text{C}$  hasta por 4 horas, para determinar la producción de gas. Los aislamientos que correspondieron a bacilos Gram positivos, no móviles, productores de gas en menos de 4 horas, se identificaron presuntivamente como *C. perfringens* (14,16). La identificación definitiva se realizó mediante la determinación de doble hemólisis en ASS, producción de lecitinasa en agar yema de huevo, producción de gelatinasa, indol y fermentación de lactosa y salicina (16).

Para el aislamiento de *Bacteroides fragilis*, se inoculó una asada de las heces en placas de agar *Bacteroides bilis esculina* (BBE) y en agar sangre lisada kanamicina vancomicina (LKV), que se incubaron a 37°C por 48 horas en jarras de anaerobiosis. Las colonias circulares, convexas, de borde entero y de más de 1 mm, de color café oscuro en BBE o amarillentas en LKV, características del grupo *B. fragilis* (16), fueron analizadas por tinción de Gram e identificadas con el sistema rapid ID32A (bioMérieux®), como se indicó antes.

A todos los aislamientos identificados como *C. difficile* o *C. perfringens* se les realizó la determinación de toxina, como se describió antes, y un antibiograma, utilizando el sistema miniaturizado ATB ANA (bioMérieux®).

En todas las determinaciones, se utilizaron como controles las cepas *C. difficile* ATCC 700057, *C. perfringens* ATCC 13124 y LIBA-89 y *B. fragilis* ATCC 25285. Se solicitó y se obtuvo la aprobación del Comité de Ética institucional para la realización del estudio.

## RESULTADOS

Se detectó la toxina A de *C. difficile* en 12 de las 51 muestras analizadas (24%) y la enterotoxina de *C. perfringens* en 10 (20%). Se aisló *C. difficile* a partir de seis muestras (12%) y *C. perfringens* de 16 (31%). Todos los aislamientos de *C. difficile* fueron productores de toxina A y sólo dos cepas de *C. perfringens* produjeron enterotoxina. En dos de las muestras se aislaron ambos agentes. En ninguna de las muestras se aisló *B. fragilis*.

Todas las cepas de *C. difficile* (n=6) fueron sensibles a penicilina, amoxicilina con y sin clavulanato, piperacilina con y sin tazobactán, ticarcilina con y sin clavulanato, cefotetán, imipenem, cloranfenicol y metronidazol. Únicamente se encontró resistencia contra la cefoxitina y contra la clindamicina (6 y 4 aislamientos resistentes, respectivamente). Las cepas de *C. perfringens* mostraron mayor resistencia contra algunos antibióticos, como los beta lactámicos, el

cloranfenicol y el metronidazol; incluso, tres de los cuatro aislamientos resistentes contra metronidazol provenían de pacientes tratados con esta droga. Al igual que *C. difficile*, un porcentaje considerable de los aislamientos de *C. perfringens* fue resistente contra clindamicina (**Cuadro 1**).

## DISCUSIÓN

La DAA se ha convertido en un problema de salud de creciente severidad, especialmente en pacientes mayores de 60 años, quienes usualmente tienen otros factores predisponentes que aumentan su estancia hospitalaria y favorecen la severidad del cuadro (3,5,15). Aunque el papel de *C. difficile*, *C. perfringens* y *B. fragilis* como agentes etiológicos de esta patología es bien conocido, a menudo el diagnóstico de laboratorio sólo incluye a *C. difficile*.

La presencia de las toxinas de *C. difficile* y *C. perfringens* en heces fue el criterio para considerar que la DAA fuera causada por estos agentes. Así, *C. difficile* fue responsable de 24% de los casos y *C. perfringens* de, al menos, un 20%. Esto se debe a que el aislamiento de *C. difficile* es difícil de lograr en todos los casos y hay aislamientos de *C. perfringens* que pueden ser parte de la flora normal. Así, se aislaron sólo 6 cepas de *C. difficile* y hubo 12 muestras toxigénicas; por otro lado, se aislaron 16 cepas de *C. perfringens* de las cuales sólo dos fueron enterotoxigénicas, mientras que la enterotoxina se detectó en 10 muestras de heces.

La baja detección de la enterotoxina en los aislamientos también podría explicarse debido a las dificultades técnicas para determinarla. Es sabido que, aproximadamente, la mitad de las muestras que contienen cepas *cpe*-positivas también contienen *cpe*-negativas (17); de tal forma que pudieron haberse aislado estas últimas, ya que son más fáciles de recuperar (10,14). Además, la enterotoxina se produce durante la esporulación y *C. perfringens* no esporula fácilmente (6).

El hallazgo de un 24% de muestras positivas para toxina A de *C. difficile* está acorde con varios estudios, que lo señalan como agente etiológico de

## Anaerobios y diarrea nosocomial en adultos mayores

**Cuadro 1**  
**Patrón de susceptibilidad antimicrobiana de *C. perfringens* provenientes de muestras de pacientes con DAA (n=16)**

| Antimicrobiano            | CMI (R)*<br>(mg/L) | Resistente (%) | Intermedio (%) | Sensible (%) |
|---------------------------|--------------------|----------------|----------------|--------------|
| penicilina                | 2                  | 13             | 13             | 74           |
| amoxicilina               | 16                 | 6              | 6              | 88           |
| amoxicilina + clavulanato | 8/4                | 0              | 6              | 94           |
| piperacilina              | 64                 | 6              | 0              | 94           |
| piperacilina + tazobactam | 64/2               | 0              | 0              | 100          |
| ticarcilina               | 64                 | 6              | 0              | 94           |
| ticarcilina + clavulanato | 64/2               | 0              | 0              | 100          |
| cefoxitina                | 32                 | 25             | 0              | 75           |
| cefotetán                 | 32                 | 25             | 0              | 75           |
| imipenem                  | 8                  | 0              | 0              | 100          |
| clindamicina              | 4                  | 25             | 13             | 62           |
| cloranfenicol             | 16                 | 6              | 6              | 88           |
| metronidazol              | 16                 | 25             | 0              | 75           |

\* : Concentración Mínima Inhibitoria utilizada como punto de corte de resistencia

13% a 38% de los casos de DAA (6,18,19). Como se mencionó antes, en Costa Rica este agente ha sido reportado en 30% de los casos de DAA en pacientes adultos (12) y en 15% de las muestras de niños (13).

Ese valor de 24% es mayor que el 5.5% informado por Cánovas Domínguez (20) en pacientes mayores de 80 años con DAA, pero está acorde con quienes señalan a *C. difficile* como la causa más importante de diarrea infecciosa en ancianos (15). La prevalencia de enterotoxina de *C. perfringens* en pacientes con DAA ha sido menor (entre 2 y 16%) que la de *C. difficile*, según varios estudios (17), incluyendo las investigaciones en Costa Rica: 7.7% en niños y 3% en adultos (13,14). Sin embargo, es importante mencionar que con métodos moleculares más sensibles, se han descrito porcentajes hasta de 41% (10). Los hallazgos de esta investigación (20% de muestras positivas para enterotoxina de *C. perfringens*) indican que ese porcentaje podría ser más alto en la población de adultos mayores costarricenses

que en poblaciones de niños, adultos, o adultos mayores de otras latitudes (10%) (21).

Considerando ambos agentes, en este estudio se pudo demostrar la etiología de la DAA en 44% de los casos. Estos hallazgos refuerzan la idea de considerar ambos agentes como posibles causas de DAA, en estancias hospitalarias prolongadas y, especialmente, en pacientes de edad avanzada (6,17). Algunos estudios han demostrado frecuencias similares en la detección de enterotoxinas de *C. difficile* y *C. perfringens* en heces (8,10), poniendo en evidencia la importancia de incluir ambos agentes en la metodología diagnóstica de la DAA. En dos de las 51 muestras (4%), se logró el aislamiento de ambos agentes, como también ha sido descrito por otros investigadores (6,10,13,17).

Aunque en ninguna de las muestras se aisló *B. fragilis*, sí se aislaron otras especies del grupo, así como la cepa control inoculada en muestras simuladas. Una posible causa es que las muestras hayan tenido sobreexposición al oxígeno, durante

el tiempo de permanencia de las muestras desde que fueron tomadas hasta su congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Otra posibilidad es que el método de cultivo empleado no haya sido suficientemente sensible para su detección. Al respecto, se ha informado que la detección de *B. fragilis* enterotoxigénico (ETBF) en heces es dependiente no sólo de la sensibilidad del ensayo, sino de la cantidad y la estabilidad de la toxina, la cual es susceptible a la degradación por proteasas (22). Así, varios estudios demuestran porcentajes muy variables respecto a su presencia en muestras diarreicas en diferentes grupos de edad: 23% en pacientes en general (23), 8.4% en niños menores de dos años y 11.1% en niños menores de un año (24), 2% en niños de 0 a 12 años (25), 25% en niños menores de 5 años, 3.5% en niños de 6 a 16 años y 9% en pacientes mayores de 60 años (26).

La sensibilidad a los antimicrobianos de los aislamientos de *C. difficile* fue mayor que la de *C. perfringens*, pues sólo hubo resistencia contra dos de los antibióticos probados, uno de los cuales (cefotaxima) era de esperar, puesto que se usa como agente selectivo en su aislamiento. El otro antibiótico (clindamicina) es de amplio uso en nuestro medio, lo que favorece, no sólo el hallazgo de resistencia como ya ha sido reportado (13,27), sino la aparición de casos de DAA por *C. difficile*, al ser considerado un factor de riesgo (6).

Aunque la resistencia contra antibióticos de *C. perfringens* no es usual (14,28), ya ha sido reportada en varias investigaciones (29), incluyendo aislamientos costarricenses provenientes de niños (13). Es de interés resaltar no sólo la resistencia contra clindamicina, que también se observó en *C. difficile*, sino también la resistencia contra metronidazol (25%), puesto que es la droga de elección en el tratamiento de la DAA por *C. difficile* (30). Al respecto, es importante destacar que tres de los cuatro aislamientos resistentes contra metronidazol provenían de pacientes que recibían esta droga, lo que podría inducir a fracasos terapéuticos. También, cabe subrayar que Pituch y colaboradores (10) ya habían informado

sensibilidades disminuidas al metronidazol en aislamientos de *C. perfringens*. Dado que esta bacteria es habitante normal de la microbiota humana, es de esperar que se haya favorecido la selección de cepas resistentes en pacientes de edad avanzada, que probablemente han recibido terapia antimicrobiana en múltiples condiciones.

Es bien reconocido el hecho de que el desarrollo de DAA puede ser reducido sustituyendo la administración de drogas de amplio espectro, como cefalosporinas, quinolonas y clindamicina (5) por otras. El conocimiento de la sensibilidad a los antimicrobianos de bacterias involucradas en estos cuadros contribuye a un uso más racional de los antibióticos y alerta en cuanto al empleo de metronidazol en aquellos casos en que la DAA sea debida a *C. perfringens* y no a *C. difficile*.

El hallazgo de aislamientos de *C. difficile* más virulentos en algunos países, incluido Costa Rica (2,31), conocidos como variantes NAP 1 o ribotipos 027, hace cada vez más necesario un manejo agresivo y oportuno de los casos de DAA, especialmente en una población tan vulnerable como los ancianos.

#### AGRADECIMIENTOS

Al señor Pablo Vargas, por su asistencia técnica, y a la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica, por el soporte económico.

**CONFLICTO DE INTERESES:** no existe.

#### REFERENCIAS

1. Zheng L, Keller SF, Lyerly DM, Carman RJ, Genheimer CW, Gleaves CA, *et al.* Multicenter evaluation of a new screening test that detects *Clostridium difficile* in fecal specimens. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 3837-3840.
2. Razavi B, Apisarnthanarak A, Mundy LM. *Clostridium difficile*: Emergence of Hypervirulence and Fluoroquinolone Resistance. *Infection* 2007; 35:300-3007.
3. Pareja Sierra P, Hornillos Calvo M. Factores epidemiológicos, clínicos y analíticos asociados a diarrea por *Clostridium difficile* en población anciana hospitalizada. Estudio de casos y controles. *Rev Esp Geriatr Gerontol* 2007; 42:257-262.
4. Muñoz C. Diarrea Asociada a Antibióticos. *Gastr Latinoam* 2007; 18:188-192.

## Anaerobios y diarrea nosocomial en adultos mayores

5. **Garey KW, Dao-Tran TK, Jiang ZD, Price MP, Gentry LO, DuPont HL.** A clinical risk index for *Clostridium difficile* infection in hospitalized patients receiving broad spectrum antibiotics. *J Hops Infec* 2008; 70:142-147.
6. **Asha NJ, Tompkins D, Wilcox MH.** Comparative Analysis of Prevalence, Risk Factors, and Molecular Epidemiology of Antibiotic-Associated Diarrhea Due to *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, and *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 2785-2791.
7. **Verdoorn BP, Orenstein R, Rosenblatt JE, Sloan LM, Schleck CD, Harmsen WS, et al.** High prevalence of *tcdC* deletion-carrying *Clostridium difficile* and lack of association with disease severity. *Diag Microbiol Infect Dis* 2010; 66:24-28.
8. **Abrahao C, Carman R, Han H, Liesenfeld O.** Similar Frequency of detection of *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* toxins in Patients with Antibiotic-Associated Diarrhea. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001; 20:676-677.
9. **Modi N, Wilcox MH.** Evidence for antibiotic induced *Clostridium perfringens* diarrhea. *J Clin Pathol* 2001; 54:748-751
10. **Pituch H, Obuch-Woszczatyński P, Wultańska D, van Belkum A, Meisel-Mikołajczk F, Luczak M.** Laboratory diagnosis of antibiotic-associated diarrhea: a Polish pilot study into the clinical relevance of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* toxins. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 58:71-75.
11. **Cohen SH, Shetab R, Tang-Feldman YJ, Sarma P, Silva JJr, Prindiville TP.** Prevalence of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in hospital-acquired diarrhea. *Diag Microbiol Infect Dis* 2006; 55:251-254.
12. **Zumbado-Salas R, Gamboa-Coronado MM, Rodríguez-Cavallini E, Chaves-Olarte E.** Short Report: *Clostridium difficile* en adult patients with nosocomial diarrhea in a Costa Rican hospital. *Am J Trop Med Hyg* 2008; 79: 164-165.
13. **Ruiz-Corella M, Altamirano-Silva P, Rodríguez-Cavallini E, Gamboa-Coronado MM.** *Clostridium perfringens* y *Clostridium difficile* como agentes etiológicos de diarrea nosocomial asociada a antibióticos en niños costarricenses. *Rev Biomed* 2007; 18:81-87.
14. **Camacho N, Espinoza C, Rodríguez C, Rodríguez E.** Isolates of *Clostridium perfringens* recovered from Costa Rican patients with antibiotic-associated diarrhoea are mostly enterotoxin-negative and susceptible to the first-choice antimicrobials. *J Med Microbiol* 2008; 57: 343-347
15. **Pareja Sierra P, Hornillos Calvo M.** Diarrea asociada a *Clostridium difficile* en el paciente anciano. *Rev Clin Esp* 2007; 207: 86-90.
16. **Jousimies-Somer HR, Summanen P, Citron DM, Baron EL, Wexler HM, Finegold S.** *Anaerobic Bacteriology Manual*. 6th ed. Star Publishing Company. California; 2002.
17. **Asha NJ, Wilcox MH.** Laboratory diagnosis of *Clostridium perfringens* antibiotic-associated diarrhea. *J Med Microbiol* 2002; 51: 891-894.
18. **Durai R.** Epidemiology, Pathogenesis, and Management of *Clostridium difficile* Infection. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 2958-2962.
19. **Legaria MC, Lumelsky G, Rosetti S.** *Clostridium difficile*-associated diarrhea from a general hospital in Argentina. *Anaerobe* 2003; 9:113-116.
20. **Cánovas Domínguez C.** Diarrea nosocomial por *Clostridium difficile* en mayores de 80 años. *Rev Esp Geriatr Gerontol* 2005; 40:70-77.
21. **Brett MM, Rodhouse JC, Donovan TJ, Tebbutt GM, Hutchinson DN.** Detection of *Clostridium perfringens* and its enterotoxin in cases of sporadic diarrhoea. *J Clin Pathol* 1992; 45:609-611.
22. **Shetab R, Cohen SH, Prindiville T, Tang YJ, Cantrell M, Rahmani D, Silva JJr.** Detection of *Bacteroides fragilis* Enterotoxin Gen by PCR. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1729-1732.
23. **Meisel-Mikołajczyk F, Leszczyński P, van Belkum A, Pituch H, Obuch-Woszczatyński P, Rouyan GH S.** Enterotoxin-producing *Bacteroides fragilis* (ETBF) Strains in Stool Samples Submitted for Testing of *Clostridium difficile* and its Toxins. *Anaerobe* 1999; 5: 217-219.
24. **Cáceres M, Zhang G, Weintraub A, Nord C.** Prevalence and Antimicrobial Susceptibility of Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in Children with diarrhoea in Nicaragua. *Anaerobe* 2000; 6:143-148.
25. **Krzyzanowssky F, Avila-Campos MJ.** Detection of non-enterotoxigenic and enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in stool samples from children in São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2003; 45: 225-227.
26. **Durmaz B, Dalgalar M, Durmaz R.** Prevalence of Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in patients with diarrhea: A controlled study. *Anaerobe* 2005; 11:318-321.
27. **Alves Ferreira CE, Nakano V, Avila-Campos MJ.** Cytotoxicity and antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* isolated from hospitalized children with acute diarrhea. *Anaerobe* 2004; 10: 171-177.
28. **Citron DM, Kwok YY, Appleman MD.** *In Vitro* Activity of oritavancin (LY333328), vancomycin, clindamycin and metronidazole against *Clostridium perfringens*, *Propionibacterium acnes*, and anaerobic Gram-positive cocci. *Anaerobe* 2005; 11:93-95.
29. **Wexler HM, Molitoris D, Finegold SM.** *In Vitro* Activities of MK-826 (L-749,345) against 363 Strains

---

**Rodríguez-Cavallini et al.**

of Anaerobic Bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:2222-2224.

30. **Bishara J, Bloch Y, Garty M, Behor J, Samra Z.** Antimicrobial resistance of *Clostridium difficile* isolates in a tertiary medical center, Israel. *Diag Microbiol Infect*

Dis 2006; 54:141-144.

31. **Quesada-Gómez C, Rodríguez C, Gamboa Coronado MM, Rodríguez-Cavallini E, Du T, Mulvey MR, et al.** The emergence of *Clostridium difficile* NAP1 in Latin America. *J Clin Microbiol* 2010; 48:669-670.