

# Doença associada ao *Clostridium difficile* – aumento dramático da incidência em doentes internados

## *Clostridium difficile* associated disease – dramatic increase in the incidence among hospitalized patients

Lurdes Correia, Rita Monteiro, Tiago Alfaro, Adélia Simão, Armando Carvalho, Nascimento Costa

### Resumo

Vários trabalhos mostram aumento da incidência de doença associada ao *Clostridium difficile* (CD) (DACD), quer em doentes internados, quer na comunidade e estas infecções são hoje mais graves e difíceis de tratar. O objectivo deste estudo retrospectivo é avaliar a incidência e o impacto clínico da DACD em doentes internados de 1/1/2004 a 31/12/2009. Foram incluídos os que apresentavam clínica sugestiva e, pelo menos, um dos seguintes: colonoscopia compatível com DACD ou pesquisa de toxina positiva para o CD. Identificaram-se 83 casos de DACD (32H, 51M), diagnosticados em 9581 doentes (5198H, 4383M). A idade variou entre 47 e 94 anos (média de 79). Cinco doentes adquiriram a DACD na comunidade e 78 em meio hospitalar. A incidência de DACD quase sextuplicou entre 2004 e 2009 (4,35/1000 vs 21,63/1000), tendo 77,11% desenvolvido a doença durante o internamento. Foi mais frequente no sexo feminino (11,64/1000 vs 6,16/1000). Todos os doentes tinham feito antibioterapia prévia. As comorbilidades, o número de antibióticos usados, a idade avançada, o tempo de antibioterapia e de internamento não parecem justificar o aumento da incidência e da gravidade. Em 96% o diagnóstico foi confirmado pela presença da toxina do *Clostridium* e em 4% por colonoscopia. Foram tratados com metronidazol 73 doentes (88%), tendo 30% falecido (a mortalidade global do Serviço foi de 13%). Muito provavelmente foi a idade avançada que esteve relacionada com a maior gravidade e, consequentemente, alta mortalidade nos nossos casos.

Palavras-chave: *Clostridium difficile*, colite pseudomembranosa, diarreia nosocomial, metronidazol, vancomicina.

### Abstract

Many publications show an incidence increase of *Clostridium difficile* (CD) associated disease (CDAD), affecting both in- and outpatients being these recent infections more severe and difficult to treat. The aim of this retrospective study is to evaluate the incidence and clinical impact of CDAD in patients hospitalized from the 1st January 2004 to the 31st December 2009. Suggestive clinical manifestations and at least one of the following were the inclusion criteria: CDAD compatible colonoscopy or CD positive toxin. We identified 83 cases of CDAD (32M, 51W), in a total of 9581 patients (5198M, 4383W). Age ranging from 47 to 94 years (average 79). Five patients had CDAD acquired in the community and 78 in hospital environment. The incidence of CDAD increased almost six fold between 2004 and 2009 (4.35/1000 vs. 21.63/1000), and 77.11% developed the disease during hospitalization. The disease was more frequent in women (11.64/1000 vs. 6.16/1000). All patients had undergone prior antibiotherapy. The comorbidities, number of antibiotics used, advanced age, duration of the antibiotherapy and the length of hospitalization did not seem to justify the increase in incidence and severity. In 96% the diagnosis was confirmed by the presence of *Clostridium* toxin and in 4% by colonoscopy. Seventy three patients (88%) were treated with metronidazole and 30% died (the department overall mortality was 13%). Probably, it was the advanced age related with the worst severity scenario which caused the high mortality in our cases.

Key words: *Clostridium difficile*, pseudomembranous colitis, nosocomial diarrhoea, metronidazole, vancomycin.

### INTRODUÇÃO

O *Clostridium difficile* (CD) é um bacilo gram-positivo, anaeróbio, formador de esporos e produtor de toxinas que coloniza o cólon de 3% dos adultos saudáveis, e de cerca de 50% dos doentes internados,

aumentando com a duração do internamento.<sup>1,2</sup> A sua transmissão ocorre pela via fecal-oral e é responsável por um espectro variável de manifestações clínicas, desde a infecção assintomática ou a diarreia auto-limitada, até à sépsis, megacólon tóxico ou morte.<sup>2</sup>

Por razões não completamente esclarecidas, ao longo dos anos as infecções por CD começaram a ser observadas mais frequentemente, a terem maior gravidade, a serem refractárias à terapêutica instituída e a terem maior probabilidade de recidiva.<sup>3</sup> Nos Estados Unidos da América verificou-se um aumento

Serviço de Medicina Interna dos Hospitais da Universidade de Coimbra – EPE.

Recebido para publicação a 22.03.11  
Aceite para publicação a 28.01.12

da incidência de doença associada ao CD (DACD) de 1990 para 2005, de 3 para 8,4 casos por cada 10.000 doentes internados.<sup>4</sup> Também no Canadá a incidência passou de 3,4 a 8,4 casos por cada 1.000 admissões de 1997 para 2005.<sup>2</sup> Em Portugal sabe-se que a DACD é uma infecção frequente no hospital e que a sua incidência tem vindo a aumentar, inclusive em instituições sociais e lares, sendo descrita uma incidência de 3,71 casos por cada 10.000 internamentos, que aumentou em 8 anos, para 15 casos por cada 10.000 internamentos, no ano de 2007.<sup>5,6</sup> Têm sido reportados surtos associados a elevada morbidade e mortalidade.<sup>6</sup>

Existem várias explicações para o aumento da incidência, tais como a existência de melhores métodos de detecção, o aumento de prescrição de antibióticos e de imunossuppressores no contexto de quimioterapia, contaminação hospitalar com esporos de CD, devido à maior frequência da doença, aumentando a probabilidade de infecção nos doentes susceptíveis.<sup>7</sup> As mutações que conferem resistência aos antibióticos, o acréscimo da produção de toxinas e a facilitação da transmissão dos esporos têm aumentado a prevalência e a virulência deste organismo oportunista.<sup>4</sup>

O principal factor de risco de DACD é a exposição aos antibióticos, sendo responsável por 20–30% dos casos de diarreia associada a antibioterapia.<sup>2</sup> Quase todos, administrados por via oral ou parenteral, estão associados à DACD, que poderá surgir durante ou após a terapêutica, sendo os mais comuns a clindamicina, as cefalosporinas e as fluoroquinolonas.<sup>1</sup> Para além da utilização de antibióticos, outros factores de risco incluem idade superior a 65 anos, sexo feminino, existência de doença grave subjacente e co-morbilidades, internamento hospitalar prolongado (superior a 4 semanas), manipulação/cirurgia gastrointestinal e possivelmente, a utilização de inibidores da bomba de protões.<sup>1,6</sup> A DACD pode, no entanto, ocorrer sem nenhum factor de risco conhecido.<sup>4,8</sup>

Actualmente recomenda-se o metronidazol como terapêutica de primeira linha, na infecção ligeira a moderada, na dose de 500 mg, oralmente, durante 10 a 14 dias. No caso de infecção grave, de não haver resposta ao metronidazol, ou de intolerância ao mesmo, recomenda-se a vancomicina, por via oral, 125 mg de 6 em 6 horas, 10 a 14 dias.<sup>4</sup> Vinte a 25% dos doentes melhoram com a suspensão do antibiótico em curso.<sup>4</sup>

A selecção cuidadosa de antibióticos e evitar a sua prescrição desnecessária constituem a base da

prevenção primária.<sup>4</sup> É também fundamental a utilização de medidas de controlo da infecção hospitalar, tais como a descontaminação do ambiente e a minimização da infecção cruzada através da higiene das mãos, precauções de barreira e medidas eficazes de controlo da infecção.<sup>4</sup>

O objectivo do presente estudo foi avaliar a incidência e o impacto clínico da DACD em doentes internados, ao longo de um período de 6 anos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Analisaram-se retrospectivamente todos os processos clínicos de doentes com DACD internados em duas enfermarias do Serviço de Medicina Interna dos Hospitais da Universidade de Coimbra no período de tempo entre 1 de Janeiro de 2004 e 31 de Dezembro de 2009. Foram incluídos no estudo os doentes que apresentaram clínica compatível com infecção por CD (diarreia com muco) e pelo menos um dos seguintes critérios: colonoscopia com pseudomembranas, e/ou identificação da toxina A e B nas fezes por imunoenensaio enzimático rápido e qualitativo (ImmunoCard® Toxins A & B).

Os doentes foram distribuídos em dois grupos: DACD da comunidade (doentes sem internamento hospitalar no ano anterior<sup>8</sup>) e DACD nosocomial.

Foram avaliadas as seguintes variáveis: dados demográficos (idade, sexo), epidemiológicos (número total de casos de DACD num ano, número total de internamentos anual, proveniência – domicílio, lar de idosos, unidade de cuidados continuados – e distribuição por mês do ano) e clínicos (co-morbilidades associadas, antibioterapia e internamento prévios, métodos complementares de diagnóstico, terapêutica prescrita e evolução clínica). A análise estatística dos dados foi realizada com recurso ao programa SPSS® 16.0 para Windows, SPSS Inc., Chicago, IL, EUA e definiu-se um nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ).

Os valores das variáveis contínuas foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão e foram utilizados os testes *t* de Student, Kruskal-Wallis e Mann-Whitney U para comparar as médias.

## RESULTADOS

Nos 9.581 doentes (5.198 homens e 4.383 mulheres) internados entre 1 de Janeiro de 2004 e 31 de Dezembro de 2009, foram identificados 83 casos de DACD (0,87%). Foi mais frequente no sexo feminino (51 casos – 61,4%), do que no sexo masculino (32 casos –

## QUADRO I

Incidência da Doença Associada ao *Clostridium difficile* (DACD)

Ano	2004	2005	2006	2007	2008	2009	TOTAL	
Número de casos de DACD da Comunidade	2	0	2	1	0	0	5	
Número de casos de DACD Nosocomial	6	5	5	10	14	38	78	
Incidência de DACD	Sexo masculino	2,04/1000	4,00/1000	0	4,6/1000	6,92/1000	18,78/1000	6,16/1000
	Sexo feminino	6,99/1000	3,34/1000	11,2/1000	9,26/1000	11,54/1000	24,65/1000	11,64/1000
	Global	4,35/1000	3,71/1000	4,82/1000	6,76/1000	8,97/1000	21,63/1000	8,66/1000

38,6%) (Quadro 1). A idade variou entre 47 e 94 anos, com uma idade média de  $79,17 \pm 9,28$  anos (Fig. 1).

Setenta e oito doentes (94%) tinham mais de 65 anos. Noventa e quatro por cento (46 mulheres e 32 homens) apresentaram DACD nosocomial e 6% (5 mulheres) adquiriram a infecção na comunidade. Observou-se um aumento da incidência de DACD de 2005 para 2009, devendo-se ao maior número de casos de infecção nosocomial (Quadro 1).

Constatou-se que o número de antibióticos usados e que o número médio de dias desde o início do antibiótico até ao aparecimento da doença foi superior nos homens, 3,25 vs 2,33 e 25,91 vs 18,61, respectivamente.

Foram identificadas as seguintes co-morbilidades: acamado, úlceras de decúbito, desnutrição, espondilite anquilosante, fibromialgia, hepatite B, cirrose hepática, tuberculose, depressão, sequelas de acidente vascular cerebral, demência, epilepsia, doença de Parkinson, diabetes *mellitus* tipo 2, hipotireoidismo, insuficiência cardíaca, hipertensão arterial, miocardiopatia, fibrilhação auricular, cardiopatia isquémica, doença pulmonar obstrutiva crónica, fibrose pulmonar, insuficiência renal crónica, gamapatia monoclonal, leucemia, beta talassemia menor, linfoma, anemia, carcinoma espinhocelular, neoplasia do cólon, neoplasia do recto, neoplasia da próstata, neoplasia da mama, doença de Paget óssea, neurinoma do acústico (Quadro II).

Todos os doentes tinham feito antibiótico antes do aparecimento do quadro (Figs. 2 e 3). Nos doentes com DACD da comunidade o número médio de dias desde o início do antibiótico até ao aparecimento da diarreia foi de  $9 \pm 4,42$ . Nos doentes com DACD nosocomial o número médio de dias desde o início

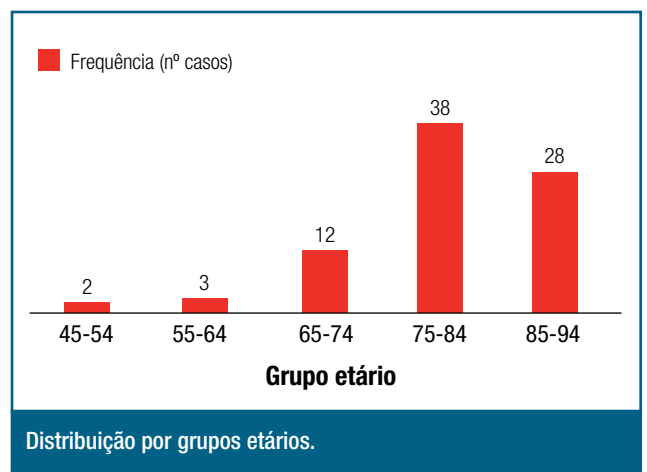


FIG. 1

do antibiótico até ao aparecimento da diarreia foi de  $21,6 \pm 15,59$ .

Dezanove doentes (22,89%) apresentaram sintomas em ambulatório, tendo sido internados por DACD, 64 (77,11%) desenvolveram a doença durante o internamento, 46 (55,42%) apresentavam história de internamento no último ano e destes 29 tinham tido alta hospitalar há menos de 1 mês.

Comparando os que tiveram internamento no último ano com os que não tiveram, verificou-se que o número de antibióticos usados para desenvolver DACD é menor (média de 2,43 vs 3,09;  $p=0,030$ ), não tendo havido diferença estatisticamente significativa no que diz respeito à idade ( $p=0,643$ ), ao tempo de internamento ( $p=0,293$ ) e ao número de dias desde o início do antibiótico até ao aparecimento da doença ( $p=0,43$ ).

Relativamente ao sexo, verificou-se que o número médio de antibióticos utilizados foi maior nos homens

## QUADRO II

## Comorbilidades

Tipo de comorbilidade	Total de doentes
Acamado	32
Úlceras de decúbito	15
Desnutrição	7
Espondilite anquilosante	1
Fibromialgia	1
Hepatite B	1
Cirrose hepática	2
Tuberculose	1
Depressão	1
Sequelas de acidente vascular cerebral	36
Demência	21
Epilepsia	5
Doença de Parkinson	2
Diabetes <i>Mellitus</i> tipo 2	19
Hipotiroidismo	2
Insuficiência cardíaca	23
Hipertensão arterial	34
Miocardiopatia	1
Fibrilhação auricular	6
Cardiopatia isquémica	3
Doença pulmonar obstrutiva crónica	4
Fibrose pulmonar	1
Insuficiência renal crónica	13
Gamapatia monoclonal	2
Leucemia	1
Beta talassemia minor	1
Linfoma	1
Anemia	3
Carcinoma espinhocelular	1
Neoplasia do cólon	1
Neoplasia do recto	2
Neoplasia da próstata	2
Neoplasia da mama	1
Doença de Paget óssea	1
Neurinoma do acústico	1

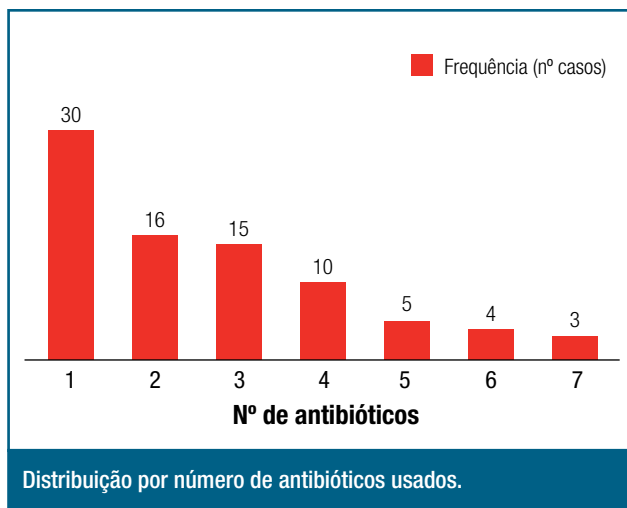


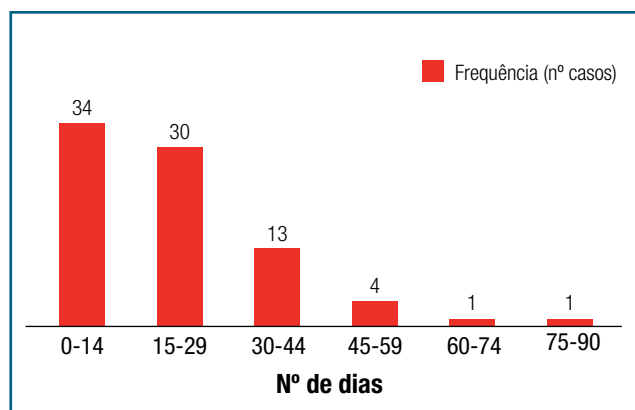
FIG. 2

(3,25 vs 2,33;  $p=0,029$ ), assim como o número de dias desde o início do antibiótico até ao aparecimento da doença (25,91 vs 18,61;  $p=0,025$ ). Não houve diferença no que diz respeito ao número de comorbilidades ( $p=0,176$ ), tempo de internamento ( $p=0,073$ ) e mortalidade ( $p=0,924$ ).

Comparando os doentes provenientes do domicílio (grupo 1) com os provenientes de Lar ou de Unidade de Cuidados Continuados (grupo 2), observou-se que o número médio de comorbilidades foi superior no grupo 2 (0,75 vs 3,0;  $p=0,011$ ), não havendo diferença na idade ( $p=0,017$ ), número médio de antibióticos usados ( $p=0,17$ ), número de dias desde o início do antibiótico e o aparecimento da doença (0,80) e no tempo de internamento ( $p=0,75$ ).

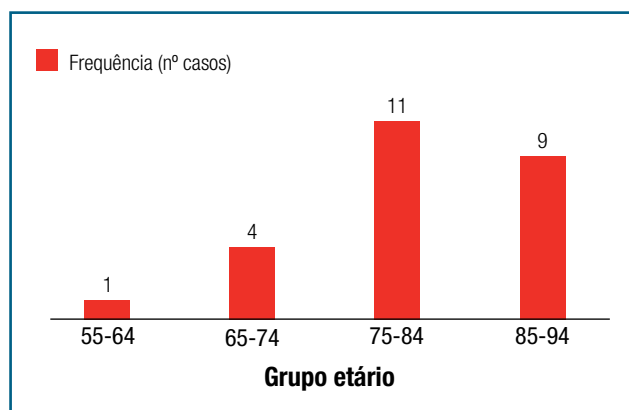
Na tentativa de justificar o aumento da incidência de DACD nosocomial, foram distribuídos esses doentes por ano e foram comparados os vários anos. Não houve diferença na idade, no número de comorbilidades, no número de antibióticos usados, no número de dias desde que iniciou o antibiótico até que desenvolveu DACD, no total de dias de internamento e na proveniência (domicílio, lar ou unidade de cuidados continuados), desde 2004 até 2009.

Relativamente ao método de diagnóstico, 80 doentes (96%) tinham pesquisa da toxina positiva para o CD, 11 (13%) apresentavam toxina positiva e colonoscopia sugestiva e 3 (4%) apenas tinham colonoscopia sugestiva. No que diz respeito ao tratamento, 73 doentes (88%) foram medicados com metronidazol, 1 com vancomicina e 6 (7%) inicialmente com



Distribuição pelo número de dias desde o início do antibiótico até o aparecimento da diarreia.

FIG. 3



Distribuição dos óbitos por grupos etários.

FIG. 4

metronidazol seguido pela vancomicina. Os doentes que não foram medicados (3) faleceram.

Vinte e cinco doentes (30%), (12 homens e 13 mulheres), faleceram (Fig. 4). Não houve diferença estatisticamente significativa, na mortalidade entre os sexos. A idade média dos doentes que faleceram foi  $79,52 \pm 7,6$  anos. A mortalidade no total de doentes internados no período estudado (1.267) foi de 13%.

## DISCUSSÃO

Verificou-se uma incidência anual média de DACD de 8,66 em 1.000 internamentos, superior à observada num estudo português (3,71 em 10.000 internamentos).<sup>6</sup> Também foi superior à descrita em estudos epidemiológicos europeus que descrevem incidências anuais de 0,3 a 1,9 em 10 000 internamentos.<sup>9,10</sup> No entanto, 94% dos doentes tinham mais de 65 anos e estão descritas incidências de 8,67 em 1.000 internamentos, acima dos 64 anos, que é muito próxima da detectada no nosso estudo.<sup>4</sup>

A incidência de DACD aumentou de 2004 para 2009 (4,35/1000 vs 21,63/1.000), mais acentuadamente de 2008 para 2009 (8,97/1000 vs 21,63/1000), devido ao maior número de casos de infecção nosocomial (94% dos casos). Em vários trabalhos a percentagem de DACD nosocomial foi de 80%<sup>9</sup> e num estudo português, a infecção foi adquirida em ambulatório em 45% dos doentes.<sup>1</sup> No nosso trabalho 22,89% das infecções foram adquiridas em ambulatório, sendo a maioria (77,11%) desenvolvidas durante o internamento.

Este aumento ao longo dos anos tem sido descrito em vários estudos, não tendo sido ainda encontrada a causa.<sup>4,6</sup> Uma das explicações é a crescente utilização de antibióticos.<sup>2,7,11</sup> Olson *et al* reportaram que 96% dos doentes com infecção sintomática tinham efectuado antibiótico nos 14 dias antes do aparecimento da diarreia, e todos tinham feito antibiótico até 3 meses antes.<sup>11</sup> No presente estudo também todos os doentes fizeram antibiótico até 3 meses antes do aparecimento da diarreia, 41% nos 14 dias antes e 78% no mês anterior.

A antibioterapia múltipla e o tempo de antibioterapia são factores de risco descritos para desenvolver DACD.<sup>12</sup> No artigo português de Vieira *et al.*, 33% dos doentes tinham sido previamente medicados com um antibiótico, 52% com mais que um e 26% com três ou mais.<sup>6</sup> No nosso estudo, 36% dos doentes tinham sido previamente medicados com um antibiótico, 64% com mais que um antibiótico e 45% com três ou mais antibióticos. Contudo, não houve diferença estatisticamente significativa no número de antibióticos utilizados, nem no número de dias que decorreu entre o início do antibiótico e o desenvolvimento de DACD, desde 2004 até 2009. No entanto, verificou-se que o número de antibióticos associados ao desenvolvimento de DACD é menor (média de 2,43 vs 3,09), nos doentes que estiveram internados no ano prévio.

O sexo feminino, a idade superior a 65 anos, o número de comorbilidades e a maior duração do internamento são outros factores de risco descritos.<sup>4,6,13</sup> De facto, foi mais frequente no sexo feminino do que

no masculino (6,16/1000 vs 11,64/1000), sendo o número de antibióticos usados e o número médio de dias desde o início do antibiótico até ao aparecimento da doença superior nos homens, podendo de alguma forma justificar a incidência mais baixa. No entanto, no nosso estudo não se verificaram diferenças estatisticamente significativa na idade, no número de comorbilidades, ou no total de dias de internamento, desde 2004 até 2009.

A prevenção da infecção por CD é um ponto importante para minimizar a transmissão, sendo de salientar que a solução alcoólica utilizada para a desinfecção das mãos não é eficaz na erradicação dos esporos do CD, devendo a lavagem destas ser feita com água e sabão neutro.<sup>14,15,16,17</sup> Em 2008 a solução alcoólica passou a ser usada como método de desinfecção nas enfermarias onde foi realizado este estudo, coincidindo com o aumento exponencial da incidência de DACD. Assim, é de admitir que a diminuição de água e sabão na lavagem das mãos tenha tido alguma interferência no aumento da transmissão intra-hospitalar.

Relativamente ao método de diagnóstico, em 80 doentes (96%) a pesquisa da toxina para o CD foi positiva. De facto, o exame padrão para estabelecer o diagnóstico é o ensaio para detectar a toxina A e a toxina B, sendo o mais comum o imunoenzimático.<sup>1</sup> No entanto, a sensibilidade deste método é de apenas 60 a 80%, sendo muitas vezes necessário fazer exames repetidos. Quando os aspectos clínicos são sugestivos de doença, mesmo com pesquisas de toxina negativas, os doentes devem iniciar tratamento empírico.<sup>1</sup>

O tratamento padrão consiste em interromper o antibiótico implicado, quando possível, instituir cuidados de suporte e evitar agentes anti-peristálticos. Os doentes com infecção sem gravidade geralmente respondem a estas medidas.<sup>1</sup> Neste trabalho, 73 doentes (88%) foram medicados com metronidazol, 1 com vancomicina e 6 (7%) inicialmente com metronidazol seguido pela vancomicina. Três doentes que não foram medicados faleceram.

A taxa de mortalidade atribuída à doença é de 16%, e a maioria dos casos letais ocorre em doentes com mais de 65 anos.<sup>1</sup> Neste estudo, 25 doentes (30%) faleceram, sendo a mortalidade mais alta do que a global do internamento (30% vs 13%). Provavelmente foi a idade avançada que esteve relacionada com a maior gravidade e, consequentemente, alta mortalidade nos nossos casos.

## CONCLUSÕES

Verificou-se uma incidência anual média de DACD de 8,66 em 1.000 internamentos, superior à observada em outros estudos,<sup>6,9,10</sup> mas de acordo com a descrita para a faixa etária considerada.<sup>4</sup>

A incidência de DACD quase sextuplicou entre 2004 e 2009, devido ao maior número de casos de infecção nosocomial (94% dos casos). A maioria dos doentes (77,11%) desenvolveu a doença durante o internamento. Nos doentes que estiveram internados no ano prévio, o número de antibióticos usados para o desenvolvimento de doença foi menor do que os que não estiveram internados.

Embora tenha sido mais frequente no sexo feminino, não há diferença na mortalidade entre os sexos. No sexo masculino verificou-se um maior número de antibióticos e mais dias desde o início do antibiótico até ao aparecimento de sintomatologia.

Todos os doentes efectuaram antibiótico previamente. O número de co-morbilidades, de antibióticos usados, de dias desde o início da antibioterapia até ao aparecimento de sintomas, de dias de internamento e a proveniência dos doentes, não parecem justificar o aumento da incidência e da gravidade. A mortalidade foi mais alta do que a global do Serviço (30% vs 13%). Muito provavelmente foi a idade avançada que esteve relacionada com a maior gravidade e, consequentemente, a elevada mortalidade nos nossos casos.

A substituição da lavagem das mãos com água e sabão por soluções alcoólicas de desinfecção hospitalar pode ter contribuído para o aumento da incidência de 2008 para 2009. ■

## Bibliografia

1. Goldman LEE, Ausiello Dennis. Cecil Medicine 23ª Edição. Rio de Janeiro: Elsevier.2009:2536-2538.
2. Cohen SH, Gerding DN, Johnson S 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). Infect Control Hosp Epidemiol 2010; 31:431-455.
3. Bartlett, JG. Narrative review: the new epidemic of Clostridium difficile-associated enteric disease, Ann Intern Med 2006; 145:758.
4. Kelly CP, LaMont T. Clostridium difficile – more difficult than ever. N Engl J Med 2008;359:1932-1940.
5. Filipe S. Infecção no Hospital. Medicina e Saúde 2007; 120:20-22.
6. Vieira AM, Machado MV, Lito L et al. Diarreia associada a Clostridium difficile num hospital central. GE-J Port Gastroenterol 2010; 17:10-17.
7. Voth DE, Ballard JD. Clostridium difficile toxins: mechanism of action and role in disease. Clin Microbiol Rev 2005;18:247-263.
8. LaMont JT, Calderwood SB, Baron EL. Epidemiology, microbiology, and

pathophysiology of Clostridium difficile infection. UpToDate 2009.

9. Barbut F, Giarazzo B, Bonne L et al. Clinical features of C.difficile-associated infections and molecular characterization of strains: results of a retrospective study, 2000-2004. Infect Control Hosp Epidemiol 2007;28:131-139.

10. Barbut F, Delmee M, Brazier JS et al. A European survey of diagnostic methods and testing protocols for C. difficile. Clin Microbiol Infect 2003;9:989-996.

11. Olson MM, Shanholtzer CJ, Lee JT et al. Ten years of prospective Clostridium difficile-associated disease surveillance and treatment at the Minneapolis VA Medical Center, 1982-1991. Infect Control Hosp Epidemiol 1994;15:371-381.

12. Surawicz CM. Antibiotics and C.difficile: cause and cure. J Clin Gastroenterol 2007; 41:1-2.

13. Lynne, V. Renewed interest in a difficult disease: Clostridium difficile infections –epidemiology and current treatment strategies. Curr Opin Gastroenterol.2009;25(1):24-35.

14. Bettin K, Clabots C, Mathie P et al. Effectiveness of liquid soap vs. chlorhexidine gluconate for the removal of Clostridium difficile from bare hands and gloved hands. Infect Control Hosp Epidemiol 1994; 15:697.

15. Boyce, JM, Pittet, D, Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee, HICPAC/SHEA/APIC/IDSA Hand Hygiene Task Force. Guideline for Hand Hygiene in Health-Care Settings. Recommendations of the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee and the HICPAC/SHEA/APIC/IDSA Hand Hygiene Task Force. Society for Healthcare Epidemiology of America/Association for Professionals in Infection Control/Infectious Diseases Society of America. MMWR Recomm Rep 2002; 51:1.

16. Jabbar U, Leischner J, Kasper D et al. Effectiveness of alcohol-based hand rubs for removal of Clostridium difficile spores from hands. Infect Control Hosp Epidemiol 2010; 31:565.

17. Oughton MT, Loo VG, Dendukuri N et al. Hand hygiene with soap and water is superior to alcohol rub and antiseptic wipes for removal of Clostridium difficile. Infect Control Hosp Epidemiol 2009; 30:939.