

Clostridium perfringens y *Clostridium difficile* como agentes etiológicos de diarrea nosocomial asociada a antibióticos en niños costarricenses

Max A. Ruiz-Corella, Pamela Altamirano-Silva, Evelyn Rodríguez-Cavallini, María del M. Gamboa-Coronado

Laboratorio de Investigación en Bacteriología Anaerobia y Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica

RESUMEN

Introducción. La diarrea nosocomial es producida, entre otras causas, por el uso de antibióticos que distorsionan la microbiota indígena y favorecen la colonización de patógenos. *Clostridium difficile*, una bacteria Gram positiva, anaerobia y esporulada, es considerada agente etiológico frecuente; recientemente se ha implicado a *C. perfringens*, en ocasiones sinérgicamente con *C. difficile*. Con este estudio se pretende determinar el papel de estas bacterias en diarreas de niños, población altamente susceptible de infección nosocomial y cuyo manejo terapéutico debe ser cada vez más preciso.

Material y Métodos. Se procesaron 39 muestras de diarreas nosocomiales asociadas a antibióticos, de un hospital de niños de Costa Rica. Se determinó la presencia de toxina A de *C. difficile* y de enterotoxina de *C. perfringens*. Se realizaron aislamientos bacterianos en agar CCFA y OPSP y se determinó su sensibilidad a los antibióticos.

Resultados. Se detectó la enterotoxina de *C. perfringens* en 3 (7.7%) muestras y se aislaron 8 (20.5%) cepas de *C. perfringens*, ninguna enterotoxigénica. Todos los aislamientos fueron sensibles a nueve antibióticos y hubo resistencia a otros cuatro. La toxina de *C. difficile* se detectó en 6 (15.4%) muestras y el aislamiento bacteriano en 5 (12.8%). Ninguno de éstos fue sensible a

cefexitina; hubo resistencia a cuatro antibióticos más. En 3 (7.7%) muestras se aisló *C. difficile* y *C. perfringens*, sin detección simultánea de ambas toxinas.

Discusión. El 23.1% de las diarreas nosocomiales fueron causadas por *C. difficile* o *C. perfringens*, patógenos cuya detección no está incluida en la rutina bacteriológica de los hospitales costarricenses; los resultados demuestran la importancia de implementar técnicas para su detección. Las pruebas de sensibilidad antimicrobiana revelan cierto grado de resistencia, que debería considerarse para brindar un tratamiento adecuado. Es necesario ampliar estos estudios, a fin de corroborar esa resistencia.

Palabras clave: diarrea asociada a antibióticos, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, toxina A, enterotoxina.

SUMMARY

***Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* as etiological agents of antibiotic associated diarrhea in Costa Rican children**

Introduction. Nosocomial diarrhea may be caused by the use of antibiotics that alter the indigenous microbiota and favor the colonization

Solicitud de sobretiros: Evelyn Rodríguez-Cavallini. Laboratorio de Investigación en Bacteriología Anaerobia, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, Costa Rica, C. A. Correo electrónico: everoca@cariari.ucr.ac.cr

Recibido: el 6 de febrero de 2007. **Aceptado para publicación:** el 25 de junio de 2007.

Este artículo está disponible en <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb071822.pdf>

of pathogens. *Clostridium difficile*, a Gram positive spore-forming anaerobe, is considered a frequent etiological agent; recently, *C. perfringens* has also been implicated and may act, synergically with *C. difficile*. The present study describes the prevalence of these bacteria in a group of children with nosocomial diarrhea, an entity that requires precise therapeutic management.

Material and methods. Of the samples of nosocomial diarrheic feces associated to antibiotics from children in a Costa Rican hospital 39 were processed. The presence of toxin A of *C. difficile* and enterotoxin of *C. perfringens* was determined. Bacterial isolates were obtained from CCFA and OPSP agar and their antibiotic susceptibility pattern was determined.

Results. Enterotoxin of *C. perfringens* was detected in 3 (7.7%) and *C. perfringens* was isolated from 8 (20.5%) of the samples, none was enterotoxigenic. All of the isolates were sensitive to nine antibiotics and resistant to four. *C. difficile* toxin was detected in 6 (15.4%) samples and the bacterium was isolated in 5 (12.8%). None of the isolates was sensitive to cefoxitin, and some presented resistance to other four antibiotics. In 3 (7.7%) of the samples, *C. difficile* and *C. perfringens* were simultaneously isolated, but none was positive for both toxins.

Discussion. Of the nosocomial diarrheas analyzed 23.1% were caused by *C. difficile* or *C. perfringens*, anaerobic pathogens that are not included in Costa Rican hospitals as bacteriological routines. These results reveal the importance of implementing techniques for their detection. The antimicrobial sensitivity tests reveal certain degree of resistance that should be considered for accurate treatment. Further studies shall be performed in order to confirm this resistance.

Key words: antibiotic associated diarrhea, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, toxin A, enterotoxin.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones nosocomiales se desarrollan en el centro hospitalario y son adquiridas por los pacientes, personal médico o de suministros, durante su estancia en el mismo. La diarrea nosocomial es un ejemplo de dichas infecciones y puede ser producida, entre otros factores, por el uso de antibióticos que distorsionan la microbiota indígena y favorecen la colonización de patógenos (1), así como por agentes antineoplásicos, drogas citotóxicas, antiácidos o laxantes. La edad avanzada (paciente mayor de 60 años), cirugía intestinal, enemas, fallo renal crónico, exposición a procedimientos invasivos de cualquier tipo y el estado de inmunosupresión, son también factores predisponentes (2-4).

Clostridium difficile, una bacteria anaerobia, Gram positiva y esporulada, es considerada como la causa más común de diarrea nosocomial asociada a antibióticos (2). Esta bacteria posee dos toxinas: la A, que es tanto enterotoxina como citotoxina y la B, la cual es una potente citotoxina sin actividad enterotóxica (2,4-8). Más recientemente se ha demostrado que *C. perfringens* (productor de enterotoxina), puede causar alrededor del 15% de todos los casos de diarreas asociadas a antibióticos, al parecer, en algunos casos, actuando sinérgicamente con *C. difficile* (9).

Un estudio previo hecho en Costa Rica en muestras diarreicas provenientes de pacientes adultos, demostró que *C. difficile* fue el agente etiológico de la diarrea asociada a antibióticos en el 25% de los casos (10) y *C. perfringens* en el 6.9% (11). Con el presente estudio se pretende determinar el papel de estas dos bacterias en cuadros diarreicos en niños, población altamente susceptible de infección nosocomial y cuyo manejo terapéutico debe ser cada vez más preciso en beneficio del paciente.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se procesaron 39 muestras de heces diarreicas obtenidas durante un período de 15 meses, provenientes de pacientes internados en un

Clostridium perfringens y *C. difficile* en diarrea de niños

hospital de niños de Costa Rica, y cuyas edades fueron las siguientes: 10 con 12 meses o menos, 15 entre 13 meses y 4 años y 14 mayores de 5 años. Las muestras fueron seleccionadas por el centro hospitalario como nosocomiales y asociadas a antibióticos, si provenían de pacientes con terapia antimicrobiana, que presentaron diarrea al menos 48 horas después del internamiento.

Se determinó la presencia de toxina A de *Clostridium difficile* y de la enterotoxina de *C. perfringens* en las heces. Además, se realizaron aislamientos bacterianos a partir de las heces, a los cuales se les determinó la sensibilidad a los antibióticos; se analizó también la producción de enterotoxina en los aislamientos de *C. perfringens*.

Para el aislamiento de *C. perfringens* se inoculó, en ambiente anaerobio, aproximadamente 1 g de heces de cada muestra en tubos con 5 mL de caldo infusión cerebro y corazón (CICC) prerreducido y se incubaron a 44°C por 24 horas, con el propósito de preenriquecer las muestras. A partir de los tubos que presentaron turbiedad y producción de gas, se estriaron cajas de agar oleandomicina polimixina sulfadiazina perfringens (OPSP) que se incubaron en jarra de anaerobiosis a 44°C por 24 horas. Las colonias aisladas, ya fuesen blancas o negras, fueron inoculadas en tubos con medio CICC prerreducidos e incubados durante 4 horas en baño-maría a 44°C. Los tubos que presentaron turbiedad y producción de gas se consideraron positivos y fueron inoculados en agar sangre (AS) e incubados a 44°C durante 24 horas (12). A las colonias con doble hemólisis se les realizó tinción de Gram, con el fin de verificar pureza y morfología de bacilos Gram positivos; se les realizó además una prueba de tolerancia al oxígeno, que consistió en la incubación de estriados de cajas de AS en jarras con vela y en jarras de anaerobiosis por 24 horas a 44°C. Se identificaron presuntivamente como *C. perfringens* aquellos aislamientos que además, crecieron exclusivamente o mejor bajo condiciones anaerobias. Éstos se inocularon en CICC y se

incubaron por 2 a 4 horas a 44°C para verificar que no fueran móviles. Luego se inocularon en agar yema de huevo, que se incubó en anaerobiosis para evidenciar la producción de lecitinasa. Para completar la identificación definitiva se realizaron pruebas de hidrólisis de gelatina, producción de indol, fermentación de lactosa y salicina (12).

La enterotoxina de *C. perfringens* se detectó directamente en las muestras de heces y en los aislamientos, mediante la prueba de aglutinación reversa pasiva con látex (Oxoid®), siguiendo la recomendaciones de la casa fabricante, excepto que el crecimiento bacteriano se realizó en anaerobiosis y el medio de esporulación empleado fue Duncan modificado (12).

Para el aislamiento de *C. difficile* se mezcló una asada (aproximadamente 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 cicloserina cefoxitina fructosa (CCFA) y se incubó a 35°C por 72 horas en jarra de anaerobiosis. Al mismo tiempo, se realizó un enriquecimiento de 0.5 mL en CICC, que fue utilizado en caso de que la muestra tratada con alcohol fuese negativa; el CICC fue incubado anaeróticamente por 3 días a 35°C, para luego inocular una placa de agar CCFA (13). Las colonias rizoides, irregulares, grises y opacas, características de *C. difficile*, se estriaron en AS y se les realizó tinción de Gram y prueba de uorescencia. Las colonias de bacilos Gram positivos, con uorescencia amarillo verdosa, se identificaron presuntivamente como *C. difficile* (13). La confirmación de los aislamientos se realizó con sistemas miniaturizados de identificación Rapid ID32A (bioMérieux®). Para la detección de la toxina A de *C. difficile* en las muestras de heces, se utilizó la prueba de inmunocromatografía “*C. difficile* toxin A test” (Oxoid®) y se siguieron las recomendaciones de la casa fabricante.

A todos los aislamientos identificados como *C. difficile* o *C. perfringens* se les realizó un antibiograma, utilizando sistemas miniaturizados ATB ANA (bioMérieux®), siguiendo las

recomendaciones de la casa fabricante.

RESULTADOS

Se detectó la enterotoxina de *C. perfringens* en 3 (7.7%) de las 39 muestras analizadas y se aislaron 8 (20.5%) cepas de esta bacteria, ninguna de las cuales fue positiva en la determinación de enterotoxina. Por lo tanto, es posible que *C. perfringens* fuera el agente etiológico de al menos 3 (7.7%) de los 39 casos de diarrea nosocomial estudiados.

Con respecto a la susceptibilidad a antibióticos, todas las cepas de *C. perfringens* fueron sensibles a nueve antibióticos: penicilina G, amoxicilina, amoxicilina con ácido clavulánico, piperacilina, piperacilina con tazobactam, ticarcilina, ticarcilina con ácido clavulánico, imipenem y cloranfenicol. Un aislamiento fue resistente a cefotetán y metronidazol, otro a clindamicina y uno presentó sensibilidad intermedia a cefoxitina.

En cuanto a *C. difficile*, se detectó la toxina A en 6 (15.4%) de las 39 muestras y se aisló la bacteria en 5 (12.8%). Por lo tanto, es posible que *C. difficile* fuera el agente etiológico de 6 (15.4%) de los 39 casos de diarrea nosocomial estudiados.

En 3 (7.7%) de las muestras analizadas se aisló tanto *C. difficile* como *C. perfringens*, mientras que en ninguna de éstas se detectó simultáneamente ambas toxinas.

Con respecto a la susceptibilidad a antibióticos de *C. difficile*, se puede resaltar que ninguno de los cinco aislamientos fue sensible a cefoxitina y solamente uno fue sensible a penicilina. Dos cepas fueron resistentes a cefotetán y clindamicina, una de las cuales, además, presentó sensibilidad intermedia a imipenem. No hubo cepas resistentes a ninguno de los demás antibióticos probados.

DISCUSIÓN

Clostridium perfringens es un agente infeccioso muy conocido, entre otros, por su asociación con toxicoinfección alimentaria (9, 12); sin embargo, su papel en la producción de

diarreas nosocomiales no está muy estudiado y por ende, no es tomado en cuenta como posible agente etiológico a la hora de establecer el diagnóstico.

A pesar de que *C. perfringens* fue aislado en 8 de las muestras (20.5%), en ninguno de los aislamientos fue detectada la enterotoxina. De la misma forma, Pituch y colaboradores (14) aislaron *C. perfringens* en 13% de los pacientes que estudiaron sin detectar la presencia de la enterotoxina. Para poder afirmar que *C. perfringens* es el agente etiológico de diarrea, es necesario no sólo aislar el microorganismo, sino también detectar la presencia de su enterotoxina, ya que esta bacteria puede estar presente en el intestino del ser humano como parte de la flora normal (12). Por esta razón, *C. perfringens* se consideró como agente etiológico de la diarrea únicamente en aquellos casos en los que se detectó su enterotoxina (7.7% de las muestras). Este porcentaje es similar al 7% determinado en población adulta costarricense por Espinoza y Camacho (11) y al 10% que encontraron Brett y colaboradores (15) en pacientes mayores de sesenta años. Aún no está claro si la exposición a antibióticos permite la proliferación del *C. perfringens* que se encuentra como flora normal o si, por el contrario, permite su adquisición y establecimiento posterior (16). Los estudios de Carney y colaboradores (17), quienes obtuvieron sólo un 1.6% de muestras positivas por *C. perfringens* en pacientes hospitalizados de todas las edades, parecen apoyar esta última hipótesis, si se considera que en ese centro hospitalario (a diferencia del hospital en este estudio) no se encuentra la bacteria en altas cantidades.

Es interesante observar que la enterotoxina de *C. perfringens* sólo pudo ser detectada directamente en las muestras de heces y no en ninguna cepa aislada. Esto puede deberse a que no todas las cepas de *C. perfringens* son enterotoxigénicas, por lo que en los aislamientos realizados pudieran presentarse a la vez, tanto cepas enterotoxigénicas como no enterotoxigénicas (18); de allí que sería importante evaluar varias colonias a partir de una misma muestra y de esta manera aumentar

la posibilidad de detectar una cepa productora de enterotoxina (19). Otro factor a considerar es que la producción máxima de enterotoxina de *C. perfringens* ocurre durante la esporulación y es sumamente difícil lograr que esta bacteria esporule *in vitro* (19). Finalmente, las cepas pueden perder el gen de la enterotoxina al subcultivarlas en el laboratorio (16).

El hallazgo de un 7.7% de muestras positivas por *C. perfringens* en este estudio es importante, pues dicho agente puede ser fundamental como agente causal de diarrea en niños (16, 20). Además, contribuye a completar el conocimiento de la etiología de la diarrea nosocomial, al considerar un agente no tradicional.

Con respecto a la susceptibilidad a antibióticos, *C. perfringens* ha sido descrito como susceptible a la mayoría de los antibióticos analizados (11, 21-23). Sin embargo, la resistencia a clindamicina y a cefalosporinas que se encontró en la presente investigación ya ha sido descrita (24, 25). Aunque la resistencia a metronidazol no es frecuente (21), su hallazgo podría explicarse por el amplio uso que se le da en nuestro país a dicho antimicrobiano, al ser un tratamiento antiparasitario y de elección contra bacterias anaerobias.

Con respecto a *C. difficile*, considerando el aislamiento y la detección de la enterotoxina, se puede afirmar que *C. difficile* es el agente etiológico de 6 (15.4%) casos de diarrea nosocomial. Este porcentaje es similar al señalado por Gogate y colaboradores (26), quienes detectaron la toxina de *C. difficile* en 18% de las muestras de niños que estudiaron. Sin embargo, es más bajo que el informado por otros autores (2, 8, 27), quienes describen una frecuencia de aproximadamente 25-30% en población general con diarrea nosocomial.

El aislamiento negativo en una muestra enterotoxigénica podría explicarse por ser *C. difficile* una bacteria exigente, difícil de cultivar como lo refleja el nombre de la especie, que puede haber muerto por exposición al oxígeno, o bien, que fue inhibida por la presencia de otras bacterias

de la hora normal.

En 3 (7.7%) de las muestras analizadas se aisló tanto *C. difficile* como *C. perfringens*, lo que correlaciona con los hallazgos hechos por Vaishnavi y colaboradores (9), quienes afirman que estas bacterias en algunos casos pueden actuar sinérgicamente para producir la diarrea asociada a antibióticos. En nuestro caso, se logró demostrar la toxina de *C. difficile* en dos de las tres muestras.

Con respecto a la sensibilidad a antibióticos, se puede notar que existe una resistencia elevada de las cepas de *C. difficile* a la cefoxitina (ninguna cepa sensible), datos esperados, pues es uno de los antibióticos que tiene el agar CCFA que se utilizó para su aislamiento; además, concuerdan con los encontrados por otros autores (28-29). Los hallazgos referentes a la penicilina G (sólo uno de los aislamientos sensible), son concordantes con los trabajos de Tyrrell y colaboradores (30), quienes señalan que son necesarias dosis altas de penicilina para que este antibiótico sea efectivo contra *C. difficile*. Por otra parte, la resistencia a clindamicina, cloranfenicol e imipenem ya ha sido informada previamente (30-31). Aunque el número de aislamientos es bajo para sacar conclusiones definitivas, los datos que se presentan deben tomarse en cuenta en futuras investigaciones con un mayor número de cepas, para evaluar si procede o no un nuevo planteamiento de la terapia antimicrobiana de elección en estos casos.

En este estudio, sin embargo, ninguno de los pacientes se encontraba recibiendo ni clindamicina ni imipenem, sino que la terapia estuvo basada en uno o más de los siguientes antibióticos: oxacilina, cefotaxime, ampicilina, gentamicina, vancomicina y anfotericina. Debido a que el tratamiento de los pacientes no fue el mismo para todos, ni tuvo la misma duración y a que el número de muestras es bajo, no es posible establecer una relación entre las drogas suministradas y el hallazgo de *C. perfringens* o *C. difficile*.

En resumen, en el presente estudio se determinó que al menos el 23.1% de las diarreas nosocomiales analizadas fueron causadas por

MA Ruiz-Corella, P Altamirano-Silva, E Rodríguez-Cavallini, MM Gamboa-Coronado

alguno de los dos agentes estudiados, que por ser patógenos anaerobios, no son considerados rutinariamente en los hospitales costarricenses. De allí la importancia de implementar en los hospitales técnicas rápidas para la detección no solo de la toxina A de *C. difficile*, sino de la enterotoxina de *C. perfringens*, ya que su detección podría disminuir el número de casos en el que se desconoce el agente causal de la diarrea y, en el caso de *C. difficile*, se puede abordar al paciente con un tratamiento específico que pueda mejorar su condición.

Aunque con frecuencia las diarreas de moderada intensidad asociadas a antibióticos se resuelven al eliminar la terapia antimicrobiana, el conocimiento del perfil de susceptibilidad de *C. perfringens* y *C. difficile* que se deriva de esta investigación es importante y debe ser tomado en cuenta para poder brindar un tratamiento adecuado o cambiar los que no sean efectivos en casos de diarrea severa. Además, este conocimiento contribuye a conocer el perfil de susceptibilidad antimicrobiana de bacterias anaerobias en un hospital costarricense de niños, hallazgos que pueden ser de utilidad en futuros estudios epidemiológicos. Es necesario que se amplíen estos estudios, con una mayor cantidad de aislamientos, con el fin de corroborar los hallazgos de esta investigación.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Marco Luis Herrera por facilitar las muestras de heces, al señor Pablo Vargas por su ayuda técnica y a la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica por el soporte económico (Proyecto 803-A5-027).

REFERENCIAS

1. **Uppal B, Wadhwa V, Mittal S.** Nosocomial Diarrhea. *Indian J Pediatr* 2004; 71:883-5.
2. **Oldfield III EC.** *Clostridium difficile*-Associated Diarrhea: Risk Factors, Diagnostic Methods and Treatment. *Rev Gastroenterol Disord* 2004; 4:186-195.
3. **Safdar N, Maki DG.** The Commonality of Risk Factors for Nosocomial Colonization and Infection with Antimicrobial-Resistant *Staphylococcus aureus*, Enterococcus, Gram-Negative Bacilli, *Clostridium difficile*, and *Candida*. *Ann Intern Med* 2002; 136: 834-844.
4. **Turgeon DK, Novicki TJ, Quick J, Carlson L, Millar P, Ulnes B, et al.** Six Rapids Tests for Direct Detection of *Clostridium difficile* and Its Toxins in Fecal Sample Compared with the Fibroblast Cytotoxicity Assay. *J Clin Microbiol* 2003; 41:667-670.
5. **Bélanger SD, Boissinot M, Clairoux N, Picard FJ, Bergeron MG.** Rapid Detection of *Clostridium difficile* in Feces by Real-Time PCR. *J Clin Microbiol* 2003; 41:730-4.
6. **Plummer S, Weaver MA, Harris JC, Dee P, Hunter J.** *Clostridium difficile* pilot study: effects of probiotic supplementation on the incidence of *C. difficile* diarrhoea. *Int Microbiol* 2004; 7:59-62.
7. **Wilkins TD, Lyerly DM.** *Clostridium difficile* Testing: after 20 Years, Still Challenging. *J Clin Microbiol* 2003; 41:531-4.
8. **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; 42:3837-40.
9. **Vaishnavi C, Kaur S, Singh K.** *Clostridium perfringens* type A & antibiotic associated diarrhoea. *Ind J Med Res* 2005; 122:52-6.
10. **Zumbado R.** Impacto de *C. difficile* como agente de diarrea nosocomial en un Hospital de Costa Rica. Trabajo de graduación Lic Microbiol Quím Clín. Universidad de Costa Rica, San José, CR 2005; 5-40.
11. **Espinoza C, Camacho N.** *Clostridium perfringens*: detección y susceptibilidad antimicrobiana en diarreas nosocomiales en el Hospital San Juan de Dios. Trabajo de graduación Lic Microbiol Quím Clín. Universidad de Costa Rica, San José, CR 2005; 25-32.
12. **Rodríguez E, Gamboa MM, Vargas P.** *Clostridium perfringens* en carnes crudas y cocidas y su relación con el ambiente en Costa Rica. *Arch Latinoamer Nutr* 2002; 52:155-9.
13. **Brazier JS, Borrelío S.** Microbiology, Epidemiology and Diagnosis of *Clostridium difficile* Infection. En: Aktories K, Wilkins TC, editores. *Clostridium difficile*. Germany: Springer; 2000. pp. 1-33.
14. **Pituch H, van den Braak N, van Belkum A, Van Leeuwen W, Obuch-Woszczatynski P, Luczak M, et al.** Characterization of *Clostridium perfringens* strains isolated from Polish patients with suspected antibiotic-associated diarrhea. *Med Sci Monit* 2002; 8:85-8.
15. **Brett MM, Rodhouse JC, Donovan TJ, Tebbutt GM, Hutchinson DN.** Detection of *Clostridium perfringens* and its enterotoxin in cases of sporadic

Clostridium perfringens y *C. difficile* en diarrea de niños

- diarrhoea. J Clin Pathol 1992; 45:609-11.
16. **Modi N, Wilcox MH.** Evidence for antibiotic induced *Clostridium perfringens* diarrhoea. J Clin Pathol 2001; 54:748-51.
 17. **Carney T, Perry JD, Ford M, Majumdar S, Gould FK.** Evidence for antibiotic induced *Clostridium perfringens* diarrhoea [carta]. J Clin Pathol 2002; 55: 239-40.
 18. **Garcia-Alvarado JS, Labbé RG, Rodriguez MA.** Sporulation and Enterotoxin Production by *Clostridium perfringens* Type A at 37 and 43°C. Appl Environ Microbiol 1992; 58:1411-4.
 19. **Asha NJ, Wilcox MH.** Laboratory diagnosis of *Clostridium perfringens* antibiotic-associated diarrhoea. J Med Microbiol 2002; 51:891-4.
 20. **Samuel SC, Hancock P, Leigh DA.** An investigation into *Clostridium perfringens* enterotoxin-associated diarrhoea. J Hosp Infect 1991; 18:219-30.
 21. **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; 11:93-5.
 22. **Finegold SM, St. John S, Vu AW, Li CM, Molitoris D, Song Y, et al.** In vitro activity of ramoplanin and comparator drugs against anaerobic intestinal bacteria from the prospective of potential utility in pathology involving bowel flora. Anaerobe 2004; 10:205-11.
 23. **Goldstein EJC, Citron DM, Merriam CV, Warren YA, Tyrrell KL, Fernandez HT.** In Vitro Activities of Daptomycin, Vancomycin, Quinupristin-Dalfopristin, Linezolid, and Five Other Antimicrobials against 307 Gram-Positive Anaerobic and 31 *Corynebacterium* Clinical Isolates. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47:337-41.
 24. **Wexler HM, Molitoris E, Reeves D, Finegold SM.** In Vitro Activity of DU-6859a against Anaerobic Bacteria. Antimicrob Agents Chemother 1994; 38:2504-9.
 25. **Wexler HM, Molitoris D, Finegold SM.** In Vitro Activities of MK-826 (L-749,345) against 363 Strains of Anaerobic Bacteria. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44:2222-4.
 26. **Gogate A, De A, Nanivadekar R, Mathur M, Saraswathi K, Jog A, et al.** Diagnostic role of stool culture & toxin detection in antibiotic associated diarrhoea due to *Clostridium difficile* in children. Indian J Med Res 2005; 122:518-24.
 27. **Aboudola S, Kotloff KL, Kyne L, Warny M, Kelly EC, Sougioultzis S, et al.** *Clostridium difficile* Vaccine and Serum Immunoglobulin G Antibody Response to Toxin A. Infect Immun 2003; 71:1608-10.
 28. **Chow AW, Cheng N, Bartlett KH.** In Vitro Susceptibility of *Clostridium difficile* to New β -lactam and Quinolone Antibiotics. Antimicrob Agents Chemother 1985; 28:842-4.
 29. **Drummond LJ, McCoubrey J, Smith DGE, Starr JM, Poxton IR.** Changes in sensitivity patterns to selected antibiotics in *Clostridium difficile* in geriatric in-patients over an 18-month period. J Med Microbiol 2003; 52:259-63.
 30. **Tyrrell KL, Citron DM, Warren YA, Fernandez HT, Meriam CV, Goldstein EJC.** In vitro Activities of Daptomycin, Vancomycin, and Penicillin against *Clostridium difficile*, *C. perfringens*, *Finegoldia magna*, and *Propionibacterium acnes*. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50:2728-31.
 31. **Ackermann G, Degner A, Cohen SH, Silva J Jr, Rodloff AC.** Prevalence and association of macrolide-lincosamide-streptogramin B (MLS_B) resistance with resistance to moxi oxacin in *Clostridium difficile*. J Antimicrob Chemother 2003; 51:599-603.