

Recentes mudanças da infecção por *Clostridium difficile*

Recent changes in *Clostridium difficile* infection

Moacyr Silva Júnior¹

RESUMO

Clostridium difficile é a principal causa de diarreia hospitalar. A diarreia por *C. difficile* aumentou sua incidência e sua morbiletalidade nos últimos anos. Os principais fatores de risco relacionados são uso de antibióticos, idosos e permanência hospitalar prolongada. Muitos pacientes recebem combinação de antibióticos ou múltiplos antibióticos, constituindo-se, assim, o principal fator de risco para o desenvolvimento de infecção ou de recorrência de diarreia associada ao *C. difficile*. Por isso, intervenções que otimizem a prescrição de antibióticos associado à aderência de medidas de controle de infecção podem reduzir aquisição dessa infecção. Assim, esta revisão aborda a mudança da epidemiologia da infecção por *C. difficile* e seu tratamento.

Descritores: *Clostridium difficile*; Diarreia/quimioterapia; Antibacterianos/uso terapêutico; Fatores de risco

ABSTRACT

Clostridium difficile is the main cause of nosocomial diarrhea. Diarrhea associated with *C. difficile* has increased incidence, morbidity, and mortality in the last few years. The major related risk factors include use of antibiotics, elderly patients and prolonged hospital stay. Many patients receive combinations of antibiotics or multiple antibiotics, which represents the main risk to develop diarrhea associated to *C. difficile* or its recurrence. Therefore, interventions to improve antibiotic prescribing, as well as compliance with infection control measures can reduce hospital-acquired *C. difficile* infections. This review addresses the epidemiological changes in *C. difficile* disease and its treatment.

Keywords: *Clostridium difficile*; Diarrhea/drug therapy; Anti-bacterial agents/therapeutic use; Risk factors

INTRODUÇÃO

Clostridium difficile (CD) foi descrito pela primeira vez em 1935⁽¹⁾. Trata-se de uma bactéria Gram-positiva que forma esporos, apresentando dificuldade de crescimen-

to em meios de cultura tradicionais e sendo, por tal motivo, denominada *difficile*⁽²⁾.

É a principal causa de diarreia no ambiente hospitalar. O custo que lhe é atribuído nos Estados Unidos varia entre US\$ 2.470,00 e US\$ 3.669 por episódio^(3,4). O número de casos de CD aumentou nos últimos anos pelo uso indiscriminado da antibioticoterapia, maior número de imunossuprimidos, de idosos e alto índice de ocupação dos hospitais, favorecendo a disseminação dos esporos no ambiente hospitalar⁽⁵⁾.

O principal fator de risco associado a CD é o uso de antibioticoterapia prévia. Inicialmente, atribui-se ao uso de clindamicina⁽²⁾. Atualmente, todos os antibióticos estão relacionados ao desenvolvimento do CD⁽²⁾. Graves surtos foram registrados a partir de 2000 nos Estados Unidos, Canadá e Reino Unido, com mortalidade elevada que variava entre 6,9 a 16,7%⁽⁶⁾.

A mudança da epidemiologia ocorreu pelo surgimento de uma nova cepa de CD no início de 2000^(5,7,8). No primeiro semestre de 2004, Loo et al. analisaram 12 hospitais no Quebec, Canadá, e verificaram incidência de 22,5 casos por 100.000 admissões hospitalares⁽⁷⁾. Casos semelhantes em outros hospitais canadenses e americanos caracterizaram-se pelo desenvolvimento da colite pseudomembranosa e colite fulminante, com maior número de recidivas^(9,10).

Essa nova cepa apresenta maior virulência com produção de uma toxina binária caracterizada pelo gene NAP1/BI/027, que produz 16 vezes toxina A e 23 vezes toxina B quando se compara às cepas tradicionais⁽³⁾. Também, essa cepa é resistente a gatifloxacina e moxifloxacina⁽³⁾.

Outra mudança são surtos de CD na comunidade em pacientes sem fatores de risco conhecidos, como, por exemplo, em gestantes, puérperas e crianças, que desenvolvem quadros graves com alta morbiletalidade⁽¹¹⁾.

¹ Unidade de Terapia Intensiva, Hospital Israelita Albert Einstein – HIAE, São Paulo (SP), Brasil.

Autor correspondente: Moacyr Silva Junior – Avenida Albert Einstein, 627/701, consultório 108, bloco A1 – Jardim Leonor – CEP: 05651-901 – São Paulo (SP), Brasil – Tel.: (11) 2151-1520 –

E-mail: moacyrsj@einstein.br

Data de submissão: 20/6/2011 – Data de aceite: 23/1/2012

Fatores de risco

Os principais fatores de risco associados ao CD são idade maior do que 65 anos, uso de laxativo, inibidores de bomba de prótons ou histamina H2 como protetor gástrico, quimioterápicos, insuficiência renal, cirurgia gastrointestinal, intubação nasogástrica, ventilação mecânica, permanência hospitalar prolongada e antibioterapia prévia^(10,12).

Grande parte desses fatores são encontrados nos pacientes de Unidades de Terapia Intensiva (UTI), com terreno propício para maior incidência e disseminação hospitalar⁽¹³⁾.

Historicamente, clindamicina, cefalosporinas e penicilinas são os antibióticos associados com CDAD⁽¹⁴⁾. Recentemente, fluorquinolonas são implicados nessa infecção⁽¹⁵⁾.

Especificamente o uso de inibidores de bomba de prótons e de histamina H2 aumentam o pH gástrico, favorecendo a colonização e a proliferação bacteriana na luz intestinal⁽¹⁶⁾. Assim, o uso desses agentes associado à antibioterapia potencializa o risco para o desenvolvimento do CD⁽⁶⁾.

Fisiopatologia

A transmissão do CD ocorre via fecal-oral, pessoa-pessoa, fômites e de instrumentos do mobiliário hospitalar⁽⁶⁾. Os esporos persistem no ambiente por períodos prolongados e resistem ao uso de desinfetantes comerciais, favorecendo a propagação no ambiente hospitalar⁽¹⁴⁾.

Os esporos sobrevivem na acidez gástrica, germinam no cólon e aí iniciam a produção de toxinas⁽¹⁶⁾. A colonização e a ligação à mucosa intestinal do CD é facilitada pelo uso da antibioterapia com alteração do equilíbrio da microbiota intestinal^(12,16). A produção da toxina A e B estimula a produção de fator de necrose tumoral, interleucinas e aumento da permeabilidade vascular⁽⁶⁾. A toxina A é responsável pela ativação e recrutamento dos mediadores inflamatórios e a toxina B tem efeito citotóxico direto⁽⁶⁾.

O intenso processo inflamatório resulta na destruição da lâmina própria intestinal, impedindo a absorção de nutrientes, e levando a quadro disabsortivo e translocação bacteriana⁽⁶⁾.

Pacientes assintomáticos

O único reservatório natural do CD é o homem⁽¹⁶⁾. Muitos pacientes são colonizados por CD e não apresentam sintomas⁽¹⁶⁾. Pacientes assintomáticos podem apresentar toxina positiva para CD em exames de fezes⁽¹⁷⁾. A incidência na população geral é de cerca de 4% e nos pacientes hospitalizados em até 20%⁽¹⁶⁾. Quanto maior

o tempo de internação hospitalar, maior é o risco de colonização por CD^(16,18).

Esses indivíduos servem como reservatório para transmissão aos suscetíveis e permanecem assintomáticos porque há um equilíbrio entre a microbiota normal e o CD⁽¹⁹⁾. O gatilho para o crescimento de CD é a liberação das toxinas e o uso de antibióticos⁽¹⁹⁾.

Nos indivíduos colonizados pelo CD, a resposta humoral específica é rápida, e o nível de anticorpos IgG específica para toxinas é maior em comparação aos pacientes não colonizados⁽¹⁹⁾.

Não há benefício no tratamento desses indivíduos, pois, após algumas semanas do tratamento para CD, há recolonização em quase todos os pacientes⁽²⁰⁾.

Diagnóstico clínico

Os sintomas clínicos geralmente aparecem alguns dias após o início da antibioterapia, podendo ocorrer em até 2 meses após sua suspensão⁽⁶⁾. O exato período de incubação não é estabelecido⁽⁶⁾. McFee et al. verificaram que o tempo médio para início da infecção CD após a alta é de 20,3 dias⁽⁶⁾.

A definição de diarreia no ambiente hospitalar é muito importante. Geralmente, define-se como diarreia o número de evacuações igual ou maior a 2 episódios em 1 dia⁽¹⁷⁾. Os sintomas de infecção do CD são amplos, incluindo desde quadros leves, com alguns episódios de diarreia sem febre, até quadros graves, com toxemia importante⁽¹⁷⁾.

O quadro típico é de diarreia aquosa com vários episódios durante o dia, que melhora após evacuação, febre baixa e leucocitose⁽¹⁷⁾. As complicações incluem hipoalbuminemia, desidratação e desnutrição⁽¹⁷⁾. Os casos mais graves coincidem com diminuição da diarreia pela atonia e afilamento da mucosa intestinal, caracterizado pelo megacólon tóxico, que pode evoluir para perfuração⁽¹⁷⁾.

Diagnóstico laboratorial

A coprocultura é o padrão-ouro para diagnóstico com sensibilidade em torno de 100% mas não é usado por seu alto custo, por ser um exame trabalhoso e pela demora de seu resultado (em média 48 horas)⁽²¹⁾. O falso-positivo ocorre em 10% dos casos, incluindo nessa porcentagem os portadores assintomáticos⁽⁹⁾.

A pesquisa na produção da toxina em coprocultura tem menor sensibilidade que a coprocultura tradicional, com sensibilidade de 70%⁽⁹⁾.

Os métodos laboratoriais mais utilizados são os imunoenzimáticos, com resultado em até 2 horas. No

entanto, dependendo da metodologia do teste, a sensibilidade pode variar entre 50 a 99%, e a especificidade de 70 a 100%⁽⁹⁾.

Outro método que apresenta alta sensibilidade e especificidade é a reação de cadeia de polimerase, cuja sensibilidade é maior do que 90% e especificidade de 100%. A comparação entre os métodos laboratoriais está na tabela 1⁽⁹⁾.

A colonoscopia é indicada na colite quando a pesquisa nas fezes da toxina é negativa e há necessidade do diagnóstico rápido⁽¹⁵⁾. Ela avalia todo o cólon, entretanto, pode apresentar como complicação a perfuração colônica.

A radiografia de abdômen é inespecífica; a tomografia de abdômen auxilia na determinação da extensão da lesão nos casos mais avançados e avalia pneumopertônio e perfuração colônica⁽¹⁵⁾.

Critério de cura

O critério de cura baseia-se na cessação dos sinais e sintomas^(13,14). Nenhum método laboratorial disponível deve ser utilizado para avaliação de seguimento, pois eles podem permanecer positivos por semanas ou meses, sem necessariamente traduzir como recidiva da doença⁽¹³⁾.

Tratamento

Se possível, deve-se suspender a antibioticoterapia sistêmica nos pacientes com infecção por CD⁽²²⁾. Mullaney et al. analisaram os pacientes em uso de antibiótico sistêmico que evoluíram com infecção por CD e concluíram que em casos em que a antibioticoterapia foi suspensa, em comparação ao grupo em que ela foi mantida, houve maior taxa de cura e menor recidiva⁽²²⁾. Gould et al. também verificaram que a recidiva foi de 41% nos pacientes em uso de antibioticoterapia sistêmica em vigência do tratamento para infecção por CD⁽²⁰⁾.

Os dois principais antibióticos utilizados para tratamento de infecção por CD são o metronidazol e a vancomicina⁽²¹⁾. A vantagem da primeira é seu baixo custo,

sua boa disponibilidade e seus poucos efeitos colaterais⁽²³⁾. No entanto, observam-se casos de falência com recidiva em 28% dos casos, principalmente pela cepa NAP1/BI/027⁽²³⁾. Os principais fatores associados à recidiva são pacientes com *diabete mellitus*, sepse e cirurgia prévia⁽²³⁾.

A vancomicina não é mais considerada terapia de primeira escolha para tratamento de CD, pois apresenta a mesma eficácia que o metronidazol. Há risco, durante a terapia, de surgimento de *Enterococcus* spp resistente à vancomicina⁽¹⁸⁾. É indicada nos pacientes com quadros graves ou em pacientes que apresentam recidiva⁽¹⁸⁾. O principal tratamento posposto para infecção por CD é descrito no quadro 1.

Quadro 1. Tratamento antimicrobiano para infecção por *Clostridium difficile* baseado na gravidade⁽⁶⁾

Classificação por gravidade	Tratamento
Diarreia leve ou moderada, leucocitose < 15.000/ μ l	Metronidazol 500 mg via oral 3 vezes por dia, por 10 a 14 dias
Grave (febre, diarreia intensa, dor abdominal, leucocitose > 150.00/ μ l, creatina aumentada)	Vancomicina 125 a 250 mg via oral 4 vezes por dia, por 10 a 14 dias
(Hipotensão, choque, megacólon tóxico, ileo paralítico)	Vancomicina 500 mg por via nasointestinal e/ou por enema 4 vezes por dia, com ou sem metronidazol, 500 mg endovenoso a cada 8 horas

Zar et al. verificaram em seu estudo que os pacientes que tiveram infecção leve por CD apresentaram a mesma taxa de cura quando foi comparada ao tratamento com metronidazol ou vancomicina⁽²⁴⁾. Nos pacientes com CD complicada, a taxa de cura com metronidazol foi de 76% e da vancomicina de 97%⁽²⁴⁾. Além disso, a taxa de recidiva foi maior nos pacientes que usaram metronidazol⁽²⁴⁾.

A cirurgia com colectomia total está indicada em raros casos quando há colite grave com presença de quadro toxêmico importante. A terapia adjuvante é o enema de vancomicina 500 mg dissolvido em 100 mL de soro fisiológico e/ou metronidazol endovenoso^(17,25). A mortalidade pode chegar a 60% dos pacientes⁽²⁵⁾.

Tabela 1. Comparação entre diversos métodos laboratoriais para diagnóstico de infecção por *Clostridium difficile* em fezes⁽⁹⁾

Teste	Sensibilidade (IC 95%)	Especificidade (IC 95%)	Valor preditivo positivo (IC 95%)	Valor preditivo negativo (IC 95%)
Imunoenzimático	86,7 (68,4-95,6)	98,5 (95,3-99,6)	89,7 (71,5-97,3)	98 (94,6-99,4)
RCP	100 (85,9-100)	96,5 (92,6-98,4)	81,1 (64,3-91,4)	100 (97,6-100)
Citotoxicidade	90 (72,3-97,4)	97 (93,2-96,8)	81,8 (63,9-92,4)	98,5 (95,2-99,6)
Coprocultura	100 (85,9-100)	92,9 (88,2-95,9)	68,2 (52,3-80,9)	100 (97,5-100)

IC: intervalo de confiança; RCP: reação de cadeia de polimerase.

Outros tratamentos

Fidaxomicina

Fidaxomicina (OPT-80) é um antibiótico mais ativo *in vitro* do que a vancomicina, inclusive para tratamento das cepas NAP1/BI/027⁽²²⁾. A dose preconizada é de 200 mg/dia a cada 12 horas, por 10 dias⁽²²⁾. Apresenta mínima absorção intestinal, alta concentração fecal e não altera a microbiota intestinal⁽²²⁾. A taxa de resposta é semelhante a vancomicina com menor recidiva em cepas que não eram NAP1/BI/027 (16,9 *versus* 29,2%);⁽²²⁾.

Rifaximina

É derivada da rifamicina, com atividade contra *Gram*-negativo, *Gram*-positivo e anaeróbio⁽¹⁸⁾. Não tem absorção intestinal, apresenta alta concentração no cólon, alta atividade contra CD e tem menor índice de recidiva⁽¹⁸⁾. A dose preconizada é 400 mg, 3 vezes ao dia, por 10 dias⁽¹⁸⁾.

Nitazoxanida

A nitazoxanida é um antiparasitário que *in vitro*, inibidora de cepas de CD⁽²⁶⁾. Freeman et al. verificaram *in vitro* que cepas de CD que apresentaram menor suscetibilidade ao metronidazol eram sensíveis a nitazoxanida⁽²⁷⁾. Estudos verificaram que a nitazoxanida teve a mesma eficácia que o metronidazol no tratamento de pacientes com CD^(17,26). A dose preconizada é de 500 mg, 2 vezes ao dia, por 10 dias⁽¹⁷⁾.

Imunoterapia

Há relatos de casos segundo os quais o uso de imunoglobulina endovenosa inespecífica para episódios de recidiva tem benefício, mas há poucos dados na literatura⁽¹⁴⁾.

Probióticos

Probióticos são encontrados em leites fermentados, iogurtes, pós e cápsulas como *lactobacillus*, bifidobactéria e *Saccharomyces boulardii*⁽¹⁹⁾. Atuam inibindo a adesão bacteriana na mucosa intestinal⁽¹⁹⁾. A eficácia desse agente para prevenção é controversa, pois os estudos são heterogêneos⁽¹⁹⁾. Ainda é inconclusivo se eles teriam efeito na prevenção ou poderiam ser utilizados como terapia adjuvante na primo-infecção ou nos episódios de recidiva⁽¹⁹⁾.

RECIDIVA

A recidiva ocorre mais comumente na primeira ou na segunda semana após o término do tratamento⁽⁶⁾. Cerca de 25% dos pacientes podem apresentar recidiva, mesmo após o tratamento com vancomicina⁽⁶⁾. Se o paciente apresenta mais do que duas recidivas, o risco de novo episódio aumenta para 50 a 65%⁽⁶⁾.

A recidiva ocorre devido à permanência dos esporos na luz intestinal e pela inabilidade do sistema imune em erradicar o agente^(6,16).

Pacientes tratados com metronidazol têm maior recorrência do que os pacientes tratados com vancomicina (21,2 *versus* 16,7%, respectivamente)^(15,16). Dessa forma, nos casos de recidiva, pode-se instituir a mesma terapêutica ou dar preferência à vancomicina⁽¹⁶⁾.

Os principais fatores de risco para recidiva são pacientes idosos, renais crônicos, episódios prévios de CD, leucocitose ($\geq 15 \times 10^9/\mu\text{L}$) e uso de antibioterapia sistêmica concomitante com a terapia para CD⁽¹⁶⁾.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A infecção pelo CD é uma das principais complicações relacionadas aos cuidados de saúde e está intrinsecamente relacionada ao consumo de antibióticos. Tem facilidade de disseminação no ambiente hospitalar pela formação de esporos. Infelizmente, pacientes idosos têm maior chance de desenvolver a doença, com pior prognóstico e maior chance de recidiva. O diagnóstico baseia-se no quadro diarreico com toxina positiva em exame de fezes. O metronidazol é a principal droga para o tratamento dessa infecção. Novas drogas, com maior eficácia e menor taxa de recidiva, também são lançadas.

REFERÊNCIAS

1. Venuto C, Butler M, Ashley ED, Brown J. Alternative therapies for Clostridium difficile infections. *Pharmacotherap*. 2011;30(12):1266-78.
2. Hookman P, Barkin JS. Clostridium difficile associated infection, diarrhea and colitis. *World J Gastroenterol*. 2009;15(13):1554-80.
3. McDonald LC, Killgore GE, Thompson A, Owens RC Jr, Kazakova SV, Sambol SP, et al. An epidemic, toxic gene-variant strain of Clostridium difficile. *N Engl J Med*. 2005;353(23):2433-41.
4. Dubberke ER, Gerding DN, Classen D, Arias KM, Podgorny K, Anderson DJ, et al. Strategies to prevent clostridium difficile infections in acute care hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2008;29 Suppl 1:S81-92.
5. Pepin J, Valiquette L, Cossette B. Mortality attributable to nosocomial Clostridium difficile-associated disease during an epidemic caused by a hypervirulent strain in Quebec. *CMAJ*. 2005;173(9):1037-42.
6. McFree RB, Abdelsayed GG. Clostridium difficile. *Dis Mon*. 2009;55(7):439-70.
7. Loo VG, Poirier L, Miller MA, Oughton M, Libman MD, Michaud S, et al. A predominantly clonal multi-institutional outbreak of Clostridium difficile-associated diarrhea with high morbidity and mortality. *N Engl J Med*. 2005;353(23):2442-9.
8. Pepin J, Valiquette L, Alary ME, Villemure P, Pelletier A, Forget K, et al. Clostridium difficile-associated diarrhea in a region of Quebec from 1911 to 2003: a changing pattern of disease severity. *CMAJ*. 2004;171(5):466-72.
9. Peterson LR, Manson RU, Paule SM, Hacek DM, Robicsek A, Thomson RB Jr, et al. Detection of toxigenic Clostridium difficile in stool samples by real-time polymerase chain reaction for the diagnosis of C. difficile-associated diarrhea. *Clin Infect Dis*. 2007;45(9):1152-60.
10. Zilberberg MD, Nathanson BH, Sadigov S, Higgins TL, Kollef MH, Shorr AF. Epidemiology and outcomes of clostridium difficile-associated disease among

- patients on prolonged acute mechanical ventilation. *Chest*. 2009;136(3):752-8.
11. Henrich TJ, Krakower D, Bitton A, Yokoe DS. Clinical risk factors for severe *Clostridium difficile*-associated disease. *Emerg Infect Dis*. 2009;15(3):415-22.
 12. Blondeau JM. What have we learned about antimicrobial use and the risks for *Clostridium difficile*-associated diarrhoea? *J Antimicrob Chemother*. 2009;63(2):238-42.
 13. Cohen SH, Gerding DN, Johnson S, Kelly CP, Loo VG, McDonald LC, Pepin J, Wilcox MH; Society for Healthcare Epidemiology of America; Infectious Diseases Society of America. 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(5):431-5.
 14. Kelly CP, LaMont JT. *Clostridium difficile*-more *difficile* than ever. *N Engl J Med*. 2008;359(18):1932-40.
 15. Efron PA, Mazuski JE. *Clostridium difficile* colitis. *Surg Clin North Am*. 2009;89(2):483-500, x.
 16. Kim JW, Lee KL, Jeong JB, Kim BG, Shin S, Kim JS, et al. Proton pump inhibitors as a risk factor for recurrence of *Clostridium-difficile*-associated diarrhea. *World J Gastroenterol*. 2010;16(28):3573-7.
 17. Trinn C, Prabhakar K. Diarrheal diseases in the elderly. *Clin Geriatr Med*. 2007;23(4):833-56, vii.
 18. Rubin DT, Sohi S, Glathar M, Thomas T, Yadron N, Surma BL. Rifaximin is effective for the treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea: results of an open-label pilot study. *Gastroenterol Res Pract*. 2001:106978.
 19. Parkes GC, Sanderson JD, Whelan K. The mechanisms and efficacy of probiotics in the prevention of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea. *Lancet Infect Dis*. 2009;9(4):237-44.
 20. Gould CV, McDonald LC. Bench-to-bedside review: *Clostridium difficile* colitis. *Crit Care*. 2008;12(1):203.
 21. Musher DM, Aslam S. Treatment of *clostridium difficile* colitis in the critical care setting. *Crit Care Clin*. 2008;24(2):279-91, viii.
 22. Mullane KM, Miller MA, Weiss K, Lentner A, Golan Y, Sears PS, et al. Efficacy of fidaxomicin versus vancomycin as therapy for *Clostridium difficile* infection in individuals taking concomitant antibiotics for other concurrent infections. *Clin Infect Dis*. 2011;53(5):440-7.
 23. Jung KS, Park JJ, Chon YE, Jung ES, Lee HJ, Jang HW, et al. Risk Factors for treatment failure and recurrence after metronidazole treatment for *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Gut Liver*. 2011;4(3):332-7.
 24. Zar FA, Bakkanagari SR, Moorthi KM, Davis MB. A comparison of vancomycin and metronidazole for the treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea, stratified by disease severity. *Clin Infect Dis*. 2007;45(3):302-7.
 25. Roupael NG, O'Donnell JA, Bhatnagar J, Lewis F, Polgreen PM, Beekmann S, et al. *Clostridium difficile*-associated diarrhea: an emerging threat to pregnant women. *Am J Obstet Gynecol*. 2008;198(6):635 e 631-6.
 26. Musher DM, Logan N, Hamil RJ, Dupont HL, Lentnek A, Gupta A, et al. Nitazoxanide for the treatment of *Clostridium difficile* colitis. *Clin Infect Dis*. 2006;43(4):421-7.
 27. Freeman J, Baines SD, Todhunter SL, Huscroft GS, Wilcox MH. Nitazoxanide is active against *Clostridium difficile* strains with reduced susceptibility to metronidazole. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66(6):1407-18.