



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## **ESPECIALIZACIÓN EN MEDICINA INTERNA**

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

**CONCORDANCIA ENTRE UNA PRUEBA DE INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO PARA LA DETECCIÓN DE TOXINA A Y B (MINI VIDAS) Y UNA PRUEBA DE AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS (XPRT C. *DIFFICILE*/EPI) PARA EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDAD ASOCIADA A *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* EN UN HOSPITAL DE TERCER NIVEL**

TESIS DE POSGRADO QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**ESPECIALISTA EN MEDICINA INTERNA**

**PRESENTA:**

**Dra. Nayelli Cointa Flores García**

**TUTORA DE TESIS:**

Dra. Miriam Bobadilla Del Valle

Laboratorio de Microbiología Clínica  
Instituto Nacional De Ciencias Médicas Y Nutrición Salvador Zubirán

**ASESORES:**

Dr. Pedro Torres González

Dr. José Sifuentes Osornio

Laboratorio De Microbiología Clínica  
Instituto Nacional De Ciencias Médicas Y Nutrición Salvador Zubirán

**México D.F.**

**Noviembre 2013**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Dr. Sergio Ponce de León Rosales**

Director de Enseñanza

Instituto Nacional De Ciencias Médicas Y Nutrición Salvador Zubirán

**Dra. Miriam Bobadilla del Valle**

Tutora de tesis

Instituto Nacional De Ciencias Médicas Y Nutrición Salvador Zubirán

**Dr. Alfonso Gullías Herrero**

Profesor Titular del Curso de Medicina Interna

Instituto Nacional De Ciencias Médicas Y Nutrición Salvador Zubirán

## **AGRADECIMIENTOS**

Gracias a mis padres y a mis hermanos por su apoyo incondicional, por su amor irremplazable; y por ser el más fuerte sustento de mi existencia.

Un agradecimiento especial para el Dr. José Sifuentes, el Dr. Pedro Torres y para la Dra. Miriam Bobadilla, por sus enseñanzas, por su tiempo y porque sin su valiosa contribución, este trabajo no hubiera sido posible.

También deseo agradecer a mis amigos, que están conmigo para reír, pero también para darme ánimo en los momentos difíciles.

Finalmente, quiero expresar un agradecimiento sumamente importante, que va dirigido al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, porque durante los últimos años, ha sido mi mayor inspiración para intentar ser una buena médica internista, pero sobre todo, para ser una mejor persona.

<b>ÍNDICE</b>	<b>Pág.</b>
<b>I. MARCO TEÓRICO</b> .....	9
1. Antecedentes.....	9
2. Introducción.....	10
3. Patogénesis.....	10
4. Epidemiología.....	11
5. Factores de riesgo.....	12
6. Manifestaciones clínicas.....	14
7. Diagnóstico.....	16
<b>II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	20
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b> .....	20
<b>IV. HIPÓTESIS</b> .....	21
<b>V. OBJETIVO GENERAL</b> .....	22
<b>VI. OBJETIVOS SECUNDARIOS</b> .....	22
<b>VII. METODOLOGÍA</b> .....	22
1. Diseño del estudio .....	22
2. Población de estudio .....	23
3. Criterios de inclusión.....	23
4. Criterios de exclusión.....	23

5. Criterios de eliminación.....	23
6. Análisis estadístico.....	23
7. Estrategias de análisis estadístico.....	24
8. Metodología de laboratorio.....	24
9. Definiciones operacionales.....	29
<b>VIII. RESULTADOS.....</b>	<b>29</b>
1. Población estudiada.....	29
2. Características socio-demográficas de la población.....	30
3. Comorbilidades de la población y factores de riesgo conocidos para enfermedad por <i>C. difficile</i> .....	30
4. Manifestaciones clínicas de la población estudiada....	31
5. Factores asociados con la enfermedad asociada a <i>C. difficile</i> y con la positividad de las pruebas diagnósticas.....	31
6. Resultados de las tres pruebas diagnósticas Mini VIDAS AB, cultivo y Xpert <i>C. difficile</i> /Epi en relación con la sospecha diagnóstica.....	32
7. Concordancia entre las pruebas Mini VIDAS AB y Xpert <i>C. difficile</i> /Epi.....	32
8. Resultados de las pruebas diagnósticas Mini VIDAS AB, cultivo y Xpert <i>C. difficile</i> /Epi en relación con el diagnóstico de EACD y su asociación con comorbilidades y cuadro clínico.....	32

9. Comparación de los resultados de las pruebas diagnósticas Mini VIDAS AB, cultivo y Xpert <i>C. difficile</i> /Epi.....	33
10. Hallazgo de la cepa NAP1/BI/027.....	33
<b>IX. DISCUSIÓN.....</b>	<b>33</b>
<b>X. CONCLUSIONES.....</b>	<b>35</b>
<b>XI. CUADROS Y FIGURAS.....</b>	<b>37</b>
<b>XII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>47</b>

## RESUMEN

**Título:** Concordancia entre una prueba de inmunoensayo enzimático para la detección de toxina A y B (Mini VIDAS) y una prueba de amplificación de ácidos nucleicos (Xpert *C. difficile*/EPI) para el diagnóstico de enfermedad asociada a *Clostridium difficile* (EACD) en un hospital de tercer nivel.

**Introducción:** El *C. difficile* es la causa más común de diarrea asociada a cuidados de la salud. El incremento en la incidencia de enfermedad asociada a *C. difficile*, hace necesario que se realicen estudios que evalúen y comparen los diversos métodos de diagnóstico actuales.

**Objetivo:** Determinar la concordancia entre el inmunoensayo enzimático (Mini VIDAS) y la prueba Xpert *C. difficile*/Epi en el diagnóstico de la EACD.

**Material y métodos:** Diseño: Estudio observacional, comparativo y retrolectivo.

Población de estudio: Se analizaron 91 muestras de heces diarreicas que se recibieron de mayo a septiembre de 2012 en el laboratorio de microbiología clínica, a las cuales se les realizaron las pruebas de Mini VIDAS, cultivo y Xpert *C. difficile*/Epi.

Metodología: Se evaluó la concordancia entre las pruebas mediante la obtención de un coeficiente kappa. Para el análisis inferencial se realizó un modelo bivariado con de la prueba  $\chi^2$  de Pearson para variables dicotómicas.

**Resultados:** El uso de carbapenémicos estuvo presente en el 35% (6/91) de los pacientes que tuvieron EACD, (OR 0.021; IC 95% [0 – 3.4] p = 0.01). Se encontró una concordancia esperada de 72.8% e índice Kappa de 0.74.

**Conclusiones:** Existe una buena concordancia entre la prueba Xpert *C. difficile*/Epi y Mini VIDAS AB. Además de la diarrea, las dos principales manifestaciones clínicas asociadas con positividad en las pruebas de diagnóstico de EACD que se evaluaron en este estudio, fueron la fiebre y el dolor abdominal.

## ABSTRACT

**Title:** Concordance between an enzyme immunoassay for Tcda and TcdB (Mini VIDAS) and a nucleic acid amplification test (Xpert *C. difficile*/EPI) for the diagnosis of *Clostridium difficile* associated disease (CDAD) in a third level hospital.

**Background:** *C. difficile* is the most common cause of healthcare-associated diarrhea. Because of the increased incidence of the CDAD, it is necessary to have clinical trials that evaluate and compare the diagnostic test available.

### **Material and methods:**

**Objective:** To determine the concordance between the enzyme immunoassay Mini VIDAS AB and the test Xpert *C. difficile*/EPI for the diagnosis of CDAD.

**Design:** An observational, retrolective comparative study.

**Study group:** We analyze 91 diarrheic samples that were received at the Clinical Microbiology Lab between may to september 2012, we use Mini VIDAS, culture and Xpert *C. difficile*/Epi.

**Methods:** We evaluated the concordance between the test with the kappa coefficient. We used inferential statistics and Pearson's chi-squared test for the dichotomous variables.

**Results:** Data of 91 patients were analyzed. The use of carbapenems was 35% for the patients positive to CDAD (OR 0.021; IC 95% [ 0 – 3.4] p = 0.01). We found a Kappa coefficient of 0.74 between the Mini VIDAS AB and the Xpert *C. difficile*/EPI test for the diagnosis of CDAD.

### **Conclusions:**

There is a high level of concordance between the Mini VIDAS AB and the Xpert *C. difficile*/EPI test for the diagnosis of CDAD. Besides the diarrhea, the two main clinical manifestations related with positive test for the diagnosis of CDAD were fever and abdominal pain.

# CONCORDANCIA ENTRE UNA PRUEBA DE INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO PARA LA DETECCIÓN DE TOXINA A Y B (MINI VIDAS) Y UNA PRUEBA DE AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS (XPERT C. *DIFFICILE*/EPI) PARA EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDAD ASOCIADA A *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* EN UN HOSPITAL DE TERCER NIVEL.

## I. MARCO TEÓRICO

### 1. Antecedentes

El *Clostridium difficile* es la causa más común de la diarrea asociada a cuidados de la salud. *C. difficile* ocasiona de 25-30% de los casos de diarrea asociada al uso de antibióticos y la mayoría de los casos de colitis pseudomembranosa <sup>3</sup>. Con base en informes de hospitales canadienses llevados a cabo entre 1997 y 2005, las tasas de incidencia varían de 3.8 a 9.5 casos por cada 10, 000 paciente-días o 3.4 a 8.4 casos por cada 1,000 admisiones hospitalarias <sup>4</sup>.

Los pacientes que presentan diarrea después de hospitalización de tres o más días, deben ser evaluados para la detección de *C. difficile*, ya que dicho microorganismo continúa siendo una causa importante de morbilidad y mortalidad.

La incidencia y gravedad de la infección por *C. difficile* se ha incrementado en varias partes del mundo <sup>1, 2</sup>; por lo que es de importancia capital contar con los estudios que permitan elegir las mejores pruebas para diagnosticar de manera precisa y oportuna la enfermedad asociada a *C. difficile* (EACD). Particularmente, no hay estudios que determinen la concordancia de Xpert *C. difficile*/Epi con pruebas de inmunoensayo para la detección de toxinas A y B (Mini VIDAS).

El *C. difficile* fue descrito en 1935 por Hall y O'toole como un agente normal de la microbiota intestinal de recién nacidos sanos, quienes denominaron inicialmente a la bacteria *Bacillus difficilis* por la dificultad para conseguir su aislamiento. Sin embargo, es posible que los primeros reportes de *C. difficile* como causante de enfermedad sean de 1893, cuando Finne y cols, describieron el caso de una mujer joven con diarrea hemorrágica y pseudomembranas a nivel del colon.

## **2. Introducción**

El *C. difficile* es un bacilo grampositivo, anaerobio estricto, formador de esporas que le permiten resistir a la desecación, la acción de productos químicos y a temperaturas extremas en el agua, suelo y en ambientes hospitalarios, en donde puede permanecer durante años. La vía de transmisión es fecal-oral, sin embargo, puede colonizar al personal de salud, objetos médicos y superficies; las cuales son una fuente importante de infección intrahospitalaria.

Bartlett et al. (1978) determinaron que *C. difficile* era el principal agente causal de colitis pseudomembranosa en pacientes en tratamiento con antibióticos.

## **3. Patogénesis**

La forma de infectante del *C. difficile* es la forma esporulada, la cual ingresa por vía oral, atraviesa el sistema digestivo y se establece en el colon, donde adopta su forma vegetativa. La bacteria se adhiere a la capa mucosa del enterocito y la atraviesa con ayuda del flagelo, adhesinas y proteasas que produce<sup>5</sup>.

Las esporas de *C. difficile* son ubicuas en el ambiente; y también se encuentran en el colon del hospedero como parte de la flora normal. Sin embargo, cuanto la microbiota intestinal se altera como consecuencia del

empleo de antibióticos, las esporas de *C. difficile* pueden germinar, proliferar y producir toxinas <sup>10</sup>.

Dichas esporas de *C. difficile* requieren de la presencia de ácido cólico o sus derivados (ácido taurocólico) así como de ciertos amino ácidos (L-glicina y L-histidina) para germinar <sup>11</sup>. Durante el paso de las esporas de *C. difficile* por el intestino delgado, la germinación de esporas es inhibida principalmente por la presencia de elevadas cantidades de ácido queno-desoxicólico, así como por el oxígeno que inhibe la proliferación de las esporas que logran germinar <sup>13, 14</sup>. Las esporas de *C. difficile*, pueden ser eliminadas en las heces, o permanecer adheridas al epitelio colónico <sup>15</sup> y de esta manera, resistir ataques del sistema inmune innato y de la antibioticoterapia específica para *C. difficile*.

Es altamente probable que una vez suprimida la terapia específica para *C. difficile*, las esporas adheridas al epitelio colónico germinen provocando la recurrencia del cuadro clínico. La evidencia actual indica que las esporas de *C. difficile* son el agente de iniciación y persistencia de las infecciones por *C. difficile*.

#### **4. Epidemiología**

Recientemente, se ha registrado un cambio significativo en la epidemiología de la enfermedad asociada a *C. difficile*. Se ha documentado un incremento notable en la incidencia general de la enfermedad, así como una mayor gravedad en los casos. A este respecto, una evaluación de los datos de egreso de hospitales de Estados Unidos mostró que a partir del 2001, existió un aumento repentino en la cantidad y la proporción de los pacientes dados de alta del hospital con enfermedad asociada a *C. difficile* <sup>6</sup>.

Por otro lado, las tasas de egreso de pacientes con EACD aumentaron entre las personas mayores de 65 años de edad y fueron 5 veces más altas en este grupo de edad que entre las personas de 45 a 64 años de edad.

A partir de la segunda mitad del 2002 y hasta el 2006, los brotes de infecciones ocasionadas por *C. difficile* en los hospitales eran usualmente más graves y recurrentes, y se apreciaron en hospitales de una gran parte de Quebec, Canadá <sup>7,8</sup>. Estos brotes fueron asociados, al igual que los brotes que aparecieron previamente en los Estados Unidos, con el uso de fluoroquinolonas <sup>9</sup>.

Los agentes etiológicos de los brotes tanto en Quebec como en por lo menos ocho hospitales de seis estados de Estados Unidos fueron cepas casi idénticas de *C. difficile* <sup>6</sup>. Finalmente, se estableció que se trataba de una cepa que se ha vuelto conocida de forma variada por su patrón de análisis de endonucleasas de restricción, BI; por su patrón de electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE por sus siglas en inglés), NAP1 (es decir PFGE tipo 1 de Norteamérica); o por su designación ribotipo PCR, 027; ahora se la designa comúnmente “NAP1/BI/027”.

Esta cepa representó del 67% al 82% de las cepas aisladas en Quebec <sup>6</sup>; lo cual implica que puede ser transmitida más eficazmente que las otras cepas. También posee, además de códigos de genes para toxinas A y B, una codificación de gen para la toxina binaria.

Al reconocer al *C. difficile* como un patógeno importante para la salud, con alto potencial epidémico, se han desarrollado herramientas diagnósticas y de estudio que han permitido conocer a fondo la fisiopatología de la enfermedad, factores de riesgo asociados, prevalencias, resistencia bacteriana y medidas adecuadas de promoción y prevención.

Debido a la magnitud de la importancia de las EACD, en 2010 se publicó la actualización de las guías de práctica clínica para el manejo de los pacientes con infección por *C. difficile* por parte de la Society for Health care Epidemiology of America (SHEA) y la Infectious Diseases Society of America (IDSA) <sup>6</sup>.

## 5. Factores de riesgo

La edad avanzada es uno de los factores de riesgo más importantes para la EACD, tal como lo muestra el aumento en la tasa ajustada para la edad entre personas mayores de 64 años de edad <sup>23,24</sup>.

El factor de riesgo más importante para el desarrollo de la EACD es la exposición a agentes antimicrobianos. Prácticamente todos los antibióticos han sido asociados con la EACD a través del tiempo.

El riesgo relativo del tratamiento con un agente antimicrobiano dado y su asociación con la CDI depende de la prevalencia local de las cepas que son altamente resistentes a ese agente antimicrobiano en particular <sup>25</sup>.

Por otro lado, la administración de agentes antimicrobianos aumenta el riesgo de EACD debido a que disminuye la flora intestinal normal. La exposición prolongada a los antimicrobianos, la exposición a múltiples antimicrobianos, en comparación con la exposición a un solo agente, aumentan el riesgo de EACD sin embargo, incluso una exposición muy limitada, como la profilaxis perioperatoria con una sola dosis, aumenta el riesgo de un paciente de colonización por *C. difficile* y la enfermedad sintomática <sup>6, 26</sup>.

La duración de la hospitalización es un factor de riesgo plausible para la aparición de la EACD, debido a que entre mayor sea el número de días de estancia intrahospitalaria, se incrementarán las posibilidades de exposición a otros pacientes con *C. difficile* <sup>58</sup>.

En pacientes oncológicos, la quimioterapia y la presencia de inmunosupresión en general es otro factor de riesgo para la EACD. A este respecto, algunos estudios recientes han documentado un incremento importante en los casos de diarrea asociada a *C. difficile* entre los pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana en Estados Unidos, lo anterior posiblemente relacionado con el estado de inmunosupresión

subyacente, así como a una mayor exposición a agentes antimicrobianos, exposición a entornos de cuidado de la salud o la combinación de estos factores <sup>59</sup>.

Otros factores de riesgo para padecer EACD incluyen: la cirugía gastrointestinal o la manipulación del tracto gastrointestinal, incluyendo la alimentación enteral o nasogástrica <sup>27</sup>.

## **6. Manifestaciones clínicas**

Los individuos que padecen la EACD pueden desarrollar cualquiera de los siguientes cuadros clínicos:

### **a. Diarrea por *C. difficile*.**

Es la presentación más común de la EACD, se caracteriza por la presencia de diarrea acuosa leve a moderada, usualmente no sanguinolenta y ocasionalmente acompañada por dolor abdominal tipo cólico. Los síntomas comienzan durante o poco tiempo después de la administración de antibióticos.

Las toxinas del *C. difficile* pueden detectarse en las muestras fecales aun cuando los estudios endoscópicos no muestren alteraciones relevantes <sup>31</sup>. Aunque *C. difficile* puede estar presente en las heces en un 3% de adultos sanos es el agente causal del 10-25% de las diarreas por antibióticos.

### **b. Colitis simple.**

La colitis se define como un proceso inflamatorio del colon que puede ser causado por diferentes etiologías: isquémica, infecciosa, ulcerativa, entre otras. Las manifestaciones clínicas incluyen diarrea abundante, de 3 o más deposiciones diarias, líquida, con moco y sangre, acompañada de dolor abdominal. El cuadro es generalmente autolimitado, y el manejo consiste en hidratación y la suspensión de la terapia antimicrobiana <sup>28</sup>.

### **c. Colitis pseudomembranosa.**

Causada por *C. difficile* se caracteriza por lesiones con eritema, edema, pérdida del patrón vascular, sangrado y placas amarillentas elevadas de 2 a 10 mm. En el estudio de Martin-Alva et al. (2007), sobre la asociación de la toxina A de *C. difficile* y el daño histopatológico causado en los pacientes, se clasificaron los resultados de las biopsias colónicas y se dividen en 3 tipos de lesiones:

-Tipo I: se pueden apreciar acumulaciones focales de polimorfonucleares con áreas de necrosis epitelial focalizada y exudación de fibrina y neutrófilos en la luz colónica.

-Tipo II: presenta un exudado más prominente que se origina en un área de ulceración epitelial, manteniéndose intacta la mucosa circundante.

-Tipo III: consiste en la necrosis epitelial difusa (no focal, como sucedía en los tipos anteriores), cubierta por una pseudomembrana formada por polimorfonucleares, fibrina y detritus celulares <sup>32</sup>.

### **d. Colitis fulminante**

Constituye la manifestación más grave y altamente letal de la enfermedad; aparece aproximadamente en el 3% de los pacientes infectados con *C. difficile*. Se caracteriza, además de lo descrito en la colitis pseudomembranosa, por presentar una alteración del estado general del individuo, acompañado por letargo, fiebre, leucocitosis, acidosis láctica, taquicardia, dolor abdominal, íleo, megacolon tóxico, entre otras manifestaciones, hasta llegar a la colectomía e incluso la muerte <sup>29,30</sup>.

Respecto a la recurrencia de la enfermedad; aproximadamente entre un 15-45% de los pacientes tratados de EACD sufren recaídas en un período de 2 meses.

## 7. Diagnóstico

El diagnóstico de la enfermedad asociada con *C. difficile*; se establece por la combinación de la sospecha clínica (presencia de síntomas y factores predisponentes) y la confirmación mediante estudios de laboratorio <sup>31</sup>.

En la actualidad, existe una amplia variedad de métodos diagnósticos para la EACD, de los cuales se han informado sensibilidad y especificidad variables. Algunos se basan en la detección de una o varias toxinas del *C. difficile* en las muestras de heces mediante ELISA. Mientras que otras se basan en la amplificación de ácidos nucleicos para detectar la presencia de *C. difficile*. Algunas otras de las pruebas como son el cultivo de *C. difficile*, y el ensayo de citotoxicidad, tienen metodologías complejas y no se encuentran disponibles en la mayoría de los hospitales. Las pruebas diagnósticas disponibles en la actualidad pueden ser utilizadas, solas o en combinación dependiendo de la sensibilidad y especificidad empleando diferentes algoritmos diagnósticos.

Sin embargo, lo más importante para poder diagnosticar las EACD de forma eficiente es que haya un adecuado análisis clínico en conjunto con el diagnóstico de laboratorio de *C. difficile* puesto que no todos los pacientes portadores de cepas toxigénicas de *C. difficile* presentan síntomas <sup>12</sup>.

A continuación, se describen brevemente los principales métodos que se emplean para el diagnóstico de infección por *C. difficile*.

### a. Cultivo celular

El ensayo de neutralización de citotoxina es la prueba de referencia para la identificación de la toxina B en materia fecal, por ejemplo; en más del 90% de los pacientes con colitis pseudomembranosa, se puede identificar el efecto citopático que la toxina produce sobre tejido humano *in vitro*. La técnica posee una sensibilidad y una especificidad de casi el 100%. Entre sus limitaciones, encontramos su costo elevado, el tiempo para la entrega de

los resultados (2-3 días), la escasez de centros especializados en la técnica y que no existe relación entre la presencia de la toxina y la gravedad de la enfermedad<sup>29, 33</sup>.

#### **b. Cultivo anaerobio**

Permite el crecimiento de cepas morfológicamente compatibles con la bacteria; se utilizan medios selectivos y diferenciales incubados en anaerobiosis, el medio más ampliamente utilizado es el agar cicloserina-cefoxitina-fructosa<sup>34</sup>.

Esta técnica permite el aislamiento de la bacteria para su manipulación posterior para realizar la identificación de la especie, y pruebas de susceptibilidad, ribotipificación y análisis de tipificación molecular en el caso de sospecha de un brote. Por ejemplo, la identificación confirmatoria se puede realizar mediante las pruebas de indol negativo, L-prolina-aminopeptidasa positiva y métodos comerciales (tarjetas vitek 2 Biomerioux).

Sin embargo, esta técnica puede ser ineficaz para fines diagnósticos debido a la dificultad para que este tipo de bacterias crezcan, desarrollo de cepas no toxigénicas o que no expresen la toxina *in vitro*<sup>29</sup>.

También se han utilizado otros medios de cultivo para el aislamiento de *C. difficile*: agar cicloserina manitol, agar sangre manitol cicloserina, agar cefoxitina cicloserina con suplementos de sangre, entre otros.

Mundy et. al., (1995), compararon el agar cicloserina-cefoxitina-fructosa con el agar sangre manitol cicloserina, y éste último presentó menos inhibición de la flora normal presente en la materia fecal, siendo el agar cicloserina-cefoxitina fructosa el más indicado para el aislamiento de *C. difficile*<sup>29</sup>.

**c. Detección mediante pruebas para detección del antígeno común de *C. difficile* (GDH). Esta detección no la incluyas pues no es motivo de tu trabajo**

La prueba inicial desarrollada para detectar GDH fue una prueba de aglutinación por látex. Tenía una sensibilidad del 58% al 68% y una especificidad del 94% al 98%<sup>29, 37</sup>. El GDH es una proteína presente en todos los aislados de *C. difficile* pero no informa si produce toxinas. Se ha considerado su uso como una prueba de escrutinio para posteriormente realizar una prueba que demuestre que la bacteria detectada produce toxinas.

**d. Inmunoensayo enzimático**

Los inmunoensayos enzimáticos (ELISA) son altamente específicos, de bajo costo, convenientes, rápidos y, por lo tanto, ampliamente empleados para detectar la toxina B (con o sin toxina A). Desafortunadamente, los ELISA de toxinas poseen una menor sensibilidad que los ensayos de neutralización de toxina<sup>35</sup>, hasta el punto que los ensayos de ELISA pueden no detectar más de la mitad de los casos de infección por *C. difficile*<sup>36</sup>. Su uso provocaría la incapacidad del laboratorio clínico para detectar aproximadamente 50% de las cepas toxinogénicas de *C. difficile*, constituyéndose en un riesgo para el paciente.

La sensibilidad y especificidad que se han reportado para este tipo de estudios, tienen amplias variaciones, que van de 40% a 100%<sup>60, 61, 62</sup>.

**e. VIDAS CDAB**

Este método diagnóstico se fundamenta en un sistema automático de inmunodetección rápida de patógenos basado en la técnica ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay), una técnica ELISA ligada a fluorescencia) y en técnicas de inmunocentración.

La metodología ELFA es una técnica ELISA en "sándwich" de alta sensibilidad y especificidad para la detección de antígenos, con lectura final de fluorescencia, proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra. Los anticuerpos están fijados en el interior de la fase sólida de la reacción, que consiste en un cono, el cual actúa también como pipeta.

Los reactivos, listos para su empleo, están colocados en un cartucho identificado por código de barras que es automáticamente reconocido por el equipo. Una vez depositada la muestra en el pocillo destinado para tal efecto en el cartucho, el sistema VIDAS comienza el análisis, realizando las reacciones, lavados, incubaciones, etc., necesarios hasta la lectura y emisión de los resultados <sup>51</sup>.

En 2009, Shin et al, publicaron un estudio en el que compararon VIDAS CDAB y CDA para la detección de *C. difficile* en un área tcdA- tcdB+ prevalente. Ellos encontraron que la sensibilidad de VIDAS CDAB fue mayor que la de VIDAS CDA (65.3% vs. 29.8% respectivamente).

#### **f. Xpert *Clostridium difficile*/Epi (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA)**

La prueba de Xpert *Clostridium difficile*/Epi (CD) es un estudio de PCR que usa primers dirigidos al gen *tcdB*, genes de toxinas binarias (*cdtA* y *cdtB*) y delección de un nucleótido en la posición 117 del gen *tcdC*; como resultado, Xpert *Clostridium difficile*/Epi puede detectar cepas toxigénicas de *C. difficile* y diferenciar a *C. difficile* 027/NAP1/B1 <sup>53</sup>.

En un estudio reciente, en donde se comparó el sistema Xpert *Clostridium difficile*/Epi con el cultivo toxigénico, se determinó que la sensibilidad, especificidad y los valores predictivo positivo y negativo fueron: 100%, 94.6%, 83.1% y 100%, respectivamente, para la prueba Xpert *Clostridium difficile*/Epi y para la prueba VIDAS CDAB fueron 40.8%, 98.0%, 100% y 88.9% respectivamente.

Como parte de las conclusiones, se determinó que una de las ventajas más significativas del Xpert C. *difficile*/Epi radica en su rapidez y simplicidad<sup>53</sup>.

De manera breve, las instrucciones del fabricante consisten en insertar un hisopo en un contenedor con una muestra de heces diarreicas, la muestra se agita durante 10 segundos y todo el líquido es transferido a un cartucho que posteriormente se lee en el sistema GeneXpert<sup>54</sup>.

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

*Clostridium difficile* es el microorganismo responsable de la mayoría de los casos de diarrea infecciosa y de colitis pseudomembranosa asociada con el empleo de antibióticos; la incidencia y gravedad de las infecciones ocasionadas por *C. difficile* se ha incrementado de manera significativa en los últimos años<sup>54</sup>.

Los cultivos toxigénicos y estudios de neutralización de citotoxina se consideran el estándar de referencia para la detección de *C. difficile* toxigénico, pero la combinación de cultivos anaerobios y detección de producción de toxina A y B toma al menos 48 horas en completarse.

El diagnóstico clínico es complejo, debido entre otras cosas, a que las dos únicas variables de sospecha de una enfermedad asociada a *C. difficile*, que son la diarrea y el antecedente del uso reciente de antibióticos, tienen una especificidad <45% y un bajo valor predictivo positivo (18%).

A pesar de las múltiples pruebas diagnósticas disponibles, no existe acuerdo absoluto con respecto al estudio de mayor rendimiento<sup>55</sup>.

## III. JUSTIFICACIÓN

Durante muchos años, el diagnóstico de las infecciones ocasionadas por *C. difficile* se realizó principalmente mediante la detección de toxinas de *C.*

*difficile* por inmunoensayo enzimático, aunque actualmente se sabe que este tipo de estudios carecen de buena sensibilidad <sup>56</sup>.

Dada la importancia creciente de la enfermedad asociada a *C. difficile*, se han desarrollado diversos ensayos moleculares para la detección de *C. difficile*, los cuales están disponibles comercialmente.

En particular, respecto a la prueba Xpert *C. difficile*/Epi, son escasos los estudios que comparan este método con otros métodos de diagnóstico, asimismo; no hay estudios que determinen la concordancia de Xpert *C. difficile*/Epi con las pruebas de inmunoensayo para la detección de toxinas A y B. Por otra parte, los factores asociados con pruebas discordantes han sido poco estudiados.

A nivel institucional, es relevante conocer el apego a las indicaciones para solicitar pruebas para la detección de toxinas A y B, con base en la sospecha clínica adecuada.

Debido a que el rendimiento diagnóstico de las pruebas puede presentar variaciones de acuerdo con la epidemiología local, y la prevalencia de cepas productoras de toxina A o B, es conveniente analizar el rendimiento de las pruebas disponibles en nuestra institución, como son Xpert *C. difficile*/Epi y el inmunoensayo enzimático para la detección de toxina A y B (Mini VIDAS).

#### **IV. HIPÓTESIS**

Existe una concordancia moderada entre el inmunoensayo enzimático y la prueba de Xpert *C. difficile*/Epi para la detección de toxinas A y B de *C. difficile*.

## **V. OBJETIVO GENERAL**

Determinar la concordancia entre el inmunoensayo enzimático para la detección de toxinas A y B (Mini VIDAS) y la amplificación de ácidos nucleicos (Xpert *C. difficile*/Epi) en diagnóstico de la EACD.

## **VI. OBJETIVOS SECUNDARIOS**

1. Describir los factores asociados con la EACD en los pacientes cuyas muestras fueron sometidas a cultivo, inmunoensayo enzimático para la detección de toxina A y B (Mini VIDAS) y la amplificación de ácidos nucleicos (Xpert *C. difficile*/Epi).
2. Describir las características clínicas de los pacientes que padecieron diarrea nosocomial a quienes se les solicitó una prueba para detección de toxinas de *C. difficile*.
3. Describir el apego a las indicaciones para solicitar una prueba para la detección de toxinas de *C. difficile* durante el período de mayo a septiembre de 2012.
4. Identificar las características clínicas de los pacientes en los cuales se obtuvo un cultivo positivo para *C. difficile*.

## **VII. METODOLOGÍA**

### **1. Diseño del estudio.**

Se realizó un estudio observacional, comparativo y retrolectivo.

En este estudio se determinó la concordancia entre una prueba de inmunoensayo enzimático para la detección de toxina A y B (Mini VIDAS) y una prueba de amplificación de ácidos nucleicos (Xpert *C. difficile*/Epi).

## **2. Población de estudio.**

Se analizaron 101 muestras de heces diarreicas que se recibieron en el período de mayo a septiembre de 2012 en el laboratorio de microbiología clínica, a las cuales se les realizaron las pruebas de Mini VIDAS, cultivo y Xpert *C. difficile*/Epi.

## **3. Criterios de inclusión**

- a. Todos los pacientes de quienes se enviaron muestras de heces diarreicas al laboratorio de microbiología clínica para detección de toxina de *C. difficile* en el período de mayo a septiembre de 2012.

## **4. Criterios de exclusión**

- a. No se consideraron los pacientes cuyas muestras de heces no fueron diarreicas.

## **5. Criterios de eliminación**

- a. Pacientes sin expediente clínico disponible.
- b. Se eliminaron las muestras repetidas de los pacientes durante el periodo de estudio, sólo se consideró la primera muestra.

## **6. Análisis estadístico**

- a. La variable principal fue el valor de kappa que se obtuvo entre ambas pruebas de diagnóstico.
- b. Se obtuvieron los datos demográficos, clínicos y de respuesta al tratamiento indicado en los expedientes de los pacientes incluidos

c. Se evaluaron en base a los datos obtenidos en el expediente clínico, qué porcentaje de los casos en los que se solicitó la detección de toxinas de *C. difficile* cumplían con la definición de caso.

## **7. Estrategia de análisis estadístico**

Se empleó estadística descriptiva para las variables clínicas y demográficas de los enfermos, en el caso de las variables continuas se empleó la media y la desviación de estándar o mediana e intervalos intercuartiles dependiendo de la distribución de las variables, en el caso de las variables categóricas o dicotómicas, se describieron como frecuencia y porcentajes.

Se evaluó la concordancia entre las pruebas mediante la obtención de un coeficiente kappa y se calcularon los intervalos de confianza 95%.

Para el análisis inferencial se realizó un modelo bivariado por medio de la prueba de Chi<sup>2</sup> de Pearson para las variables dicotómicas.

El programa de análisis estadístico que se utilizó fue el STATA® 11.2.

## **8. Metodología de laboratorio**

### **a. Mini VIDAS.**

1. Las muestras de heces se conservaron a 2-8 °C hasta por 3 días. 2. Las heces líquidas se homogeneizaron con ayuda de la pipeta de transferencia por aspiración/expulsión. Se tomaron 200 µl de heces líquidas en un microtubo, se añadieron 1000 µl de diluyente de muestra, se centrifugó 5 minutos entre 2 y 25 °C al menos a 12000 xg.

1. Se utilizó un cartucho “CDAB” y un cono “CDAB” del kit para cada muestra, control o calibrador a analizar.
2. La prueba se identificó por el código “CDAB” en el instrumento. Se identificó el calibrador como “S1”, y se realizó el ensayo por duplicado. En caso de que resultara necesario procesar los controles positivos,

de identificaron por “C1” y “C3”. Si se procesó el control negativo, se identificó por C2.

3. Para esta prueba, el volumen de sobrenadante, control y calibrador fue de 300 µl.
4. Se colocaron en el sistema los conos “CDAB” y cartuchos “CDAB”. Se verificó la concordancia de las etiquetas de color y el código de la prueba entre los conos y los cartuchos.
5. Se inició el análisis según el Manual de Utilización VIDAS. Todas las etapas fueron realizadas automáticamente por el sistema.
6. Los resultados se obtuvieron en aproximadamente 75 minutos.

### **Interpretación de los resultados.**

El aparato realizó dos medidas de fluorescencia en el pocillo óptico por cada muestra analizada. Se calculó el RFV (Valor de Fluorescencia Relativa) al restar la lectura del ruido de fondo del resultado final. Este cálculo apareció en la hoja de resultados del equipo en forma automatizada.

#### **b. Xpert *C. difficile*/Epi.**

Recolección y transporte de muestras

1. Se recolectó la muestra de heces diarréicas en un recipiente estéril. Se siguieron las instrucciones del Laboratorio de Microbiología Clínica para la recolección de las muestras destinadas a la prueba de *C. difficile*.
2. Se etiquetó la muestra con los datos de identificación (nombre y registro de los pacientes) y se envió al laboratorio para realizar la prueba.

### **Procedimiento**

Para añadir la muestra y los reactivos al cartucho (Xpert *C. difficile*):

1. Se extrajo el cartucho y los reactivos del envase.

2. Se introdujo brevemente un hisopo en la muestra de heces. No fue necesario que el hisopo quedara impregnado por completo.
3. Se insertó el hisopo en el tubo que contenía el reactivo de la muestra.
4. Se sujetó el hisopo por el palillo cerca del borde del tubo, se subió el hisopo para que quedara a unos milímetros del fondo del tubo y se oprimió el palillo contra el borde del tubo para romperlo. Se aseguró que el hisopo fuera lo suficientemente corta para poder cerrar completamente el tubo con el tapón.
5. Se cerró la tapa y se agitó a alta velocidad durante 10 segundos.
6. Se abrió la tapa del cartucho. Se utilizó una pipeta de transferencia limpia y se transfirió todo el contenido del tubo al compartimento “S” del cartucho de Xpert *C. difficile*.
7. Se añadió el reactivo 1 al compartimento 1 del cartucho. Se apretó la ampolla hasta vaciar todo el contenido en el cartucho.
8. Se añadió el reactivo 2 al compartimento 2 del cartucho. Se apretó la ampolla hasta vaciar todo el contenido en el cartucho.
9. Se cerró la tapa del cartucho.

### **Inicio de la prueba**

1. Se encendió el equipo y el instrumento GeneXpert Dx.
2. En el escritorio de Windows®, dio doble clic en el icono de acceso directo a GeneXpert Dx.
3. Se inició una sesión en el software del sistema GeneXpert Dx con el nombre de usuario y contraseña.

4. En la ventana del sistema GeneXpert Dx, se dio clic en Create Test (Crear prueba). Apareció el cuadro de diálogo Scan Cartridge Barcode (Escanear código de barras de cartucho).

5. Se escaneó el código de barras del cartucho de Xpert *C. difficile*. Apareció la ventana Create Test (Crear prueba). Utilizando la información del código de barras, el software relleno automáticamente los cuadros de los siguientes campos: Select Assay (Seleccionar ensayo), Reagent Lot ID (Id. de lote de reactivos), Cartridge SN (Nº de serie del cartucho) y Expiration Date (Fecha de caducidad).

6. En el cuadro Sample ID (Id. de muestra), se escribió la identificación de la muestra. El Id. de muestra está asociada a los resultados de la prueba y se muestra en la ventana View Results (Ver resultados) y en todos los informes.

7. Se dio clic en Start Test (Iniciar prueba). En el cuadro de diálogo que apareció, se escribió la contraseña.

8. Se abrió la puerta del módulo del instrumento mientras la luz estuvo parpadeando en verde y se cargó el cartucho.

9. Se cerró la puerta. La prueba se inició y la luz verde dejó de parpadear. Una vez finalizada la prueba, la luz se apagó.

10. Se esperó hasta que el sistema desbloqueó la puerta para abrir la puerta del módulo y se retiró el cartucho.

11. Los cartuchos usados se desecharon en los contenedores de residuos de muestras apropiados, de acuerdo con las prácticas normalizadas del INCMNSZ.

Interpretación de los resultados: el sistema GeneXpert Dx interpola los resultados a partir de las señales de fluorescencia medidas y los algoritmos de cálculo integrados, y la muestra en la ventana View Results (Ver resultados). Los resultados posibles son: Toxigenic *C. diff* POSITIVE (*C. diff*

toxígena POSITIVO) 027-NAP1-BI PRESUMPTIVE NEG (027-NAP1-BI PROBABLE NEG) Se detectan secuencias de ADN blanco de *C. difficile* productora de toxina.

- *C. difficile* productora de toxina: el blanco de *C. difficile* productora de toxina (toxina B o toxina B más toxina binaria, o bien más *tcdC* con delección del nucleótido 117).

**Toxigenic *C. diff* POSITIVE (*C. diff* toxígena POSITIVO) 027-NAP1-BI PRESUMPTIVE POS (027-NAP1-BI PROBABLE POS).** Se detectan secuencias del ADN blanco, probablemente correspondientes a 027/NAP/B1, de *C. difficile* productora de toxina.

- *C. difficile* productora de toxina, probable 027/NAP1/B1: los blancos (probablemente correspondientes a 027/NAP/B1) de *C. difficile* productora de todos los tipos de toxina (toxina B, toxina binaria y *tcdC* con delección en el nucleótido 117).
- Probe Check – PASS (Comprobación de sonda APTA): todos los resultados de la comprobación de sonda son aptos.

**Toxigenic *C. diff* NEGATIVE (*C. diff* toxigénica NEGATIVO)**

**027-NAP1-BI PRESUMPTIVE NEG (027-NAP1-BI PROBABLE NEG)**

No se detectan secuencias de ADN blanco (toxina B) de *C. difficile*.

NEGATIVO: no se detectan secuencias de ADN (toxina B) de *C. difficile* productora de toxina, ni se detectan otras secuencias blanco de ADN de *C. diff* toxígena (toxina binaria y *tcdC* con delección nt 117). El CPM cumple los criterios de aceptación. No se detectan secuencias de ADN (toxina B) de *C. difficile* productora de toxina, ni se detectan otras secuencias de ADN blanco de *C. difficile* toxígena (toxina binaria y/o *tcdC* con delección del nucleótido 117).

- **NEGATIVO:** no se detectan secuencias de ADN blanco de *C. difficile* toxígena.
- **Probe Check – PASS** (Comprobación de sonda APTA): todos los resultados de la comprobación de sonda son aptos.

## **RESULTADO NO VÁLIDO**

No se puede detectar la presencia o ausencia de secuencias de ADN blanco de *C. difficile*.

### **9. Definiciones Operacionales**

**a. Sospecha de infección ocasionada por *C. difficile*.** Diagnóstico clínico de diarrea nosocomial asociada con *C. difficile*, definida por un caso con un cuadro caracterizado por 3 o más evacuaciones disminuidas en consistencia con duración de al menos 24 horas, que no estaba presente en el momento de la admisión hospitalaria y que aparece después de 3 días de la hospitalización, en pacientes con uso previo de antibióticos y que responde al tratamiento con metronidazol y/o vancomicina.

**b. Diagnóstico de infección por *C. difficile*.** Definido por la positividad de una o más de las tres pruebas de diagnóstico realizadas en este estudio (Mini VIDAS AB, cultivo y Xpert *C. difficile*/Epi).

## **VIII. RESULTADOS**

### **1. Población estudiada**

Inicialmente, se incluyeron 101 muestras de heces diarréicas al laboratorio de microbiología clínica para detección de toxina de *C. difficile* por tres métodos (Mini Vidas, cultivo y Xpert *C. difficile*/Epi) en el período de mayo a septiembre de 2012. Posteriormente, se eliminaron seis muestras que

estaban repetidas y cuatro más porque no se localizaron los expedientes de los pacientes. Finalmente en el análisis del estudio se consideraron 91 muestras una por paciente. Fig. 1

## **2. Características socio-demográficas de la población**

Se encontró que 52.7% (48/91) de los sujetos estudiados son mujeres, la mediana de edad fue de 43 años (IIC 30-61). El 31% de los pacientes se dedica al hogar y 20% son desempleados. Respecto al estado de residencia de los pacientes, la mayoría son originarios del Distrito Federal (51%) y 16% son del Estado de México. Cuadro 1

## **3. Comorbilidades de la población y factores de riesgo conocidos para enfermedad por *Clostridium difficile***

Las comorbilidades de la población estudiada fueron: diabetes mellitus 17.5% (16/91), hipertensión arterial sistémica 20.8% (19/91), enfermedades reumatológicas 13.1% (12/91), insuficiencia renal crónica 10.9% (10/91), neoplasias hematológicas, 16.4% (15/91) infección por VIH/SIDA, 6.5% (6/91) y enfermedad inflamatoria intestinal y diarrea crónica 9.8% (9/91). Cuadro 2.

Respecto a los factores de riesgo conocidos para infección ocasionada por *C. difficile*, se encontraron los siguientes en la población estudiada:

El 9.52% (2/91) de los pacientes con diagnóstico de EACD, tuvieron el antecedente de uso de antibióticos previo a la hospitalización en la que se diagnosticó infección por *C. difficile* (OR 0.50; IC 95% [ 0.05 – 2.63 ] p = 0.39).

En relación con cada grupo de antibióticos, se encontró que el uso de carbapenémicos estuvo presente en el 35% (6/91) de los pacientes que tuvieron diagnóstico de EACD, (OR 0.021; IC 95% [ 0 – 3.4] p = 0.01).

También se realizó un análisis con base en si los pacientes habían recibido antibióticos antes o durante la hospitalización para determinar su relación con la positividad de alguna de las tres pruebas diagnósticas y se encontró lo siguiente: El 17.19% (11/64) de los pacientes que recibieron antibióticos en algún momento, tuvieron cultivo positivo (OR 2.59; IC 95% [ 0.50 – 25.60]  $p = 0.22$ ). Cuadro 3

Por otra parte, se encontró que un 25% (16/64) de los pacientes con antibioticoterapia, tuvieron una prueba de Xpert *C. difficile*/Epi positiva (OR 4.16; IC 95% [ 0.85 – 39.73]  $p = 0.054$ ).

#### **4. Manifestaciones clínicas de la población estudiada**

El 100% de los pacientes incluidos en este estudio tuvieron evacuaciones diarréicas, asimismo, se encontró que el 51.6% (47/91) de ellos, presentaron fiebre, mientras que el 40.6% (37/91) de los pacientes tuvieron dolor abdominal y el 21.9% (20/91) de los pacientes presentaron heces con sangre.

#### **5. Factores asociados a enfermedad por *Clostridium difficile* con positividad de las pruebas diagnósticas.**

Como parte de los resultados relevantes de este estudio se encontró que el 31.2% (5/16) de los pacientes con Diabetes mellitus, tuvieron diagnóstico de infección por *C. difficile* (OR 3.33; 95% IC [ 0.72 – 13.62]  $p = 0.052$ ).

Por otro lado, la presencia de fiebre estuvo presente en 23.4% (11/47) de los pacientes con diagnóstico de infección por *C. difficile* ( $p=0.028$ , 95% IC [ 0.98 – 24.75]). Cuadros 3 y 8

El 29.73% (11/37) de los pacientes con dolor abdominal tuvieron diagnóstico de infección por *C. difficile* (OR 4.17; IC 95% [ 1.66 – 42.64]  $p = 0.002$ ).

## **6. Resultados de las tres pruebas diagnósticas Mini VIDAS AB, cultivo y Xpert *C. difficile*/Epi en relación con la sospecha diagnóstica.**

Se determinó que un 11.11% (2/18) de los pacientes con sospecha clínica de EACD, presentaron una prueba de Xpert *C. difficile*/Epi positiva (OR 0.34; IC 95% [ 0.025 – 1.16] p=0.054). También se encontró que un 25% (3/12) de los pacientes con sospecha de EACD, tuvieron una prueba de Mini VIDAS AB positiva, pero no fue significativo (OR 0.70; IC 95% [ 0.025 – 1.16] p = 0.62).

Finalmente, se determinó que el cultivo fue positivo en 15.38% (2/13) de los pacientes que tenían sospecha de EACD, pero sin significancia estadística (IC 95% [ 0.03 – 1.98] p = 0.22 ).

## **7. Concordancia entre las pruebas Mini VIDAS AB y Xpert *C. difficile*/Epi.**

Se calculó el índice Kappa para determinar la concordancia entre las pruebas diagnósticas Mini VIDAS AB y Xpert *C. difficile*/Epi y se encontró lo siguiente: concordancia de 93.1%, concordancia esperada de 72.8% e índice Kappa de 0.74. Cuadro 4

## **8. Resultados de las pruebas diagnósticas Mini VIDAS AB, cultivo y Xpert *C. difficile*/Epi en relación con el diagnóstico de EACD y su asociación con comorbilidades y cuadro clínico.**

Respecto a las comorbilidades, no hubo significancia estadística para la positividad de alguna de las tres pruebas, los detalles pueden consultarse en los Cuadros 5, 7 y 9.

En cuanto a las manifestaciones clínicas adicionales a la diarrea por sí misma; se encontró lo siguiente: la fiebre estuvo presente en el 31.9% (15/18) de los pacientes con una prueba de Xpert *C. difficile*/Epi positiva, con diferencia estadísticamente significativa (OR 6.4; IC 95% [ 1.58 – 36.75] p =

0.0027), en el caso de Mini Vidas AB, el 20.4% de los pacientes tuvieron la prueba positiva, en donde hubo también significancia estadística (OR 3.4; IC 95% [ 0.76 – 20.94] p = 0.06) y el 21.2% (10/13) de los pacientes con fiebre, tuvieron cultivo positivo (OR 3.69; IC 95% [ 0.85 – 22.17] p = 0.04). Cuadro 10.

Por otra parte, 31.9% de los pacientes con prueba de Xpert *C. difficile*/Epi positiva, tuvieron dolor abdominal (OR 5.3; IC 95% [ 0.10 – 2.76] p = 0.0023); y 29.7% de los pacientes con cultivo positivo también presentaron dolor abdominal (OR 11; IC 95% [ 2.11 – 106.44] p = 0.005). Cuadro X

### **9. Comparación de los resultados de las pruebas diagnósticas Mini VIDAS AB, cultivo y Xpert *C. difficile*/Epi.**

Nueve de las muestras de heces fueron positivas para *C. difficile* mediante los tres métodos de diagnóstico estudiados (9.8%). Para Xpert *C. difficile*/Epi, 19.7% (18/91) de las muestras fueron positivas, mientras que para Mini VIDAS AB, fueron positivas el 13.1% (12/91) de las muestras y mediante cultivo, fueron positivas 14.2% (13/91) de las muestras.

### **10. Hallazgo de la cepa NAP1/BI/027.**

Mediante el uso de la prueba Xpert *C. difficile*/Epi, se documentó un caso de infección por la cepa NAP1/BI/027 de *C. difficile*.

## **IX. DISCUSIÓN**

Los datos de este estudio indican que existe una buena concordancia entre el inmunoenzimático para la detección de toxinas A y B y el ensayo de amplificación de ácidos nucleicos en la plataforma Xpert *C. difficile* en muestras de heces de pacientes con sospecha de EACD. Sin embargo, el Xpert *C. difficile* detectó XX mas casos que el Mini VIDAS AB, lo anterior va de acuerdo a lo reportado en la literatura en donde la sensibilidad de las PCR es superior a la del inmunoensayo <sup>63</sup>.

Sin embargo es posible que los resultados de este estudio no sean del todo generalizables debido a la población de pacientes que acuden a recibir atención en el INCMNSZ. Lo anterior debido que en la muestra de pacientes que se analizó, un porcentaje importante correspondieron a pacientes con comorbilidades como son neoplasias hematológicas y VIH, padecimientos que han sido descritos con mayor incidencia de EACD.

Se encontró una asociación entre el uso de antibióticos y la EACD, tanto con los resultados positivos documentados mediante Xpert *C. difficile*/Epi 16/18 (p 0.054, IC 95%) como con los resultados positivos con Mini VIDAS AB (p 0.067, IC 95%); lo cual coincide con lo que se ha reportado en la literatura en relación con el factor de riesgo importante que significa el uso de antibióticos para presentar infecciones ocasionadas por *C. difficile* (25). Lo cual fortalece la hipótesis de que el empleo de cualquiera de las dos pruebas es adecuado para detectar la EACD. Particularmente, se encontró una asociación significativa entre el empleo de carbapenémicos con la presencia de EACD 6/14 (35.2%) (p 0.012, IC 95%), y no se encontró una asociación con el uso de otro tipo de antibióticos en particular, lo anterior no había sido reportado en la literatura. Cuadro 12

En cuanto al cuadro clínico, resultó evidente que la fiebre y el dolor abdominal fueron dos manifestaciones asociadas de manera significativa con la positividad de las pruebas diagnósticas, particularmente en el caso del dolor abdominal; Xpert *C. difficile*/Epi (35.1%) 13/18 (OR 6.4; IC 95% 1.58-36.75) p=0.0027), y el cultivo (29.7%) 15/18 (OR 11; IC 95% 2.11-106.44). Lo anterior va de acuerdo con lo reportado en otros estudios en donde los casos de diarrea nosocomial que se diagnostican como EACD presentan manifestaciones clínicas más floridas y con mayor sintomatología.

Uno de los objetivos del presente estudio, fue describir el apego a las indicaciones para solicitar una prueba para la detección de toxinas de *C. difficile* durante el período de mayo a septiembre de 2012; interesantemente,

se encontró que sólo el 29.6% (27/91) de las muestras que se enviaron al Laboratorio de Microbiología Clínica, provenían de pacientes con adecuada sospecha clínica de EACD por lo que se sugiere que se debe mejorar la revisión clínica del paciente para solicitar la prueba con mayor precisión y aumentaría la probabilidad pre-prueba mejorando el rendimiento diagnóstico y optimizando costos para el paciente.

Finalmente, mediante la prueba Xpert *C. difficile*/Epi, se detectó la presencia de la cepa NAP1/BI/027 de *C. difficile*, que afectó a un hombre de 26 años con antecedente de pioderma gangrenoso, fue hospitalizado posteriormente y se le administraron antibióticos de amplio espectro, pero sin embargo falleció durante esa hospitalización. Lo anterior, es una ventaja que presenta la prueba Xpert *C. difficile*/Epi debido a que su empleo de manera rutinaria ayudaría a detectar los casos con mayor gravedad y evitar la diseminación nosocomial de esta cepa hipervirulenta.

#### **Limitaciones del estudio.**

Debido a que no contamos con el cultivo toxigénico, que actualmente es considerado el estudio de referencia, no fue posible calcular sensibilidades y especificidades de las tres pruebas evaluadas en el presente trabajo; fundamentalmente para realizar la confirmación de los resultados positivos y para estudiar las muestras cuyos resultados fueron discordantes.

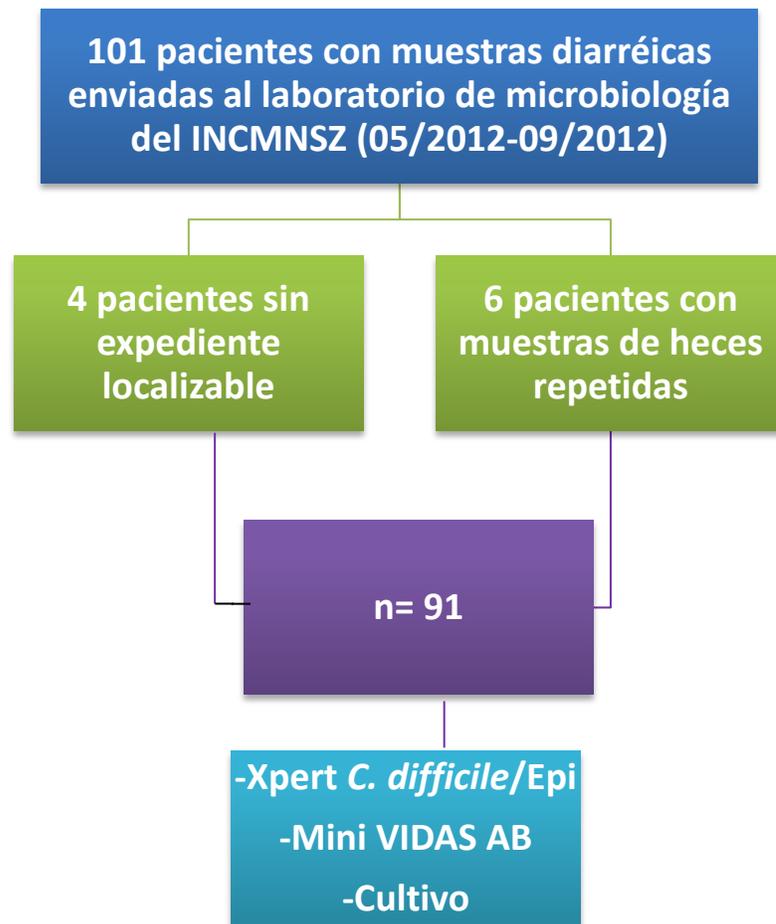
## **X. CONCLUSIONES**

1. Existe una buena concordancia entre la prueba Xpert *C. difficile*/Epi y Mini VIDAS AB, por lo que ambas representan una alternativa como método de diagnóstico de las infecciones asociadas a *C. difficile*.

2. Las dos principales manifestaciones clínicas (además de la diarrea) asociadas con positividad en las pruebas de diagnóstico de EACD que se evaluaron en este estudio, fueron la fiebre y el dolor abdominal.
3. El apego a las indicaciones clínicas para solicitar estudios para la detección de *C. difficile*, fue de 29.6%, considerando que una parte fundamental en el diagnóstico de la EACD es la adecuada sospecha clínica; debe subrayarse su importancia.
4. El uso de antibióticos de amplio espectro debe ser juicioso, en particular de carbapenémicos debido a que representa un factor de riesgo relevante para el desarrollo de infecciones asociadas a *C. difficile*.

## XI. CUADROS Y FIGURAS

Figura 1. Flujograma de la inclusión de pacientes



**CUADRO 1. Características demográficas de la población (N=91)**

	n/N (%)
	Mediana (IIC 25-75%)
<b>Edad (años)</b>	43 (30-61)
<b>Sexo: Femenino</b>	48/91 (52.7)
<b>Ocupación</b>	
Hogar	29/91 (31.8)
Desempleado (a)	20/91 (21.9)
Estudiante	6/91 (6.5)
Comerciante	5/91 (5.4)
Otros	31/91 (34.0)
<b>Estado de residencia</b>	
Distrito Federal	51/91 (56.0)
Estado de México	16/91 (17.5)
Veracruz	5/91 (5.4)
Oaxaca	4/91 (4.3)
Morelos	4/91 (4.3)
Otros	11/91 (12.0)

**CUADRO 2. Comorbilidades de la población (N=91)**

	n/N (%)
	Mediana (IIC 25-75%)
<b>Diabetes mellitus</b>	16/91 (17.5)
<b>Hipertensión arterial sistémica</b>	19/91 (20.8)
<b>Insuficiencia renal crónica</b>	10/91 (10.9)
<b>Neoplasias hematológicas</b> (leucemia, linfoma)	15/91 (16.4)
<b>Enfermedad inflamatoria intestinal</b> <b>/ Diarrea crónica</b>	9/91 (9.8)
<b>Enfermedades reumatológicas</b>	12/91 (13.1)
<b>Infección por VIH / SIDA</b>	6/91 (6.5)

Chi cuadrada de Pearson en variables categóricas y prueba exacta de Fisher para variables continuas

**CUADRO 3. Signos y síntomas de la población (N=91)**

	n/N (%)
	Mediana (IIC 25-75%)
<b>Fiebre</b>	47/91 (51.6)
<b>Diarrea</b>	91/91 (100)
<b>Dolor abdominal</b>	37/91 (40.6)
<b>Sangre en heces</b>	20/91 (21.9)

**CUADRO 4. Análisis de la concordancia entre Xpert *Clostridium difficile*/Epi y Mini VIDAS AB**

Concordancia observada	Concordancia esperada por azar	Kappa
93.1%	72.8%	0.74

**CUADRO 5. Análisis bivariado. Comorbilidades y Xpert *Clostridium difficile*/Epi (N=91)**

Característica	Xpert <i>Clostridium difficile</i> /Epi positivo n=18	Xpert <i>Clostridium difficile</i> /Epi negativo n=73	OR (IC 95%)	p
	n/N (%) Mediana (IIC)	n/N (%) Mediana (IIC)		
<b>Edad</b>	43.5 (30-61)	42	-	0.23
<b>Sexo (masculino)</b>	8/18 (44.4)	35/73 (47.9)	1.15 (0.36-3.76)	0.78
<b>Diabetes mellitus</b>	5/18 (27.7)	11/73 (68.7)	2.16 (0.49-8.24)	0.20
<b>Hipertensión arterial sistémica</b>	5/18 (23.8)	16/73 (76.1)	1.37 (0.33-4.90)	0.59
<b>Insuficiencia renal crónica</b>	3/18 (30)	7/73 (70)	1.88 (0.27-9.4)	0.38
<b>Neoplasias hematológicas (leucemia, linfoma)</b>	3/18 (20)	12/73 (80)	1.01 (0.16-4.4)	0.98
<b>Enfermedad inflamatoria intestinal / Diarrea crónica</b>	0/18 (0)	9/73 (100)	-	-
<b>Enfermedades reumatológicas</b>	1/18 (8.3)	11/73 (91.7)	0.33 (0.00-2.6)	0.28
<b>Infección por VIH / SIDA</b>	0/18 (0)	6/73 (100)	-	-

Chi cuadrada de Pearson en variables categóricas y prueba exacta de Fisher para variables continuas

**CUADRO 6. Análisis bivariado. Signos, síntomas y Xpert *Clostridium difficile*/Epi (N=91)**

Signo o síntoma	Xpert <i>Clostridium difficile</i> /Epi positivo n=18	Xpert <i>Clostridium difficile</i> /Epi negativo n=73	OR (IC 95%)	p
	n/N (%)  Mediana (IIC)	n/N (%)  Mediana (IIC)		
<b>Fiebre</b>	15/18 (31.9)	32/73 (68.0)	6.4 (1.58- 36.75)	0.0027
<b>Dolor abdominal</b>	13/18 (35.1)	24/73 (64.8)	5.3 (1.52- 20.89)	0.0023
<b>Sangre en heces</b>	3/18 (19.7)	17/73 (68.7)	0.65 (0.10- 2.76)	0.54

Chi cuadrada de Pearson en variables categóricas y prueba exacta de Fisher para variables continuas

**CUADRO 7. Análisis bivariado. Comorbilidades y Mini VIDAS AB (N=87)**

Característica	Mini VIDAS AB	Mini VIDAS AB	OR (IC 95%)	p
	<i>positivo</i> n=12	<i>negativo</i> n=75		
	n/N (%) Mediana (IIC)	n/N (%) Mediana (IIC)		
<b>Edad</b>	54.3	45.2	-	0.24
<b>Sexo</b> (masculino)	5/12 (41.6)	11/75 (73.3)	-	0.62
<b>Diabetes mellitus</b>	4/12 (26.6)	11/75 (68.7)	2.90 (0.53-13.17)	0.11
<b>Hipertensión arterial sistémica</b>	4/12 (20)	16/75 (80)	1.84 (0.35-7.95)	0.35
<b>Insuficiencia renal crónica</b>	2/12 (22.2)	7/75 (77.7)	1.94 (0.17-12.28)	0.43
<b>Neoplasias hematológicas</b> (leucemia, linfoma)	3/12 (21.4)	11/75 (78.5)	1.93 (0.28-9.48)	0.36
<b>Enfermedad inflamatoria intestinal / Diarrea crónica</b>	1/12 (11.1)	8/75 (88.8)	0.76 (0.01-6.74)	0.80
<b>Enfermedades reumatológicas</b>	0/12 (0)	12/75 (100)	-	-
<b>Infección por VIH / SIDA</b>	0/12 (0)	6/75 (100)	-	-

Chi cuadrada de Pearson en variables categóricas y prueba exacta de Fisher para variables continuas

**CUADRO 8. Análisis bivariado. Signos, síntomas y Mini VIDAS AB (N=91)**

Signo o síntoma	Mini VIDAS AB <i>positivo</i> n=12	Mini VIDAS AB <i>negativo</i> n=75	OR (IC 95%)	p
	n/N (%) Mediana (IIC)	n/N (%) Mediana (IIC)		
<b>Fiebre</b>	9/12 (20.4)	35/75 (79.5)	3.4 (0.76-20.94)	0.06
<b>Dolor abdominal</b>	7/12 (20)	28/75 (80)	2.35 (0.57-10.24)	0.16
<b>Sangre en heces</b>	0/12 (0)	18/75 (100)	-	-

Chi cuadrada de Pearson en variables categóricas y prueba exacta de Fisher para variables continuas

**CUADRO 9. Análisis bivariado. Comorbilidades y Cultivo (N=87)**

Característica	Cultivo positivo n=13	Cultivo <i>negativo</i> n=78	OR (IC 95%)	p
	n/N (%) Mediana (IIC)	n/N (%) Mediana (IIC)		
<b>Edad</b>	52	46.5	-	-
<b>Sexo (masculino)</b>	6/13 (46.1)	72/78 (92.3)	-	0.93
<b>Diabetes mellitus</b>	4/13 (25)	12/78 (75)	2.44 (0.46- 10.57)	0.17
<b>Hipertensión arterial sistémica</b>	4/13 (19)	19/78 (80.9)	1.59 (0.31-6.60)	0.47
<b>Insuficiencia renal crónica</b>	2/13 (20)	8/78 (80)	1.59 (0.14-9.54)	0.58
<b>Neoplasias hematológicas (leucemia, linfoma)</b>	3/13 (20)	12/78 (80)	1.65 (0.25-7.75)	0.48
<b>Enfermedad inflamatoria intestinal / Diarrea crónica</b>	1/13 (11.1)	8/78 (88.8)	0.72 (0.01-6.37)	0.80
<b>Enfermedades reumatológicas</b>	0/13 (0)	12/78 (100)	-	-
<b>Infección por VIH / SIDA</b>	0/13 (0)	6/78 (100)	-	-

Chi cuadrada de Pearson en variables categóricas y prueba exacta de Fisher para variables continuas

**CUADRO 10. Análisis bivariado. Signos, síntomas y Cultivo (N=91)**

Signo o síntoma	Cultivo <i>positivo</i> n=13	Cultivo <i>negativo</i> n=78	OR (IC 95%)	p
	n/N (%) Mediana (IIC)	n/N (%) Mediana (IIC)		
<b>Fiebre</b>	10/13 (21.2)	37/78 (78.7)	3.69 (0.85-22.17)	0.04
<b>Dolor abdominal</b>	11/13 (29.7)	26/78 (70.2)	11 (2.11-106.44)	0.0005
<b>Sangre en heces</b>	2/13 (10)	18/78 (90)	0.60 (0.06-3.19)	0.53

**CUADRO 11. Análisis del uso de antibióticos y los resultados de Xpert *Clostridium difficile*/Epi, Mini VIDAS AB y Cultivo (N=91)**

Prueba diagnóstica	n/N (%) Mediana (IIC)	p
<b>Xpert <i>Clostridium difficile</i>/Epi positivo</b>	16/18 (25)	0.054
<b>Mini VIDAS AB</b>	11/12 (18.3)	0.067
<b>Cultivo</b>	11/13 (17.19)	0.022

Chi cuadrada de Pearson en variables categóricas y prueba exacta de Fisher para variables continuas.

**CUADRO 12. Resultados del análisis de las características clínicas de los pacientes y el resultado positivo de todas las pruebas diagnósticas utilizadas en el estudio.**

Características clínicas															
Caso	Edad	Diabetes mellitus	Hipertensión arterial sistémica	Insuficiencia renal crónica	Neoplasias hematológicas	EII / Diarrea crónica	Enfermedades reumatológicas	Infección por VIH/SIDA	Fiebre	Dolor abdominal	Sangre en heces	Cultivo	Xpert C. difficile/EPI	Mini VIDAS AB	Uso de antibióticos
1	62	SI	NO	SI	NO	NO	NO	NO	SI	SI	NO	+	+	+	NO
2	85	SI	SI	SI	NO	NO	NO	NO	SI	SI	SI	+	+	+/-	SI
3	44	NO	NO	NO	NO	NO	SI	NO	SI	SI	NO	-	+	-	NO
4	43	SI	SI	SI	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	-	+	+	SI
5	96	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	SI	NO	NO	-	+	+	NO
6	39	NO	SI	NO	NO	NO	NO	NO	NO	SI	SI	+	+	-	SI
7	19	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	SI	NO	NO	-	+	-	SI
8	37	NO	NO	NO	SI	NO	NO	NO	SI	NO	NO	+	+	+	SI
9	32	NO	NO	NO	SI	NO	NO	NO	SI	SI	NO	+	+	+	SI
10	32	NO	NO	NO	SI	NO	NO	NO	SI	SI	NO	+	+	+	SI
11	26	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	SI	SI	NO	+	+	+	SI
12	71	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	SI	SI	NO	+	+	-/+	SI
13	92	SI	SI	NO	NO	NO	NO	NO	SI	SI	NO	+	+	+	SI
14	61	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	SI	SI	NO		+	-	SI
15	43	NO	SI	NO	NO	NO	NO	NO	SI	NO	NO	-	+	+	SI
16	37	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	SI	SI	SI	+	+	-	SI
17	61	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	SI	SI	NO	-	+	+	SI
18	68	SI	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	SI	NO	+	+	+	SI

## XII. BIBLIOGRAFÍA

1. Babady NE, Stiles J, Ruggiero P, *et al.* Evaluation of the Cepheid Xpert *Clostridium difficile*/Epi Assay for Diagnosis of *Clostridium difficile* Infection and Typing of the NAP1 Strain at a Cancer Hospital. *J Clin Microbiol.* 2010, 48 (12) 4519–24.
2. Khanna, S, Pardi DS. The growing incidence and severity of *Clostridium difficile* infection in inpatient and outpatient settings. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2010 Aug;4(4):409-16.
3. Carroll, KC. Test for the diagnosis of *Clostridium difficile* infection: The next generation. *Anaerobe.* 2011 Aug;17(4):170-4.
4. Miller MA, Hyland M, Ofner-Agostini M, *et al.* Morbidity, mortality, and healthcare burden of nosocomial *Clostridium difficile* associated diarrhea in Canadian hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol.*2002;23:137–140.
5. Denève C, Janoir C, Poilane I, Fantinato C, Collignon A. New trends in *Clostridium difficile* virulence and pathogenesis. *Int J Antimicrob Agents.* 2009;33 Suppl 1:S24-8.
6. Cohen SH, Gerding DN, Johnson S. 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 HospEpidemiol.* 2010 May; 31(5):431-55.
7. Loo VG, Poirier L, Miller MA, *et al.* A predominantly clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile*–associated diarrhea with high morbidity and mortality. *N Engl J Med* 2005;353:2442–2449.
8. Pepin J, Alary ME, Valiquette L, *et al.* Increasing risk of relapse after treatment of *Clostridium difficile* colitis in Quebec, Canada. *ClinInfectDis*2005;40:1591–1597.

9. Muto CA, Pokrywka M, Shutt K, et al. A large outbreak of *Clostridium difficile*–associated disease with an unexpected proportion of deaths and colectomies at a teaching hospital following increased fluoroquinolone use. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2005; 26: 273–280.
10. Rupnik M, Wilcox MH, Gerding DN. *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* 2009; 7: 526-36.
11. Sorg J A, Sonenshein A L. Bile salts and glycine as co-germinants for *Clostridium difficile* spores. *J Bacteriol.* 2008; 190: 2505-12.
12. Hernández-Rocha C, Naour S, Álvarez-Lobos M, et al. Infecciones causadas por *Clostridium difficile*: una visión actualizada. *Rev. chil. infectol.* 2012 Ago; 29(4): 434-445.
13. Hamilton JP, Xie G, Raufman JP, et al. Human cecal bile acids: concentration and spectrum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 293: G256-63.
14. Sorg JA, Sonenshein AL. Inhibiting the initiation of *Clostridium difficile* spore germination using analogues of chenodeoxycholic acid, a bile acid. *J Bacteriol* 2010; 192: 4983-90.
15. Planche T, Aghaizu A, Holliman R, et al. Diagnosis of *Clostridium difficile* infection by toxin detection kits: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 2008; 8: 777-84.
16. Na X, Kim H, Moyer MP, Pothoulakis C, et al. gp96 is a human colonocyte plasma membrane binding protein for *Clostridium difficile* toxin A. *Infect Immun* 2008; 76: 2862-71.
17. Pothoulakis C, Lamont JT. Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial-mucosal interactions II. The integrated response of the intestine

to *Clostridium difficile* toxins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280: G178-83.

18. Siffert JC, Baldacini O, Kuhry JG, et al. Effects of *Clostridium difficile* toxin B on human monocytes and macrophages: possible relationship with cytoskeletal rearrangement. *Infect Immun* 1993; 61: 1082-90.

19. Geric B, Carman RJ, Rupnik M, et al. Binary toxin-producing, large clostridial toxin-negative *Clostridium difficile* strains are enterotoxic but do not cause disease in hamsters. *J Infect Dis* 2006; 193: 1143-50.

20. Takeoka A, Takumi K, Koga T, et al. Purification and characterization of S layer proteins from *Clostridium difficile* GAI 0714. *J Gen Microbiol* 1991; 137: 261-7.

21. Sebaihia M, Wren BW, Mullany P, et al. The multidrug-resistant human pathogen *Clostridium difficile* has a highly mobile, mosaic genome. *NatGenet* 2006; 38: 779-86.

22. Toshniwal R, Silva J Jr, Fekety R, et al. Studies on the epidemiology of colitis due to *Clostridium difficile* in hamsters. *J Infect Dis* 1981;143: 51–54.

23. McDonald LC, Owings M, Jernigan DB. *Clostridium difficile* infection in patients discharged from US short-stay hospitals, 1996–2003. *Emerg Infect Dis* 2006;12:409–415.

24. Pepin J, Valiquette L, Alary ME, et al. *Clostridium difficile*–associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity. *CMAJ* 2004;171:466–472.

25. Johnson S, Samore MH, Farrow KA, et al. Epidemics of diarrhea caused by a clindamycin-resistant strain of *Clostridium difficile* in four hospitals. *N Engl J Med* 1999;341:1645–1651.

26. Yee J, Dixon CM, McLean AP, et al. *Clostridium difficile* disease in a department of surgery: the significance of prophylactic antibiotics. *ArchSurg*1991;126:241–246.
27. Bliss DZ, Johnson S, Savik K, et al. Acquisition of *Clostridium difficile* and *Clostridium difficile*–associated diarrhea in hospitalized patients receiving tube feeding. *Ann Intern Med* 1998;129:1012–1019.
28. Hurley BW, Nguyen CC. The spectrum of pseudomembranous enterocolitis and antibiotic-associated diarrhea. *Arch Intern Med*. 2002;162:2177-84.
29. Zea JW, Salazar CL. Enfermedad asociada a *Clostridium difficile*: prevalencia y diagnóstico por laboratorio. *Infectio*. 2012;16(4):211–222.
30. Dallal RM, Harbrecht BG, Boujoukas AJ, Sirio CA, Farkas LM, Lee KK, et al. Fulminant *Clostridium difficile*: an underappreciated and increasing cause of death and complications. *Ann Surg*. 2002;235:363-72.
31. Kachrimanidou M, Malisiovas N. *Clostridium difficile* infection: a comprehensive review. *Crit Rev Microbiol*. 2011 Aug;37(3):178-87.
32. Martin-Alva E. Asociación de *Clostridium difficile*, su toxina A y el daño histopatológico en pacientes con diarrea nosocomial. En: Chávez Flora MP, ed. Association of *Clostridium difficile*, its toxin A and histopathological damage in patients with nosocomial diarrhea. *Rev Peru Boil*. 2007. p. 287-90.
33. Arnold A, Pope C, Bray S, Riley P, Breathnach A, Krishna S, et al. Prospective assessment of two-stage testing for *Clostridium difficile*. *J Hosp Infect*. 2010;76:18-22.
34. Wren M. *Clostridium difficile* isolation and culture techniques. *Methods Mol Biol*. 2010;646:39-52.

35. Clabots CR, Johnson S, Bettin KM, Mathie PA, Mulligan ME, Schaberg DR, et al. Development of a rapid and efficient restriction endonuclease analysis typing system for *Clostridium difficile* and correlation with other typing systems. *J Clin Microbiol*. 1993;31:1870-5.
36. Marsh JW, O'Leary MM, Shutt KA, Sambol SP, Johnson S, Gerding DN, et al. Multilocus variable-number tandem-repeat analysis and multilocus sequence typing reveal genetic relationships among *Clostridium difficile* isolates genotyped by restriction endonuclease analysis. *J ClinMicrobiol*.2010;48:412-8.
37. Shanholtzer CJ, Willard KE, Holter JJ, et al. Comparison of the VIDAS *Clostridium difficile* toxin A immunoassay with *C. difficile* culture and cytotoxin and latex tests. *J ClinMicrobiol*1992;30:1837–1840.
38. Snell H, Ramos M, Longo S, et al. Performance of the TechLab C. DIFF CHEK-60 enzyme immunoassay (EIA) in combination with the *C. difficile* Tox A/B II EIA kit, the Triage *C. difficile* panel immunoassay, and a cytotoxin assay for diagnosis of *Clostridium difficile*–associated diarrhea. *J Clin Microbiol* 2004;42:4863–4865.
39. Zheng L, Keller SF, Lyerly DM, et al. Multicenter evaluation of a new screening test that detects *Clostridium difficile* in fecal specimens. *J ClinMicrobiol*2004;42:3837–3840.
40. Ticehurst JR, Aird DZ, Dam LM, et al. Effective detection of toxigenic *Clostridium difficile* by a two-step algorithm including tests for antigen and cytotoxin. *J ClinMicrobiol*2006;44:1145–1149.
41. Barbut F, Lalande V, Daprey G, et al. Usefulness of simultaneous detection of toxin A and glutamate dehydrogenase for the diagnosis of *Clostridium difficile*–associated diseases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*2000;19:481–484.

42. Reller ME, Lema CA, Perl TM, et al. Yield of stool culture with isolate toxin testing versus a two-step algorithm including stool toxin testing for detection of toxigenic *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol* 2007;45:3601–3605.
43. Sloan LM, Duresko BJ, Gustafson DR, et al. Comparison of real-time PCR for detection of the tcdC gene with four toxin immunoassays and culture in diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *J Clin Microbiol* 2008; 46:1996–2001.
44. Wren B, Clayton C, Tabaqchali S. Rapid identification of toxigenic *Clostridium difficile* by polymerase chain reaction. *Lancet*. 1990;335:423.
45. Clabots CR, Johnson S, Bettin KM, et al. Development of a rapid and efficient restriction endonuclease analysis typing system for *Clostridium difficile* and correlation with other typing systems. *J Clin Microbiol*. 1993;31:1870-5.
46. Rupnik M, Avesani V, Janc M, et al. A novel toxinotyping scheme and correlation of toxinotypes with serogroups of *Clostridium difficile* isolates. *J Clin Microbiol*. 1998;36:2240-7.
47. Huang H, Wu S, Wang M, et al. *Clostridium difficile* infections in a Shanghai hospital: antimicrobial resistance, toxin profiles and ribotypes. *Int J Antimicrob Agents*. 2009;33:339-42.
48. De Boer RF, Wijma JJ, Schuurman T, et al. Evaluation of a rapid molecular screening approach for the detection of toxigenic *Clostridium difficile* in general and subsequent identification of the tcdC $\Delta$ 117 mutation in human stools. *J Microbiol Methods*. 2010;83:59-65.
49. Marsh JW, O’Leary MM, Shutt KA, et al. Multilocus variable-number tandem repeat analysis for investigation of *Clostridium difficile* transmission in hospitals. *J Clin Microbiol*. 2006;44:2558-66.

50. Stubbs SL, Brazier JS, O'Neill GL, et al. PCR targeted to the 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region of *Clostridium difficile* and construction of a library consisting of 116 different PCR ribotypes. J Clin Microbiol. 1999;37:461-3.
51. <http://www.biomerieux-usa.com/upload/ASM-2008-VIDAS-CDAB-poster-1.pdf>
52. Lee EJ, Kuak EY, Yoo SJ. Comparison of VIDAS CDAB and CDA immunoassay for the detection of *Clostridium difficile* in a tcdA- tcdB+ *C. difficile* prevalent area. Anaerobe. 2009 Dec;15(6):266-9.
53. Saeam S, Minkyung K, Myungsook K. Evaluation of the Xpert *Clostridium difficile* Assay for the Diagnosis of *Clostridium difficile* Infection. Ann Lab Med. 2012 September; 32(5): 355–358.
54. Pancholi P, Kelly C, Raczkowski M, et al. Detection of toxigenic *Clostridium difficile*: comparison of the cell culture neutralization, Xpert C. difficile, Xpert C. difficile/Epi, and Illumigene C. difficile assays. J Clin Microbiol. 2012 Apr;50(4):1331-5.
55. Álvarez LM, González DR, Briceño LI, et al. Diagnóstico de diarrea por *Clostridium difficile*: en busca de un enfoque clínico más eficiente. Rev. méd. Chile. 2001 Jun; 129(6): 620-625.
56. Schmidt ML, *Clostridium difficile* testing algorithms: what is practical and feasible? Anaerobe, 2009 Dec;15(6):270-3.
57. Burnham CA, Carroll KC. Diagnosis of *Clostridium difficile* Infection: an Ongoing Conundrum for Clinicians and for Clinical Laboratories. Clin Microbiol Rev. 2013 Jul;26(3):604-30.
58. Bignardi GE. Risk factors for *Clostridium difficile* infection. J Hosp Infect. 1998 Sep;40(1):1-15.

59. Anand A, Glatt AE. *Clostridium difficile* infection associated with antineoplastic chemotherapy: a review. *Clin Infect Dis* 1993;17:109–113.
60. Eastwood K, Else P, Charlett A, et al. Comparison of nine commercially available *Clostridium difficile* toxin detection assays, a real-time PCR assay for *C. difficile* tcdB, and a glutamate dehydrogenase detection assay to cytotoxin testing and cytotoxigenic culture methods. *J. Clin. Microbiol.* 2009. 47:3211–3217.
61. de Jong E, de Jong AS, Bartels CJ, et al. Clinical and laboratory evaluation of a real-time PCR for *Clostridium difficile* toxin A and B genes. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2012. 31:2219–2225.
62. Novak-Weekley SM, Marlowe EM, Miller JM, et al. *Clostridium difficile* testing in the clinical laboratory by use of multiple testing algorithms. *J. Clin. Microbiol.* 2010. 48: 889–893.
63. Shin, S, Minkyung K, et al. Evaluation of the Xpert *Clostridium difficile* Assay for the Diagnosis of *Clostridium difficile* Infection. *Ann Lab Med.* 2012.; 32(5): 355–358.