

LABORATORIO CLINICO

*Diarrea asociada a Clostridium difficile:  
Evaluación de varios métodos de diagnóstico*

ISABEL BRICEÑO L.<sup>1</sup>, PATRICIA GARCIA C.<sup>1</sup>, MANUEL ALVAREZ L.<sup>2</sup>, MARCELA FERRES G.<sup>3</sup> y  
TERESA QUIROGA G.<sup>1</sup>

DIARRHEA ASSOCIATED TO *Clostridium difficile*: EVALUATION OF  
SEVERAL DIAGNOSTIC METHODS

*Clostridium difficile* is the principal pathogen related to antibiotic associated diarrhea and/or pseudomembranous colitis in hospitalized patients. The diagnosis is based on the clinical suspicion and the presense of a positive laboratory test for the detection of toxin of *C. difficile*, but the confirmation is based on the cytotoxicity test. Recently vartious immunoassays have been introduced that allow a rapid diagnosis of this disease, but they have different sensibility and specificity and that is why the need to be evaluated with respect to the reference method. The objective of this study was to evaluate correlation between 5 immunoassays and this confirmatory cytotoxicity method. The stool samples of 60 patients with clinical suspicion of *C. difficile* associated diarrhea were studied by 4 immunoassays: 3 ELISA (Tox A Meridian TM, Tox A Becton Dickinson TM and Tox A+B Tech Lab TM) and one immunochromatographic card type: Immunocard Tox A Meridian TM. Forty-six out of sixty samples were tested by a recently introduced card: *C. difficile* Tox A Oxoid TM. The cytotoxicity assay was considered the confirmatory test. The sensitivity and specificity observed for Tox A Meridian TM was 95.7% and 78,8% respectively, for Tox A Becton Dickinson TM it was 100% and 94.4% for Tox A+B Tech Lab TM it was 91.3% and 86.5%, for Immunocard Tox A Meridian TM it was 87% and 94.6% and for *C. difficile* Tox A Oxoid TM it was 94.7% and 96.3%. According to the results we found, the most recommended tests are Tox A Becton Dickinson TM and *C. difficile* Tox A Oxoid TM. Which of these to choose depends on the equipment of the laboratory and necessity of a rapid result.

**Key words:** *Clostridium difficile*, Diarrhea; Toxin detection; Toxin A; Toxin B.

---

Facultad de Medicina. Pontificia Universidad Católica de Chile.

<sup>1</sup> Unidad Docente Asociada de Laboratorios Clínicos.

<sup>2</sup> Departamento de Gastroenterología.

<sup>3</sup> Departamento de Pediatría.

## INTRODUCCION

*Clostridium difficile* es un bacilo Gram positivo, anaerobio estricto, esporulado, con potencial de producir toxinas y excepcionalmente invasor, responsable de 90% de los casos de colitis pseudomembranosa y de aproximadamente 20% de los casos de "diarrea asociada al uso de antibióticos".<sup>1-5</sup> Los casos clínicamente significativos se asocian con cepas de *C. difficile* productoras de toxinas A y B, que se cree actuarían sinérgicamente en la generación del cuadro.<sup>3,4,6</sup> Bajo condiciones normales, alrededor de 10% de la población adulta porta *C. difficile* en el intestino.<sup>1,6</sup> La condición de portador asintomático se describe en 10 a 33% de los adultos hospitalizados y en los neonatos entre 60 y 70%. La transmisión nosocomial a través del contacto directo paciente-paciente es frecuente y de difícil control, contribuyendo a un significativo aumento de la morbilidad y de los días de hospitalización.<sup>3,7</sup>

El principal factor de riesgo para el desarrollo de esta patología corresponde al uso de antibióticos, asociándose con mayor frecuencia a tratamientos con clindamicina, ampicilina y cefalosporinas.<sup>8,9</sup> El antibiótico sería el responsable de la alteración de la flora bacteriana colónica normal, permitiendo la infección por *C. difficile*, cuyas toxinas serían las responsables finales del daño a la mucosa intestinal y del proceso inflamatorio<sup>1</sup>. Revisiones recientes muestran que los componentes esenciales para la aparición de la infección son la ya mencionada exposición al antibiótico y el contacto con la cepa toxigénica de *C. difficile*. Factores adicionales son la susceptibilidad o inmunidad del huésped y la virulencia del microorganismo. Se postula que la condición de portador asintomático no aumentaría el riesgo de desarrollar la patología<sup>8</sup> y el uso de tratamiento específico en ellos no se justifica, ya que no permite erradicar el agente causal.

El diagnóstico de la enfermedad asociada a *C. difficile* es usualmente difícil desde el punto de vista clínico, debido a que no hay acuerdo en los exámenes a obtener y en la estrategia diagnóstica ni en los criterios clínicos para la selección de los pacientes en que se solicitará el estudio. Dadas estas dificultades, para definir

los casos de diarrea asociada a *C. difficile* (DACD) en los estudios publicados y de laboratorio, se han utilizado criterios clínicos y de laboratorio. Los más útiles han resultado ser: 1) 6 emisiones de deposiciones líquidas en las últimas 36 horas o 3 episodios en las últimas 24 horas, 2) antecedente de uso de antibióticos en un período de hasta 8 semanas previas al inicio del cuadro, 3) observación de pseudomembranas en el estudio endoscópico de intestino bajo, 4) muestra de deposiciones con hallazgo de *C. difficile* toxigénico, 5) respuesta favorable a tratamiento específico y 6) ausencia de otra etiología para la diarrea.

El diagnóstico de laboratorio de la infección por *C. difficile* busca demostrar la presencia de sus toxinas (A y/o B) en las deposiciones, pero aún no existe un test ideal para tales efectos, por lo que las recomendaciones generales para realizar el diagnóstico son el uso de criterios clínicos unidos a un test de laboratorio positivo que demuestre la presencia de estas toxinas. El test de mayor especificidad (97 a 100%) en el diagnóstico es la detección del efecto citopático de la toxina B en cultivos celulares (test de citotoxicidad) y ha sido considerado durante mucho tiempo como la técnica de referencia.<sup>1, 8, 10-12</sup> Sin embargo, sus desventajas son numerosas, ya que se trata de un test no estandarizado, requiere experiencia en la técnica del cultivo celular, infraestructura adecuada y un tiempo de procesamiento prolongado (48 a 72 horas). Por todas estas razones, desde 1990 se han introducido en el mercado un número importante de enzimo inmunoensayos (EIA) para la detección de la toxina A y para las toxinas A y B de *C. difficile*. Estos ensayos se correlacionan con el test de citotoxicidad en más de 90% de los casos, lo que indica que poseen una muy buena especificidad, pero es posible observar una importante variación en la sensibilidad descrita en la literatura, entre 53 y 100%,<sup>1-4, 8, 13, 14, 16</sup> además de un alto porcentaje de resultados indeterminados, hasta 19%.<sup>2</sup> De reciente desarrollo, las técnicas de biología molecular permiten detectar cantidades muy bajas de toxinas presentes en las deposiciones; sin embargo, requieren mayores estudios que permitan su estandarización y validación.

La presencia de leucocitos fecales en las mues-

tras con sospecha de DACD, ha sido utilizada en muchas ocasiones por los clínicos como un primer paso en el diagnóstico dada su amplia disponibilidad en los laboratorios clínicos hospitalarios; sin embargo, esta técnica ha demostrado tener un pobre valor predictivo,<sup>2</sup> con una sensibilidad descrita en la literatura inferior al 40%. Mejores resultados se han obtenido con la determinación de lactoferrina fecal con ensayos de aglutinación por látex (75% de sensibilidad).<sup>15</sup> La lactoferrina es un marcador leucocitario por lo que su detección por técnicas de látex sería menos subjetiva que la observación microscópica de leucocitos.

Basados en las divergencias que persisten en el diagnóstico de laboratorio de la DACD, la escasa información de experiencia nacional publicada al respecto y el número importante de inmunoensayos disponibles y utilizados en los laboratorios clínicos del país, en este estudio se evaluó la correlación entre cinco inmunoensayos y el test confirmatorio de citotoxicidad en el diagnóstico de laboratorio para la DACD, y la utilidad de los leucocitos fecales por microscopía y determinación de lactoferrina fecal para el diagnóstico de esta patología.

## MATERIAL Y METODO

Entre septiembre de 1997 y enero de 1998, se estudiaron en forma prospectiva las muestras de deposición de 60 pacientes internados en el Hospital Clínico de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Todos los pacientes presentaban un cuadro clínico compatible con diarrea por *C. difficile* (diarrea y antecedente de uso reciente de antibióticos) ya que fueron evaluados por uno de los autores, seleccionándose a aquellos pacientes con una alta probabilidad pre-test de presentar diarrea por antibióticos. Las muestras se estudiaron mediante cuatro inmunoensayos, 46 de ellas fueron estudiadas por un test adicional de reciente introducción (*Clostridium difficile* Tox A Oxoid®).

- ELISA Toxina A Meridian®: test de enzimoimmunoanálisis realizado en micropocillos. Utiliza un anticuerpo policlonal de captura anti toxina A de *C. difficile* y un segundo anticuerpo monoclonal anti toxina

A de *C. difficile* unido a un conjugado enzimático.

- ELISA Toxina A Becton Dickinson®: test de enzimoimmunoanálisis realizado en micropocillos. Utiliza un anticuerpo policlonal de captura anti toxina A de *C. difficile* y un segundo anticuerpo monoclonal anti toxina A de *C. difficile* unido a un conjugado enzimático.
- ELISA Toxina A y B TechLab®: test de enzimoimmunoanálisis realizado en micropocillos que utiliza un anticuerpo de captura policlonal anti toxina A y B. Los anticuerpos de detección corresponden a una mezcla de anticuerpo monoclonal anti toxina A y anticuerpo policlonal anti toxina B conjugados con peroxidasa.
- Immunocard Tox A Meridian®: ensayo tipo tarjeta, que utiliza un anticuerpo monoclonal específico para toxina A de *C. difficile*.
- *Clostridium difficile* Tox A Oxoid®: ensayo tipo tarjeta, que utiliza un anticuerpo monoclonal específico para toxina A de *C. difficile*. El procesamiento es sencillo, rápido y los controles de la reacción están incluidos en la misma tarjeta. Sólo 46 muestras pudieron ser procesadas por este método, ya que el volumen de muestra fue insuficiente.

La determinación de leucocitos fecales se realizó por microscopía convencional y la detección de lactoferrina fecal por un test de aglutinación en látex (Leukotest TechLab®). La lactoferrina es una proteína estable que sirve como marcador de los leucocitos presentes en las muestras de deposición. El test cuenta con partículas de látex recubiertas con anticuerpos anti lactoferrina que producen una reacción de aglutinación en presencia de muestras de deposición que contengan leucocitos.

Todas las muestras fueron procesadas antes de 24 horas, basado en las recomendaciones de cada fabricante.

El test de citotoxicidad busca detectar el efecto citopático de la toxina B de *C. difficile* sobre cultivos de fibroblastos humanos y la neutralización de tal efecto tras la incubación con la correspondiente antitoxina. En nuestro estudio se utilizó toxina y antitoxina disponible comercialmente (*Clostridium difficile* Toxin/Antitoxin

Kit. TechLab®) para el montaje de la técnica. Las muestras de deposiciones fueron refrigeradas a 4°C y procesadas antes de 24 horas (dilución en *buffer* fosfato salino, centrifugación y filtración). Las muestras fueron inoculadas en monocapas de fibroblastos humanos y se observaron a las 24 y 48 horas. El test positivo fue definido como la aparición de los efectos citopáticos característicos en más del 50% de la monocapa de células y todos los resultados positivos fueron verificados por la demostración de la neutralización del efecto citopático al agregar antitoxina específica.

## RESULTADOS

De las 60 muestras, 23 (38%) fueron positivas por el test de referencia de citotoxicidad para toxina B de *C. difficile*. La sensibilidad y especificidad para cada inmunoensayo fue calculada en relación a los resultados de test de citotoxicidad, pero para cada test se excluyeron los resultados indeterminados que son expresados en un porcentaje adicional (Tablas 1 a 5).

La sensibilidad y especificidad observada fueron respectivamente: para Toxina A Meridian® 95,7 y 78,8%, Toxina A Becton Dickinson®

**Tabla 1. Rendimiento del test ELISA Toxina A Meridian® versus el test de citotoxicidad**

	Citotoxicidad (+)	Citotoxicidad (-)	Total
ELISA A (+)	22	7	29
ELISA A (-)	1	26	27
Total	23	33	56*

\* Hubo 4 (6,7%) muestras indeterminadas por el test ELISA Toxina A Meridian®.

**Tabla 2. Rendimiento del test ELISA Toxina A Becton Dickinson® versus el test de citotoxicidad**

	Citotoxicidad (+)	Citotoxicidad (-)	Total
ELISA A (+)	23	2	25
ELISA A (-)	0	34	34
Total	23	36	59*

\* Hubo 1 (1,7%) muestra indeterminada por el test ELISA A Becton Dickinson®.

**Tabla 3. Rendimiento del test ELISA Toxina A y B TechLab® versus el test de citotoxicidad**

	Citotoxicidad (+)	Citotoxicidad (-)	Total
ELISA A+B (+)	21	5	26
ELISA A+B (-)	2	32	34
Total	23	37	60

**Tabla 4. Rendimiento del test Immunocard Tox A Meridian® versus el test de citotoxicidad**

	Citotoxicidad (+)	Citotoxicidad (-)	Total
Immunocard® (+)	20	2	22
Immunocard® (-)	3	35	38
Total	23	37	60

**Tabla 5. Rendimiento del test *Clostridium difficile* Tox A Oxoid® versus el test de citotoxicidad**

	Citotoxicidad (+)	Citotoxicidad (-)	Total
ELISA (+)	18	1	19
ELISA (-)	1	26	27
Total	19	27	46*

\* Sólo fue posible estudiar 46 muestras para este inmunoensayo.

100 y 94,4%, Toxina A/B TechLab® 91,3 y 86,5%, Immunocard ToxA Meridian® 87 y 94,6% y *C. difficile* Tox A Oxoid® 94,7 y 96,3% (Tabla 6).

Los test de ELISA para Toxina A Meridian® y ELISA Toxina A Becton Dickinson® presen-

taron resultados indeterminados, en 6,7 y 1,7%, respectivamente.

En relación a la determinación de leucocitos fecales por microscopia y de lactoferrina fecal, la sensibilidad y especificidad calculada para los test se describen en la Tabla 7.

**Tabla 6. Sensibilidad y especificidad para los 5 inmunoensayos evaluados\***

Test	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
Toxina A Meridian®	95,7	78,8
Toxina A Becton Dickinson®	100	94,4
Toxina A/B TechLab®	91,3	86,5
Toxina A Immunocard-Meridian®	87,0	94,6
Toxina A <i>C. difficile</i> Oxoid®	94,7	96,3

\* En comparación con el test de referencia de citotoxicidad.

**Tabla 7. Sensibilidad y especificidad de los leucocitos fecales por microscopia y test de latex en relación al test de referencia de citotoxicidad**

Test	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
Leucocitos fecales (microscopia)	57,1	53,3
Lactoferrina fecal TechLab®	69,6	61,1

## DISCUSION

*C. difficile* es una de las principales causas de diarrea en pacientes hospitalizados con una importante morbilidad asociada. Es el responsable de 15 a 20% de las diarreas asociadas al uso de antibióticos y de la mayoría de los casos de colitis pseudomembranosa. La diarrea nosocomial debido a infección por *C. difficile* es un problema real y de magnitud desconocida en nuestro país; de acuerdo a la literatura médica, es causal de 20 a 30% de las diarreas intrahospitalarias y afecta a 8% de los pacientes hospitalizados. En nuestra serie el porcentaje de positividad fue alto (38%) porque hubo una selección clínica de las muestras, escogiendo aquellas con una alta probabilidad pre-test: pacientes de mayor edad, mayor frecuencia y severidad de la diarrea y fiebre.

El diagnóstico de enfermedad asociada a *C. difficile* es habitualmente difícil, ya que no se ha logrado acuerdo sobre los criterios clínicos a usar que tengan el mejor valor predictivo y tampoco existe un test de laboratorio lo suficientemente sensible, específico y rápido para su diagnóstico.

La detección del efecto citopático de la toxina B de *C. difficile* en cultivos celulares tiene un alto valor predictivo en pacientes con características epidemiológicas y manifestaciones clínicas sugerentes. Ha sido considerada y utilizada ampliamente como la técnica de referencia; sin embargo, el tiempo de procesamiento que requiere, el costo, la experiencia del operador y sus dificultades en la estandarización, la hacen una técnica difícil de implementar en un laboratorio de rutina. Por ello se han desarrollado nuevos tests, entre los cuales los EIA han mostrado un concordancia mayor al 90% con el test de citotoxicidad. El problema se presenta al analizar el amplio rango de sensibilidad descrita en la literatura para los distintos inmunoensayos disponibles en el mercado. Consideramos relevante estudiar la correlación entre cinco inmunoensayos disponibles en Chile y el test de citotoxicidad en muestras de deposición de pacientes con sospecha clínica de DACD, junto con la utilidad de la determinación de leucocitos fecales por microscopía convencional en comparación con la determinación de

lactoferrina fecal en el diagnóstico de esta patología.

En base a los resultados obtenidos los tests más recomendables son Toxina A Becton Dickinson® y *C. difficile* Tox A Oxoid®. El primero es un test de ELISA que requiere un control positivo y uno negativo cada vez que se realiza la técnica, un lector espectrofotométrico para disminuir los resultados indeterminados y un tiempo de procesamiento de 100 minutos. El segundo es un ensayo tipo tarjeta de fácil procesamiento y lectura, con controles incluidos para cada determinación (permite el procesamiento uno a uno), que requiere de una microcentrífuga para la preparación de la muestra y de 45 minutos para su procesamiento. Por lo tanto, según el equipamiento, volumen de muestras a procesar y requerimientos de tiempo de respuesta de cada laboratorio, se debe establecer el tipo de inmunoensayo a utilizar.

La especificidad y sensibilidad que se observó para la determinación de leucocitos fecales resultó ser superior a la descrita en la literatura y para lactoferrina fecal similar. Metodológicamente, la determinación de lactoferrina fecal es más simple y fácil de determinar. Ambas determinaciones sólo indican el carácter inflamatorio de la diarrea, sin relación con el agente etiológico por lo tanto no se recomienda su uso como test discriminatorio en esta patología.

Dado que existen numerosos inmunoensayos para la detección rápida de toxina de *C. difficile* con sensibilidad y especificidad variables, es necesaria su evaluación por un método de referencia. Surge por lo tanto la necesidad de disponer de este método confirmatorio (test de citotoxicidad) para muestras positivas y/o indeterminadas cuando la clínica no es altamente sugerente de infección por *C. difficile*. El diagnóstico de DACD requiere entonces, de un complemento entre criterios clínicos con un alto valor predictivo y demostración, a través de un test de laboratorio, de la presencia de *C. difficile* toxigénico.

A las dificultades diagnósticas planteadas se agrega información reciente de caracterización de cepas de *C. difficile* Toxina A -negativa Toxina B- positiva, a través de técnicas de biología molecular, responsables de brotes

nosocomiales de DACD.<sup>17, 19, 21, 23</sup> Aunque anteriormente se había descrito su existencia, no se observó asociación clínica de importancia como la analizada en los casos más recientes. Estas cepas no son detectadas por los inmunoensayos para toxina A disponibles, pero sí por los tests para detección de toxina A + B. Ante estos hallazgos cabe plantearse la necesidad de realizar estudios epidemiológicos a través de técnicas de biología molecular<sup>18, 22, 23</sup> que permitan conocer nuestra realidad en relación a este patógeno y establecer medidas de control para evitar su transmisión nosocomial en pacientes con factores de riesgo o evitar el alto porcentaje de recurrencias (48,4%)<sup>20</sup> y reinfecciones observado. Para el diagnóstico de rutina a través de inmunoensayos, a la luz de estos casos, probablemente sea necesario el uso de tests que detecten la presencia de toxinas A y B paralelamente. En nuestro estudio no hubo muestras positivas por el test de citotoxicidad (toxina B) y por el inmunoensayo que detecta ambas toxinas (A + B) y negativas por los otros inmunoensayos que detectan sólo toxina A, por lo que creemos que al momento del presente estudio, este no sería un problema adicional en nuestro medio.

## RESUMEN

*Clostridium difficile* es el principal patógeno asociado a diarrea por uso de antibióticos y/o colitis pseudomembranosa en pacientes hospitalizados. El diagnóstico se basa en la sospecha clínica y presencia de un test de laboratorio positivo para la detección de toxina de *C. difficile*, considerándose como confirmatorio el test de citotoxicidad. Recientemente se han introducido variados inmunoensayos que permiten el diagnóstico rápido; sin embargo, presentan sensibilidad y especificidad variables por lo que requieren ser evaluados por el método de referencia. El objetivo de este trabajo fue evaluar la correlación entre cinco inmunoensayos y el test confirmatorio de citotoxicidad. Para esto se estudiaron las muestras de deposiciones de 60 pacientes hospitalizados con sospecha clínica de diarrea por *C. difficile* mediante 4 inmunoensayos: 3 ELISA (ToxA Meridian®,

Tox A Becton Dickinson® y Tox A + B TechLab®) y 1 ensayo inmunocromatográfico tipo tarjeta: Immunocard Tox A Meridian®. Cuarenta y seis muestras de las 60 se evaluaron por un test tipo tarjeta de reciente introducción: *C. difficile* ToxA Oxoid®. Como test confirmatorio se consideró el test de citotoxicidad. La sensibilidad y especificidad observadas fueron respectivamente: para ToxA Meridian® 95,7 y 78,8%, Tox A Becton Dickinson® 100 y 94,4%, Tox A + B TechLab® 91,3 y 86,5%, Immunocard Tox A Meridian® 87 y 94,6% y *C. difficile* ToxA Oxoid® 94,7 y 96,3%. De acuerdo a los resultados, los test más recomendables serían Tox A Becton Dickinson® y *C. difficile* ToxA Oxoid®. Según el equipamiento y requerimientos de tiempo de respuesta de cada laboratorio, se debe establecer el tipo de inmunoensayo a utilizar.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- KELLY C, POTHOUKAKIS C H, LAMONT J T. *Clostridium difficile* Colitis. N Engl J Med 1994; 330: 257-62.
- 2.- ANGLIM A., FARR B. M. Nosocomial diarrhea due to *Clostridium difficile*. Curr Opin Infect Dis 1994; 7: 602-8.
- 3.- DE GIROLAMI P C, HANFF P A, EICHELBERGER K. et al. Multicenter evaluation of a new enzyme immunoassay for detection of *Clostridium difficile* enterotoxin A. J Clin Microbiol 1992; 30: 1085-8.
- 4.- BARBUT F, KAJZER C H, PLANAS N. et al. Comparison of three enzyme immunoassays, a cytotoxicity assay, and toxigenic culture for diagnosis of *Clostridium difficile* -associated diarrhea. J Clin Microbiol 1993; 31: 963-7.
- 5.- EL-GAMMAL A, SCOTTO V, MALIK S. et al. Evaluation of the clinical usefulness of *Clostridium difficile* toxin testing in hospitalized patients with diarrhea. Diagn Microbiol Infect Dis 2000; 36: 169-73.
- 6.- SCHLEUPNER M A, GARNER D C, SOSNOWSKI K M et al. Concurrence of *Clostridium difficile* toxin A enzyme-linked immunosorbent assay, fecal lactoferrin assay, and clinical criteria with *C. difficile* cytotoxin titer in patient cohorts. J Clin Microbiol 1995; 33: 1755-9.
- 7.- FEKETY R, MACFARLAND L, SURAWICZ CH et al. Recurrent diarrhea: characteristics of and risk factors for patients enrolled a prospective, randomized, double-blinded trial. Clin Infect Dis 1997; 24: 324-33.
- 8.- PETERSON L, KELLY P. The role of the clinical

- microbiology laboratory in the management of *Clostridium difficile* -associated diarrhea. Infect Dis Clin North Amer 1993; 7 (2): 277-93.
- 9.- JOHNSON S, GERDING D. *Clostridium difficile* - associated diarrhea. Clin Infect Dis 1998; 26: 1027-36.
  - 10.- RENSHAW A, STELLING J, DOOLITTLE M. The lack of repeated *Clostridium difficile* cytotoxicity assay. Arch Pathol Lab Med 1996; 120: 49-52.
  - 11.- KATZ D, LYNCH M E, LITTENBERG B. Clinical prediction rules to optimize cytotoxin testing for *Clostridium difficile* in hospitalized patients with diarrhea. Am J Med 1996; 100: 487-95.
  - 12.- DOERN G, COUGHLIN R, WU L. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile*-associated gastrointestinal disease: comparison of a monoclonal antibody enzyme immunoassay for toxin a only two cytotoxicity assays. J Clin Microbiol 1992; 30: 2042-6.
  - 13.- ALDEEN W, BINGHAM M, AIDERZADA A. et al. Comparison of the tox A/B to a cell culture cytotoxicity assay for the detection of *Clostridium difficile* in stools. Diagn Microbiol Infect Dis 2000; 36: 211-3.
  - 14.- WOLFF M. Diarrea asociada a antibióticos: ¿Un mal inevitable?. Rev Chil Infectol 1996; 13 (2): 69-74.
  - 15.- YONG W, MATTIA A, FERRARO M J. Comparison of fecal lactoferrin latex agglutination assay and methylene blue microscopy for detection of fecal leukocytes in *Clostridium difficile* -associated disease J Clin Microbiol 1994; 32 (5): 1360-1.
  - 16.- FEDORKO D, ENGLER H, O'SHAUGHNESSY E et al. Evaluation of two rapid assay for detection of *Clostridium difficile* toxin A in stool specimens. J Clin Microbiol 1999; 37(9): 3044-7.
  - 17.- LYERLY D, NEVILLE L, EVANS D et al. Multicenter evaluation of the *Clostridium difficile* Tox A/B test. J Clin Microbiol 1998; 36(1): 184-90.
  - 18.- TITOV L, LIBEDKOVA N, SHABANOV A et al. Isolation and molecular characterization of *Clostridium difficile* strains from patients and the hospital environment in Belarus. J Clin Microbiol 2000; 38(3): 1200-2.
  - 19.- LIMAYE A, TURGEON D, COOKSON B et al. Pseudomembranous colitis caused by a Toxin A<sup>-</sup> B<sup>+</sup> strain of *Clostridium difficile*. J Clin Microbiol 2000; 38(4):1696-7.
  - 20.- BARBUT F, RICHARD A, HAMADI K et al. Epidemiology of recurrences or reinfections of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. J Clin Microbiol 2000; 38(6): 2386-8.
  - 21.- ALFAN M., KABANI A., LYERLY D. et al. Characterization of a Toxin A-negative, Toxin B-positive strain of *Clostridium difficile* responsible for a nosocomial outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. J Clin Microbiol 2000; 38(7) 2706-14.
  - 22.- BIDE T P H. LALANDE V, SALAUZE B et al. Comparison of PCR-ribotyping, arbitrarily primed PCR, and pulsed-field gel electrophoresis for typing *Clostridium difficile*. J Clin Microbiol 2000; 38(7): 2484-7.
  - 23.- MONCRIEF J S, ZHENG L, NEVILLE L et al. Genetic characterization of Toxin A-negative, Toxin B-positive *Clostridium difficile* isolates by PCR. J Clin Microbiol 2000; 38(8): 3072-5.

Correspondencia a:

Patricia García Cañete  
Laboratorio de Microbiología  
Centro Médico San Joaquín  
Universidad Católica de Chile  
Av. Vicuña Mackenna 4686, Macul  
Santiago, Chile  
e-mail:pgarcia@med.puc.cl