

DOCUMENTOS TÉCNICOS PARA EL LABORATORIO CLÍNICO

DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE *Clostridium difficile*

DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

DE *Clostridium difficile*

AUTORES

TM. Roberto Flores Reyes.

Encargado de Laboratorio de Agentes Emergentes y Zoonóticos.
Sección Bacteriología, Subdepto. Enfermedades Infecciosas.
Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia
Instituto de Salud Pública de Chile.

TM. Oscar Duery Alzerreca.

Laboratorio de Agentes Emergentes y Zoonóticos.
Sección Bacteriología, Subdepto. Enfermedades Infecciosas.
Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia.
Instituto de Salud Pública de Chile.

REVISORES INTERNOS

Dr. Juan Carlos Hormazabal Opazo.

Jefe de Subdepartamento de Enfermedades Infecciosas.
Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia.
Instituto de Salud Pública de Chile.

BQ. Pamela Araya Rodríguez.

Jefe Sección Bacteriología, Subdepto. Enfermedades Infecciosas.
Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia
Instituto de Salud Pública de Chile.

Dra. Verónica Ramírez Muñoz

Jefe Subdepartamento Coordinación Externa.
Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia
Instituto de Salud Pública de Chile.

REVISORES EXTERNOS

Dr. Leonardo Chanqueo Cornejo

Jefe Infectología – Laboratorio Microbiología
Hospital San Juan de Dios

DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE *Clostridium difficile*

1. ALCANCE Y OBJETIVOS

Este documento de recomendaciones técnicas está dirigido a los laboratorios clínicos de la red asistencial que realizan el diagnóstico de la infección por *Clostridium difficile*. Tiene como finalidad entregar la información y las estrategias necesarias para optimizar el estudio de la infección por este microorganismo.

2. INTRODUCCION

Clostridium difficile (CD), es un bacilo gram positivo anaerobio estricto, altamente patógeno por su capacidad de producir esporas resistentes al calor y a la desecación, toxinas tales como toxina A (enterotoxina), toxina B (citotoxina), factores de adhesión y potentes enzimas como hialuronidasas. Fue identificado en 1935 por Hall y O' toole como microbiota comensal en recién nacidos y en 1978 Barlett y colaboradores demostraron su papel etiológico en la colitis pseudomembranosa.

Este agente ha sido aislado del medio ambiente (suelo, arena, heno) y en animales de granja, animales salvajes y domésticos, tales como perros y gatos. En el ser humano está presente en un 50% de los recién nacidos y lactantes durante el primer año de vida y en un 3 a 5% en la población adulta como parte de la microbiota intestinal. Estas cifras aumentan en los pacientes hospitalizados a un 25% que presentan tratamiento prolongado con antibióticos de amplio espectro, además de aquellos pacientes inmunosuprimidos, con enfermedades crónicas o con edad sobre 65 años, siendo estos últimos los más susceptibles a la infección.

La infección por CD es una de las principales causas de diarrea nosocomial en todos los hospitales del mundo, debido a su capacidad de esporulación y

diseminación. La enfermedad asociada a *Clostridium difficile* (EACD) abarca síntomas de diversa gravedad, desde diarreas acuosas leves a moderadas, náuseas, fiebre, distensión abdominal, dolor e inflamación intestinal grave con hemorragias, formación de pseudomembranas hasta perforación de colon con desenlace fatal en el 1% de los casos. El tratamiento de la EACD se realiza con la administración oral de metronidazol o vancomicina y reposición de electrolitos e hidratación del afectado.

En las últimas décadas se ha observado aumento en las tasas de infección, morbilidad y mortalidad asociadas con esta infección. En regiones tan diversas como Europa, Canadá, Estados Unidos y parte de América latina. La alta virulencia de estas cepas se atribuye a cambios genéticos por delección del gen regulador de la producción de toxinas (*tcdC*), aumentando 20 veces más los niveles de ambas toxinas A y B.

El análisis genético de estos aislamientos mediante electroforesis de campo pulsado (PFGE), análisis de endonucleasas de restricción (REA) y ribotipificación, denominó a esta cepa NAP1/BI/027. La letalidad descrita en los brotes es de 7 a 11%, lo que obliga a mantener sistemas de monitoreo epidemiológico y manejo de aislamientos especiales dentro de los recintos hospitalarios.

En Chile, a partir del año 2010 se observó un aumento brusco del número de brotes intrahospitalarios. El análisis genético de los aislamientos demostró el predominio del clon 001 que corresponde a una variante del clon NAP1. Debido a estas características y a la permanente vigilancia de las infecciones asociadas a atención de salud (IAAS), el Instituto de Salud Pública de Chile realiza el estudio microbiológico, de susceptibilidad y genético de acuerdo al Oficio 709 del año 2012.

3. SIGNIFICADO DE ABREVIACIONES Y DEFINICIONES

CD: *Clostridium difficile*.

EACD: Enfermedad asociada a *Clostridium difficile*.

PFGE: Electroforesis de campo pulsado.

REA: Análisis de endonucleasas de restricción.

IAAS: Infecciones asociadas a atención de salud.

GDH: Glutamato deshidrogenasa.

CCFA: Cicloserin Cefoxitin Fructosa Agar.

PCR: Reacción de la polimerasa en cadena.

MALDI-TOF: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight (Desorción/ionización mediante láser asistida por Matriz – Tiempo de Vuelo).

EIA: Enzimoimmunoensayo.

MLST: multi-locus sequence typing (Tipificación de secuencias multilocus).

4. DESARROLLO

Pruebas de laboratorio

Las pruebas disponibles para la detección de CD no logran discriminar una colonización asintomática de un cuadro infeccioso, por lo tanto el diagnóstico de laboratorio debe realizarse solo en pacientes sintomáticos con diarrea y/o dolor abdominal, acompañados de leucocitosis y fiebre, con excepción de casos de íleo paralítico o megacolon tóxico donde puede no estar presente la diarrea.

El cultivo de deposición es la prueba más sensible, pero con un tiempo de respuesta mayor que otras pruebas, sin embargo, el aislamiento e identificación de una cepa toxigénica le otorga un rendimiento mayor y es de suma importancia para estudios epidemiológicos.

En relación a las pruebas de detección de antígenos o productos de CD se dispone del ensayo de citotoxicidad, una prueba referente e importante clínicamente, pero es obstaculizada por su falta de sensibilidad.

Las pruebas rápidas para detección de toxinas A y B son menos sensibles que el ensayo de citotoxicidad. Además, se encuentra disponible la detección

de glutamato deshidrogenasa (GDH) útil como prueba inicial dentro de las estrategias de diagnóstico. La metodología para la detección rápida de ambos tipos de proteínas va desde técnicas de inmunocromatografía hasta enzimoimmunoensayos con lectura espectralométrica o de quimioluminiscencia.

Las pruebas basadas en la detección de ácidos nucleicos son rápidas, sensibles y específicas, y cada vez más accesibles para los laboratorios de rutina.

Muestra

Para el diagnóstico de EACD la muestra adecuada debe ser deposición recién emitida, diarreica, acuosa o no formada. La muestra debe almacenarse en un recipiente de cierre hermético, estéril, de boca ancha, sin medio de transporte o conservantes, en una cantidad mínima aproximada de 5 a 10 gramos.

No se recomienda tomar más de una muestra durante un mismo episodio de diarrea, ya que no aumenta el rendimiento de los métodos diagnósticos. Tampoco se recomienda analizar las muestras de pacientes con diagnóstico previo de EACD para control pos tratamiento.

Las muestras deben enviarse al laboratorio de forma inmediata para su análisis o conservarse en refrigeración (2-8°C) hasta 72 horas. En caso de almacenamiento prolongado debe conservarse a -20°C o menos.

Detección de glutamato deshidrogenasa (GDH)

GDH es una enzima denominada también Antígeno Común producida por CD. A pesar que otras bacterias expresan una enzima similar, los inmunoensayos comerciales actuales utilizan anticuerpos monoclonales que le otorgan una sensibilidad y especificidad elevada. La sensibilidad y especificidad de los ensayos actuales es de 85 a 95% y 89 a 99% respectivamente.

La GDH es más estable que las toxinas y puede detectarse en cepas toxigénicas y no toxigénicas. Además, presentan un alto valor predictivo negativo, pero un bajo valor predictivo positivo. Esta prueba es de utilidad para la detección rápida cuando se combina con un método de detección de toxinas.

Detección de toxinas por inmunoensayos.

Las pruebas comerciales disponibles son rápidas y de bajo costo, pueden detectar directamente solo la toxina A, las toxinas A+B o A y B individualmente. Es posible encontrar métodos inmunoenzimáticos con una sensibilidad de 65-85% y especificidad de 95 hasta 100% y métodos inmunocromatográficos con sensibilidad de 87-90% y especificidad de 90-98%. Además, existen pruebas inmunocromatográficas que incorporan la detección del antígeno GDH lo que favorece el rendimiento del ensayo detectando el microorganismo y sus toxinas.

Las muestras se deben procesar antes de 2 horas, posterior a este tiempo sucede proteólisis de las toxinas pudiendo interpretarse los resultados como falsos negativos.

La mayoría de los laboratorios han adoptado estas pruebas debido a su rapidez y bajo costo, sin embargo, los últimos análisis de evaluación y rendimiento demuestran que la detección de toxinas por estas metodologías no pueden ser utilizadas de forma aislada para el diagnóstico y actualmente, no se recomiendan para el estudio de EACD.

Ensayo de citotoxicidad

Esta prueba permite detectar la toxina B preformada de CD en deposición, basada en la observación del efecto citopático producido por las toxinas B y neutralización de este efecto con antisueros. Requiere la mantención de líneas celulares, por lo tanto es una técnica costosa y laboriosa con obtención resultados entre 24 a 72 horas. Debido a que la toxina B es termolábil se ve afectada la sensibilidad de la técnica, por lo tanto la muestra debe procesarse lo antes posible.

Fue considerada tradicionalmente como el gold estándar, siendo desplazada últimamente por el cultivo toxigénico debido a su mejor sensibilidad.

La especificidad del ensayo de citotoxicidad es de un 100%, por lo que un resultado positivo siempre se asocia a infección, sin embargo su sensibilidad se ha informado en un rango de 67 a 100%.

Detección de ácidos nucleicos

En los últimos años se han implementado en los laboratorios ensayos de detección de ácidos

nucleicos, ya que son técnicas rápidas y de una alta sensibilidad y especificidad. Entre los métodos disponibles están la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) en tiempo real y últimamente se ha instalado el método de LAMP (Loop mediated isothermal amplification). En general, los métodos de PCR detectan secuencias del gen de la toxina B (*tcdB*), también algunos detectan regiones conservadas del gen *tcdA*.

Estos métodos han demostrado poseer una sensibilidad mayor al 90% y una especificidad entre un 94% y 99%, según el tipo de método. El resultado positivo en un paciente sintomático puede indicar infección o en menor probabilidad una colonización de CD. Un resultado negativo descarta la infección. La detección de ácidos nucleicos por sí sola comúnmente determina sobre diagnóstico, por lo tanto mayor utilización de tratamiento y costos en salud.

Cultivo Toxigénico

Es una metodología que tiene una alta sensibilidad y especificidad, que consiste en el cultivo de la muestra de deposición en medios selectivos y enriquecidos, para luego determinar la toxicidad del aislamiento obtenido. CD crece en medios selectivos y enriquecidos, el más usado es el Cicloserin Cefoxitin Fructosa Agar (CCFA) con o sin sangre, también se encuentran disponibles actualmente medios cromogénicos comerciales. Para mejorar la selectividad de la técnica, la muestra se somete previamente a un shock etanólico, se incuba en ambiente anaeróbico por 48 horas en un rango de temperaturas que va de los 25 y los 45° C siendo 30-37° C su temperatura óptima de crecimiento.

El procedimiento consiste en traspasar 2 a 3 ml o gramos de la muestra homogenizada de deposición a un tubo limpio y se agrega la misma cantidad de alcohol de 95°, dejar a temperatura ambiente por 30 a 60 minutos agitando cada 15 minutos y posteriormente cumplido este tiempo se siembra en un medio selectivo para CD.

Se almacena el resto de deposición en refrigeración hasta 72 horas (2-8°C). Si se realizará determinación de toxina la muestra se puede separar a otro frasco o tubo y almacenar a -20° C para conservar la toxina.

Las placas son incubadas por 48 horas a 35°C en anaerobiosis, se revisan las placas, el aislamiento se realiza bajo lupa estereoscópica según cantidad y pureza del cultivo. En medios con sangre las colonias alcanzan un tamaño 2 a 5 mm de diámetro, pueden ser de color blanca o amarillentas, no presentan hemólisis, son planas o levemente convexas, pueden ser circulares o rizoides, opacas y de aspecto granuloso (Imagen 1), poseen un olor característico a estiércol debido a la producción de un compuesto orgánico volátil llamado paracresol y muestran fluorescencia bajo la luz UV.

Al microscopio se observan en su forma vegetativa bacilos gram positivos de 0.5 mm de ancho por 3 a 6 mm de largo, presentan esporas en posición subterminal o libres de formas ovaladas que pueden teñirse de color verde claro con bordes azul-rojizos al gram (Imagen 2).

Imagen 1.

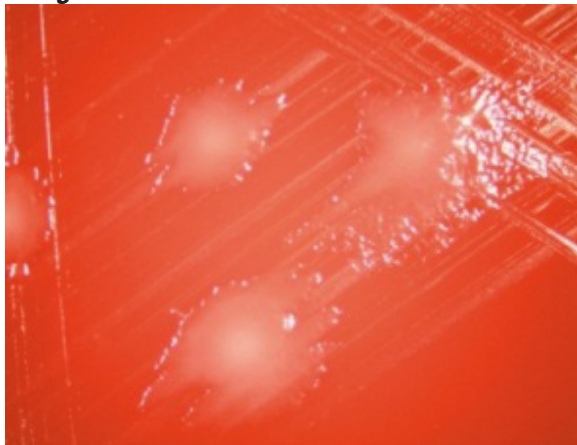
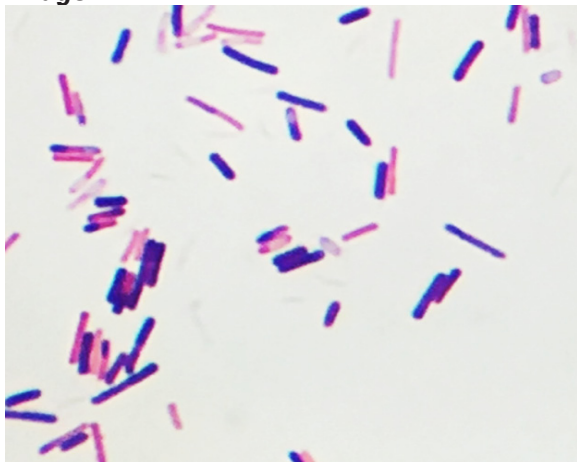


Imagen 2.



Fuente: Laboratorio de Agentes Emergentes y Zoonóticos. Sección Bacteriología. ISP

Si se encuentra algún tipo de colonia sospechosa, se debe realizar la identificación mediante alguna de las metodologías disponibles como la, detección de GDH, galerías bioquímicas comerciales o espectrometría de masas (MALDI-TOF). Las pruebas bioquímicas tradicionales incluyen lipasa, lecitinasa, hidrólisis de gelatina, hidrólisis de esculina y fermentación de manitol (Tabla 1.). Si no hay colonias sospechosas se emite informe como “No hubo desarrollo de *C. difficile*”

A partir de las colonias se puede realizar la determinación de toxinas mediante ensayo de citotoxicidad, inmunoensayos rápidos o de amplificación molecular.

Existe la posibilidad de presencia de cepas toxigénicas y no toxigénicas, u observar diferentes fenotipos en un mismo cultivo por lo que es recomendable realizar la detección de toxinas simultáneamente sobre diversas colonias de la placa con el fin de detectar la cepa productora de toxinas.

A pesar de que es una técnica de alto rendimiento, es laboriosa y requiere personal entrenado. Es de utilidad para evaluar la implementación de nuevas técnicas de rutina, permite tipificar y conocer la susceptibilidad antimicrobiana de la cepa para estudios epidemiológicos.

Tabla 1.

Características bioquímicas de *C. difficile*.

Prueba	Resultado
Hidrólisis gelatina	Positivo (reacción débil)
Hidrólisis de esculina	Positivo
Lipasa	Negativo
Lecitinasa	Negativo
Manitol	Positivo

Tabla 2.

Técnicas disponibles para el diagnóstico de EACD

Prueba de laboratorio	Sensibilidad	Especificidad	Disponibilidad	Producto detectado
Gold estándar				
Cultivo Toxigénico	Alta	Baja	Limitada	C. difficile toxigénico
Ensayo de citotoxicidad	Alta	Alta	Limitada	Toxinas A o B
Pruebas rápidas				
GDH	Alta	Baja	Amplia	GDH (antígeno común C. difficile)
Detección de toxinas por inmunoensayos.	Baja	Moderada	Amplia	Toxinas A o B
Ácidos nucleicos	Alta	Baja/moderada	Limitada por costo	Genes tcdA, tcdB o tcdC

Fuente: Chen S and cols. Rapid detection of Clostridium difficile toxins and laboratory diagnosis of Clostridium difficile infections. Infection. 2016

Algoritmos diagnósticos

Los algoritmos de trabajo surgen como una estrategia para mejorar la eficiencia del diagnóstico de EACD, integrando las ventajas de cada metodología disponible, ya que estas por si solas no han demostrado un rendimiento suficientemente óptimo.

La prueba de GDH posee una alta sensibilidad, pero no buena especificidad, lo que la hace una buena opción como prueba de tamizaje, la que combinada con pruebas más específicas como detección de toxinas o sus genes aumenta el rendimiento y optimiza los costos del proceso de diagnóstico de laboratorio de la EACD.

Los algoritmos deben seleccionarse según las características de las técnicas disponibles, evaluación costo beneficio en el laboratorio, y tiempo de respuesta de las pruebas realizadas.

Se pueden mencionar cinco algoritmos recomendados por el laboratorio de referencia según la información obtenida en la literatura (Figuras 1-5). Es importante destacar que el diagnóstico microbiológico debe siempre ser seguido por una cuidadosa interpretación clínica de los resultados.

Algoritmos de trabajo recomendados

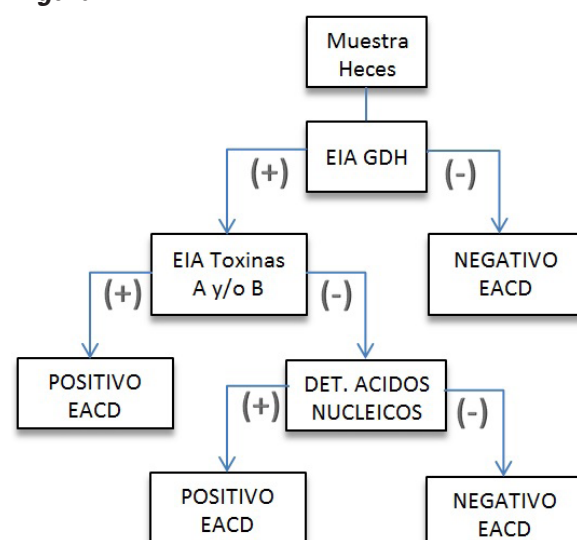
Figura 1

Figura 2

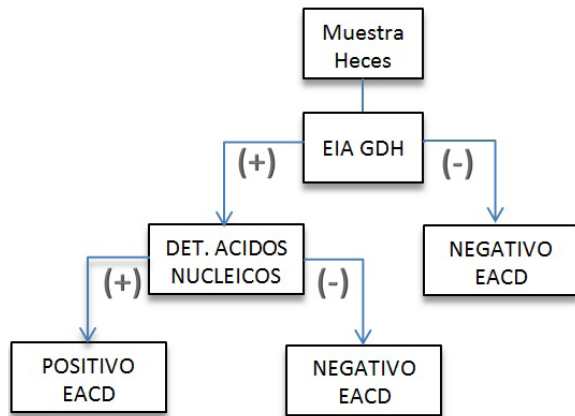


Figura 5

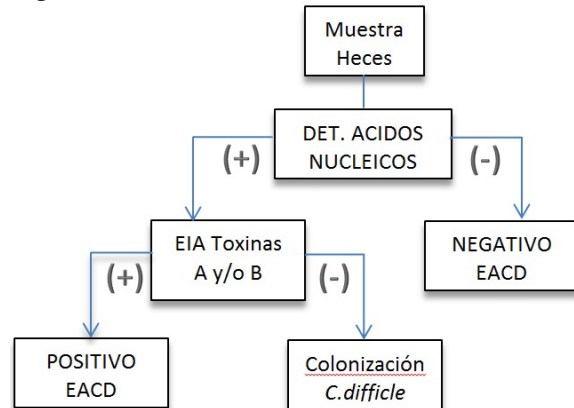


Figura 3

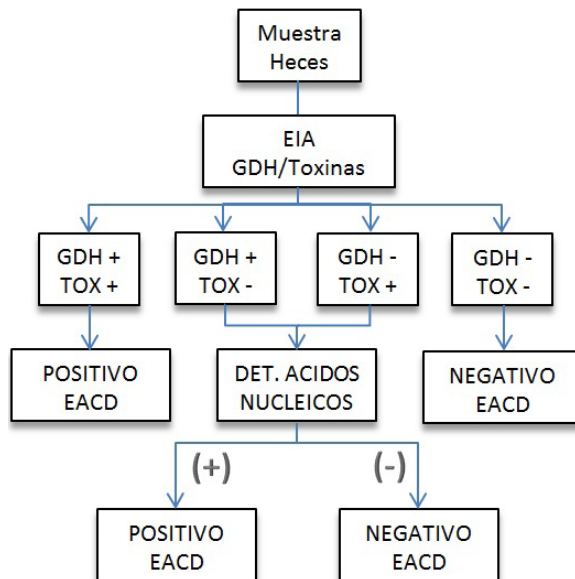
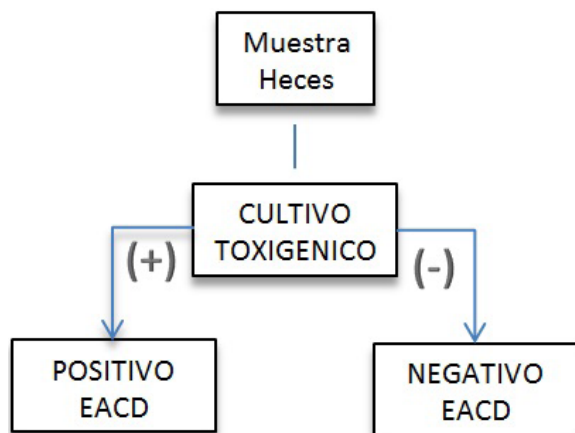


Figura 4



Caracterización molecular de aislamientos de *C. difficile*

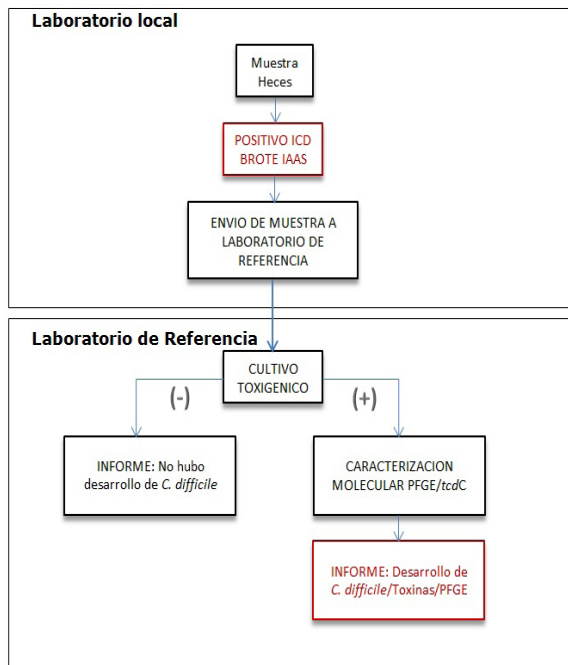
Las muestras de deposiciones con resultado positivo correspondientes a casos notificados e investigados por brote de infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS), deben ser derivadas al laboratorio de referencia para cultivo toxigénico y caracterización molecular según Oficio N° 709/2012 Estudio de brotes *C. difficile*.

El laboratorio de referencia del ISP dispone con las técnicas para la caracterización molecular y estudio filogenético de CD: Electroforesis de Campo Pulsado (PFGE), Ribotipificación, Tipificación de Secuencias de Multilocus (MLST) y Secuenciación masiva de genoma.

Los aislamientos de CD recuperados son tipificados mediante PFGE, y para de identificar cepas hipervirulentas se realiza la amplificación y secuenciación del gen regulador de la producción de toxinas (*tcdC*).

Los aislamientos estudiados por PFGE se identifican según nomenclatura de base de datos ISP con las siglas CL-CDF-SMA. El análisis molecular ha demostrado que el subtipo genético más importante en nuestro país y que presentan la delección de 18 nucleótidos en el gen *tcdC* es CL-CDF-SMA-001.

Figura 6.
Estudio de brotes de *C. difficile*



REFERENCIAS

1. Stuart H. Cohen, MD; Dale N. Gerding, MD; Stuart Johnson, MD; Ciaran P. Kelly, MD; Vivian G. Loo, MD; L. Clifford McDonald, MD; Jacques Pepin, MD; Mark H. Wilcox, MD. Clinical Practice Guidelines for Clostridium difficile Infection in Adults: (2010) Update by the Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA) and the Infectious Diseases Society of America (IDSA). *Infect Control Hosp Epidemiol* 2010; 31(5):431-455.
2. Cristian Hernández-Rocha, Sebastián Naour, Manuel Álvarez-Lobos y Daniel Paredes-Sabja. (2012) Infecciones causadas por Clostridium difficile: una visión actualizada. *Rev Chilena Infectol* 2012; 29 (4): 434-445.
3. Marta Pérez, Ana I. Hurtado, Ignacio Couto, José M^a Gutiérrez, Leticia Seoane, José M. Suárez y Rita Galeiras. (2013). Abordaje multidisciplinario de la infección por Clostridium difficile. *Rev Chilena Infectol* 2013; 30 (2): 165-185
4. Luis Alcalá Hernández, Mercedes Marín Arriaza, Ana Mena Ribas, Jordi Niubó Bosh. Diagnóstico microbiológico de la infección por Clostridium difficile. (2015). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
5. A Practical Guidance Document for the Laboratory Detection of Toxigenic Clostridium difficile. American Society for Microbiology. September 21, 2010.
6. Bruno Hubert, Vivian G. Loo, Anne-Marie Bourgault, Louise Poirier, André Dascal, Elise Fortin, Marc Dionne, and Manon Lorange. A Portrait of the Geographic Dissemination of the Clostridium difficile North American Pulsed-Field Type 1 Strain and the Epidemiology of C. difficile-Associated Disease in Québec. *Clinical Infectious Diseases* 2007; 44:238-44.
7. Adrián Camacho-Ortiz, Alfredo Ponce-de-León y José Sifuentes-Osornio. (2009). Enfermedad asociada a Clostridium difficile en América Latina. Artículo de revisión. Recuperado de <http://new.medigraphic.com/cgi-bin/medigraphic.cgi>.
8. Fred C. Tenover, Ellen Jo Baron, Lance R. Peterson, and David H. Persing. Review: Laboratory Diagnosis of Clostridium difficile Infection Can Molecular Amplification Methods Move Us Out of Uncertainty?. *The Journal of Molecular Diagnostics*, Vol. 13, No. 6, 2011.
9. M. J. T. Crobach, O. M. Dekkers, M. H. Wilcox and E. J. Kuijper. (2009). European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): Data review and recommendations for diagnosing Clostridium difficile-infection (CDI).
10. Jhon Walter Zea y Clara Lina Salazar. (2012). Enfermedad asociada a Clostridium difficile: prevalencia y diagnóstico por laboratorio. *Infectio*. 2012;16(4):211-222
11. Instituto de Salud Pública. Departamento Laboratorio Nacional y de Referencia. 2012. Oficio N° 0709. Estudio de brotes C difficile.

12. Aguayo C., Flores R., Lévesque S., Araya P, Ulloa S., Lagos J., Hormazabal J. C., Tognarelli J., Ibáñez D., Pidal P., Duery O., Olivares B. and. Fernández J. (2015). Rapid spread of *Clostridium difficile* NAP1/027/ST1 in Chile confirms the emergence of the epidemic strain in Latin America. *Epidemiol. Infect.*
13. Bouza E., Alcalá L., Reigadas E. Optimizing the diagnostic testing of *Clostridium difficile* infection. *Expert Rev Anti Infect Ther.* (2016) Sep; 14(9):801-8.
14. Polage CR., Gyorke CE., Kennedy MA., Leslie JL., Chin DL., Wang S., Nguyen HH., Huang B., Tang YW., Lee LW., Kim K., Taylor S., Romano PS., Panacek EA., Goodell PB., Solnick JV., Cohen SH. Overdiagnosis of *Clostridium difficile* Infection in the Molecular Test Era. *JAMA Intern Med.* (2015) Nov; 175 (11):1792-801.
15. Chen S., Gu H., Sun C., Wang H., Wang J. Rapid detection of *Clostridium difficile* toxins and laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infections. *Infection.* (2016) Sep 6.
16. Martin et al. *Clostridium difficile* infection: epidemiology, diagnosis and understanding transmission. *Nature Reviews | Gastroenterology & Hepatology.* (2016).25.
17. Plaza A., Barra J., Macias J. H., Carman R., Fawley W. N., Wilcox M. H., Hernández C., Guzmán A. M., Alvarez M. and Paredes D. Predominance of *Clostridium difficile* ribotypes 012, 027 and 046 in a university hospital in Chile, 2012. *Epidemiol. Infect.* (2016), 144, 976–979.
18. Mac Aogáin M., Moloney G., Kilkenny S., Kelleher M., Kelleghan M., Boyle B., Rogers TR. Whole-genome sequencing improves discrimination of relapse from reinfection and identifies transmission events among patients with recurrent *Clostridium difficile* infections. *Hosp Infect.* (2015) Jun;90(2):108-16.