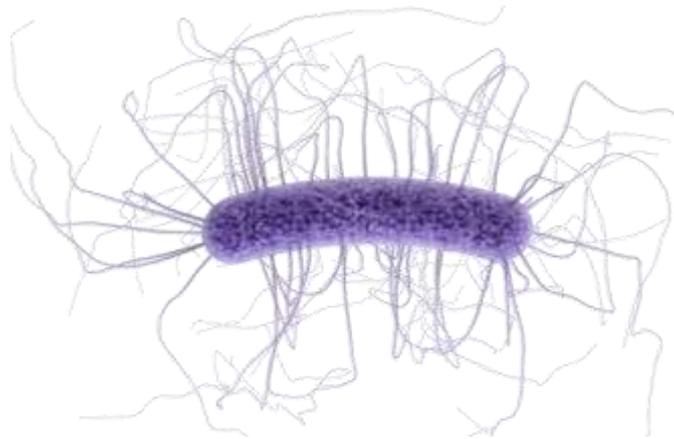


UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
FACULTAD DE CIENCIAS

*Departamento de Microbiología, Medicina Preventiva y Salud
Pública*

Área de Microbiología

Tipado molecular y análisis de episodios de recurrencia en la infección por *Clostridium difficile*



Trabajo de fin de grado de Biotecnología

Paula Álvarez González

Directora: Dra. Cristina Seral

Codirectora: Ines Valledor

Zaragoza 2017

INDICE

Resumen	3
Abstract	3
Introducción	4
Relevancia del tema en la actualidad	4
Historia	4
Patogenia	5
Determinantes de patogenicidad	5
Respuesta inmune del huésped	5
Epidemiología	5
Diagnóstico	7
Técnicas de referencia	7
Técnicas inmunoenzimáticas	8
Técnicas de detección de ácidos nucleicos	8
Algoritmos diagnósticos	9
Tipado molecular	9
Ribotipado	9
Tratamiento	10
Sensibilidad a antibióticos	10
Materiales y métodos	10
Técnicas de diagnóstico microbiológico	10
Cultivo toxigénico	11
Siembra por agotamiento	11
Técnicas de identificación	12
Enzoinmunoensayo para la detección de GDH	12
MALDI-TOF MS	12
RT-PCR (VIASURE)	12
Ensayo GenoType CDiff	13
Pruebas bioquímicas (API 20A)	14
Epidemiología molecular	14
Ribotipado	14
Sensibilidad a antibióticos	15
Método de difusión en disco	15
Detección de determinantes de patogenicidad	15
Detección de la toxina B	15
Resultados y discusión	16
Conclusiones	23
Bibliografía	24

Resumen

- Introducción: La infección por *Clostridium difficile* (ICD) es la principal causa de diarrea nosocomial infecciosa en los países desarrollados. La introducción del ribotipo 027 recientemente en España alerta la posible diseminación rápida de cepas hipervirulentas en nuestros hospitales aumentando el número de pacientes con fracaso terapéutico por recurrencia.
- Material y métodos: Se han estudiado los aislamientos recogidos en un hospital terciario durante 2016 tras la implantación de un algoritmo escalonado (detección de GDH; detección de toxinas A/B, PCR-RT) realizando su tipificación mediante ribotipado y estudiando los determinantes de virulencia de las cepas ribotipo 027 seleccionadas y la sensibilidad a los antibióticos.
- Resultados y Discusión: La prevalencia de ICD en pacientes que lo solicitan fue del 6.62% en 2016. Obtuvimos el mayor porcentaje de cepas del ribotipo 126 (30,9%), seguido del 014 (22,5%), 001 (18,3%) y 027 (7,04) siendo el ribotipo 027 el más virulento. La toxina B estaba presente en todas las cepas mientras que la toxina binaria se encontró en dos de las cepas estudiadas siendo ambas resistentes a moxifloxacino.
- Conclusión: Poder realizar ribotipado de las cepas capacita al laboratorio a clasificar las recurrencias de CD como recidivas (cepa diferente) o recaídas (misma cepa) con un componente clínico importante en cuanto a la selección del tratamiento adecuado.
- Palabras clave: *Clostridium difficile*, diagnóstico, ribotipo, recidivas, antibióticos.

ABSTRACT

- Introduction: Infection caused by *Clostridium difficile* (ICD) is the main cause of infectious nosocomial diarrhea in the developed world. The recent apparition of the 027 ribotype in Spain alerts of the possible rapid spread of hypervirulent strains in Spanish hospitals, increasing the number of patients with recurrent therapeutic failure.
- Materials and methods: Samples collected at a tertiary hospital during 2016 were analysed after the implementation of a stepwise algorithm (detection of GDH, detection of A/B toxins, RT-PCR). Selected 027 strains were typified by ribotyping and their sensitivity to antibiotics and virulence determinants were studied.
- Results and Discussion: The incidence of CD in tested patients was 6.62% in 2016. We obtained the highest percentage of ribotype 126 strains (30.9%), followed by 014 (22.5%), 001 (18.3%) and 027 (7.04), being ribotype 027 the most virulent. Toxin B was found to be present in all strains while the binary toxin was found in two of the studied strains, both being resistant to moxifloxacin.
- Conclusion: Being able to ribotype the strains enables the laboratory to classify repeated ICD infections as recurrences (different strain) or relapses (same strain) which in turn affects the selection of the most appropriate treatment.
- Key words: *Clostridium difficile*, diagnosis, ribotype, recurrences, antibiotics.

Introducción

RELEVANCIA DEL TEMA EN LA ACTUALIDAD Y OBJETIVOS DEL TRABAJO

Clostridium difficile es el principal agente causal de diarrea nosocomial de origen infeccioso en adultos en los países desarrollados. Recientemente ha habido un incremento de su incidencia y virulencia, con la consiguiente repercusión económica para los sistemas de salud y los pacientes que lo contraen, que ha conllevado la actualización de sus métodos de diagnóstico y tratamiento.

Los objetivos de este trabajo de fin de grado son:

- Revisar el estado actual de la infección por *C. difficile* (ICD de ahora en adelante) analizando las ICD del año 2016, haciendo especial hincapié en sus métodos de diagnóstico y detección de sus determinantes de virulencia.
- Poner a punto la técnica de referencia de tipado molecular para *C. difficile*, el ribotipado.
- Clasificar las cepas aisladas en el HCULB en el año 2016 en ribotipos, algunos de ellos hipervirulentos y asociados a un peor pronóstico.
- Correlacionar la sensibilidad/resistencia a fluoroquinolonas con los ribotipos hipervirulentos para poder utilizarlo de método de screening.
- Analizar los episodios de ICD que han presentado recurrencias durante el periodo de tiempo estudiado, para comparar las características clínicas y la presencia de factores de riesgo en los pacientes que han sufrido recurrencias respecto a un grupo control seleccionado.

HISTORIA

C. difficile fue aislado y descrito por primera vez por Hall y O'Toole (1935) cuando estudiaban los cambios de flora intestinal en las heces de recién nacidos durante sus 10 primeros días de vida. Inicialmente lo denominan *Bacillus difficilis* por su morfología y por la dificultad que les suponía aislarlo, dado su metabolismo anaerobio estricto y crecimiento lento.

Aunque el primer caso de colitis pseudomembranosa se describió en 1893, no es hasta 1978 cuando se reconoce esta bacteria como su agente etiológico y se relaciona con la diarrea asociada a antibióticos (Bartlett, 2008). A partir del año 2000 hay un aumento notable de la incidencia y la virulencia de la enfermedad con la aparición de nuevas cepas hipervirulentas que provocan brotes fulminantes y que han condicionado un cambio en la epidemiología, un aumento de la mortalidad asociada a la ICD y del fracaso terapéutico, siendo necesario el ensayo y desarrollo de nuevas terapias para combatirlas (Rodríguez-Pardo, Mirelis & Navarro, 2013).

PATOGENIA

Desde el punto de vista microbiológico, *C. difficile* es un bacilo grampositivo anaerobio estricto, productor de unas esporas difíciles de eliminar con los métodos de esterilización

comunes, ya que son resistentes a altas temperaturas, rayos ultravioletas, productos químicos agresivos y antibióticos. Así pueden sobrevivir al medio ácido del estómago y permanecer en el tubo digestivo durante la erradicación de la infección, posibilitando nuevas recaídas cuando termina el tratamiento. La infección se produce al ingerir formas vegetativas o esporas de una cepa toxigénica, que germinan en el intestino delgado y colonizan el intestino grueso cuando hay una disminución de la flora bacteriana habitual, normalmente tras un tratamiento antibiótico. En ausencia de esta, *C. difficile* se reproduce en las criptas colónicas de forma asintomática hasta que comienzan a producir toxinas, que son las que causan colitis dando lugar a la enfermedad (Murray, 2013).

Determinantes de patogenicidad

Los principales determinantes de patogenicidad son las toxinas A y B, que se encuentran en el locus de patogenicidad (PaLoc, de unos 16,9 kb), formado por 5 genes, de los que los restantes son dos reguladores de la expresión de las mismas, uno positivo (*tcdR*) y otro negativo (*tcdE*), y por una proteína holina que permite la liberación de las toxinas a través de la membrana citoplasmática de la bacteria (Rodríguez-Pardo et al., 2013).

Se considera que la toxina A (TcdA) es una enterotoxina que provoca la desestructuración de la barrera epitelial al destruir las uniones estrechas entre células epiteliales. Esta respuesta inflamatoria es potenciada por la liberación del factor de necrosis tumoral de macrófagos activados y la producción de citocinas, ambas estimuladas también por esta toxina (Heinlen & Ballard, 2010). La toxina B (TcdB) es una potente citotoxina que se considera responsable de los efectos sistémicos de la infección. La TcdA puede no estar presente en una cepa y que esta siga siendo toxigénica, mientras que hasta la fecha se considera que la TcdB es omnipresente en todas las cepas causantes de enfermedad (Heinlen & Ballard, 2010). Además de estas 2, las cepas más virulentas, como la BI/NAP1/027 y la 078, poseen la llamada toxina binaria (CDT), una transferasa que afecta al citoesqueleto de la célula. Esta toxina parece responsable de la mayor agresividad de estos ribotipos al aumentar su adhesividad contribuyendo al desarrollo de extensiones sostenidas por microtúbulos.

Respuesta inmune del huésped

Se ha observado que hasta el 60% de los adultos sanos presenta títulos detectables de IgG e IgA contra las toxinas A y B, probablemente debido a la colonización por *C. difficile* en los primeros meses de vida, cuando la inmensa mayoría de los pacientes no desarrollan colitis pese a ser portadores de cepas productoras de toxina. Se ha descrito que títulos más elevados de anticuerpos anti-TcdB se relacionan con menor gravedad de la enfermedad, así como niveles altos de anti-TcdA se relacionan con el estado de portador asintomático. Por el contrario, títulos bajos de anti-TcdA se asocian a la aparición de ICD y episodios de mayor gravedad (Heinlen & Ballard, 2010).

EPIDEMIOLOGIA

C. difficile forma parte de la flora fecal normal en el 50% de los menores de 2 años de edad, en el 1-3% de la población general, y hasta el 20% en los hospitalizados, aumentando su colonización con la duración de la estancia (Rodríguez-Pardo et al., 2013). A la vista de estos datos, y sabiendo que las pruebas de laboratorio no pueden distinguir entre colonización e

infección, se concluye que las investigaciones pertinentes solo deben realizarse en sujetos sintomáticos (Cohen et al., 2010).

La población más afectada es la mayor de 65 años que es ingresada o está institucionalizada, en relación a un mayor uso de antibióticos en el contexto de su pluripatología. Se cree que la población menor de dos años no se ve afectada por no presentar receptores para las toxinas en su epitelio intestinal (Rodríguez-Pardo et al., 2013).

Su mecanismo de transmisión es fecal-oral, a través de las manos del personal sanitario cuando la higiene entre la atención a un paciente y el siguiente no es correcta, y también por las esporas que contaminan el medio hospitalario: se han aislado bacilos en diversas superficies del hospital, desde barandillas de las camas hasta pulsioxímetros (Dumford, Nerandzic, Eckstein & Donskey, 2009), así como en la piel de portadores asintomáticos ingresados de larga estancia (Riggs et al., 2007), lo que potencialmente podría ser una fuente de infección. La bacteria también puede ser hallada en el intestino de animales domésticos y salvajes, lo que podría tener un papel de reservorio en las infecciones adquiridas en la comunidad (Alba, 2011), así como las cepas encontradas asociadas a alimentos, agua y suelo (Rupnik, Wilcox & Gerding, 2009), aunque las infecciones no relacionadas con los cuidados de la salud, pese a haber aumentado desde la aparición de las cepas hipervirulentas, siguen siendo menos frecuentes que las que sí lo son.

Definiremos así 3 tipos de casos de ICD de acuerdo a su origen (Cohen et al., 2010):

- ICD asociada a cuidados de la salud (ICD-H): la acontecida en un paciente hospitalizado o institucionalizado 48 h tras su ingreso o hasta 4 semanas después del alta.
- ICD adquirida en la comunidad (ICD-C): en pacientes de la comunidad que no han sido expuestos a ambiente hospitalario en las 12 semanas previas a la aparición del cuadro.
- ICD de origen indeterminado: la que aparece entre 4 y 12 semanas tras el alta.

Cambios recientes en la epidemiología de la ICD

En el año 2000, el Centro Médico de la Universidad de Pittsburgh (EEUU) advierte un aumento vertiginoso de casos de ICD, así como de la gravedad de estos, requiriendo muchos de ellos cirugía urgente. Entre 2000 y 2003 se estudian muestras procedentes de brotes de distintas instalaciones sanitarias, que se tipifican genéticamente, resultando en el descubrimiento la cepa BI/NAP1/027. Esta presenta la toxina binaria, tiene una delección en el gen regulador negativo TcdC y es resistente a las fluorquinolonas, además de altamente contagiosa (incluso persona-persona), y su producción de toxinas A y B es mucho mayor de lo normalmente observado. La BI/NAP1/027 es identificada también en Canadá y varios países europeos, y afecta a grupos de población considerados de bajo riesgo, como jóvenes o personas sin antecedentes de toma de antibióticos o contacto con el medio hospitalario, por lo que ha cambiado globalmente el concepto de ICD (Heinlen & Ballard, 2010).

Se han realizado múltiples estudios para determinar la incidencia de la ICD e identificar los ribotipos más frecuentes en Europa y en general se concluye que la distribución de cepas varía mucho de un hospital a otro, encontrándose hasta 65 diferentes en un estudio paneuropeo (Bauer et al., 2011). Los últimos datos indican que después de estos años de brotes, el aumento de la incidencia se está estabilizando. Aunque los casos adquiridos en la

comunidad hayan ido en aumento, con porcentajes variables desde el 28 al 41% en función del estudio, lo más frecuente en una zona con baja prevalencia de la cepa 027 es que los episodios de ICD sigan siendo nosocomiales, de gravedad leve-moderada y baja mortalidad (Reigadas et al., 2014).

Los datos relativos a la frecuencia de la ICD son variables y difíciles de comparar, debido a la variabilidad entre los protocolos diagnósticos de los laboratorios, y al aumento del interés por la infección, que sobreestima la mejora producida por el avance de las técnicas diagnósticas (Asensio & Monge, 2012). En cuanto a los datos disponibles con respecto a España, en 2007 la incidencia era de 17,1 episodios/10000 ingresos con diferencias significativas según el tamaño del hospital (Alcalá et al., 2011). Los más recientes proceden del estudio EUCLID (Davies et al., 2014), en el que se identifican 3,2-3,5 episodios/10000 días-paciente en las muestras investigadas por sospecha clínica, y 9,8-11 episodios/10000 días-paciente en todas las muestras diarreicas recibidas en el laboratorio.

DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de ICD se define con 3 características: cuadro clínico compatible con ICD (diarrea, o signos clínicos y radiológicos de íleo o megacolon tóxico), evidencia microbiológica de presencia de *C. difficile* toxigénico en las heces y/o colitis pseudomembranosa diagnosticada por endoscopia, tras colectomía o por autopsia (Debast et al., 2014). El diagnóstico por colonoscopia no se usa de forma rutinaria para la confirmación de infección aguda ya que el riesgo de perforación intestinal asociado es muy alto (Rodríguez-Pardo et al., 2013) y las pseudomembranas aparecen solamente en el 50% de los pacientes, por lo que un resultado negativo no podría descartar la ICD. El diagnóstico microbiológico realizado en muestra de heces líquidas es el método diagnóstico validado.

Técnicas de referencia

Para el diagnóstico óptimo se aconseja el uso de heces líquidas, o al menos frescas y en caso de no ser procesadas en el momento, deberán ser almacenadas a 4°C. Si la detección de toxinas no se realiza inmediatamente, las muestras deben congelarse para evitar que por su gran labilidad las toxinas se desnaturalicen (Alba, 2011). A día de hoy todavía no se ha establecido una prueba de laboratorio única para el diagnóstico de la ICD, utilizándose algoritmos con 2 o 3 escalones confirmatorios, ya que el método de referencia es el estudio de citotoxicidad de las heces en el cultivo celular con neutralización con antitoxinas específicas, técnica lenta que no aporta sus resultados a tiempo para iniciar un tratamiento precoz.

La prueba de citotoxicidad en heces consiste en inocular un filtrado de las heces en una línea celular (siendo la más usada la de fibroblastos humanos MRC5), en la que aparecerán efectos citopáticos a las 48-72 horas si están presentes las toxinas A y B. Como los efectos pueden deberse a otras causas que no sean las toxinas, se combina con la neutralización con anticuerpos antitoxina, alcanzando así una especificidad superior al 97 % (Rodríguez-Pardo et al., 2013).

La segunda técnica de referencia es el aislamiento por cultivo en anaerobiosis. Se puede realizar en distintos medios, tanto selectivos como el agar fructosa-cicloserina-cefoxitina (agar CCFA) o medios cromogénicos como el ChromIDTM *C. difficile* (bioMérieux)

como medios no selectivos (agar Brucella o agar Schaedler enriquecidos con 5% de sangre de carnero, vitamina K y hemina). Presenta el mismo problema de retraso temporal, ya que requieren incubación durante 48-72 horas hasta dar un resultado positivo: colonias de unos 4 mm de diámetro, circulares, generalmente lisas, con un olor característico por la producción de p-cresol.

La combinación de ambas técnicas es altamente sensible y específica, pero todavía más prolongada en el tiempo, requiriendo 4 días para su realización, por lo que al igual que por separado, tampoco es viable para su aplicación en la práctica clínica con un objetivo diagnóstico a corto plazo (Rodríguez-Pardo et al., 2013; Dupont, 2013; Bagdasarian et al., 2015). La necesidad de técnicas más rápidas ha llevado al desarrollo de las técnicas inmunoenzimáticas y de detección de secuencias nucleotídicas, que ahora complementan al cultivo.

Técnicas inmunoenzimáticas

Las técnicas inmunoenzimáticas van dirigidas a dos dianas que presenta *C. difficile*: la glutamato deshidrogenasa (GDH) y sus toxinas específicas (TcdA y TcdB). La detección de las toxinas fue lo primero en desarrollarse, orientada a la detección de la TcdA, pero al constatar la existencia de cepas productoras exclusivamente de TcdB se dirigieron a esta, y actualmente solo algunos de los kits comerciales reconocen también la TcdA. Presenta una buena especificidad (90-95% para TcdA/TcdB) pero una sensibilidad variable, llegando a ser solamente del 60% en algunos estudios (Rodríguez-Pardo et al., 2013), sin mejora significativa con la repetición del test (<2,5 % de nuevos positivos) (Garimella, Agarwal & Katz, 2012), por lo que no son una alternativa que se pueda utilizar sin apoyo de otra técnica más sensible.

Siguiendo esta idea se propone la detección de la GDH como complemento al cultivo, que es producida en mayor cantidad que la toxina y por tanto más detectable. Al igual que la detección de toxinas, es rápida y económica. Su inconveniente es que pese a ser una técnica muy sensible es poco específica, ya que al ser la GDH un componente de la pared del bacilo también lo presentan las cepas no toxigénicas, por lo cual tampoco debería ser utilizada de forma exclusiva (Dupont, 2013).

Así se propuso la detección simultánea de GDH y toxinas, ya que permitía el diagnóstico directo en los casos positivos para ambas proteínas: por la buena sensibilidad y el alto valor predictivo negativo de la GDH se confirma la presencia de *C. difficile*, y por la especificidad de la toxina se considera toxigénico y por tanto causante de la clínica. En tal caso, solo se necesitaría una tercera prueba para las muestras que solo fueran positivas para uno de los test. Esto, junto con el siempre presente problema del retraso diagnóstico, motivó el desarrollo de las técnicas moleculares.

Técnicas de detección de ácidos nucleicos

Las técnicas basadas en la detección de secuencias nucleotídicas específicas (NAAT) incluyen el estudio por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la amplificación isotérmica mediada por asa (LAMP). Son muy utilizadas pero tampoco están exentas de inconvenientes, el primero de todos ellos su elevado coste. Su otro gran problema es que detectan el gen, no la toxina, identificando por tanto también a los portadores asintomáticos, por lo que su valor

predictivo positivo depende del porcentaje de estos y de la prevalencia de la enfermedad (Dupont, 2013). Pese a esto tienen un alto valor predictivo negativo, y son muy variadas en cuanto a la información que aportan: gen *tcdA* o *tcdB*, alteraciones en el *tcdC* e incluso resistencia a fluorquinolonas (Rodríguez-Pardo et al., 2013).

Algoritmos diagnósticos

Las guías de práctica clínica de la SHEA-IDSA (Cohen et al., 2010) y la ESCMID (Debast et al., 2014) plantean realizar el diagnóstico en 2 o 3 escalones: hacer 2 test rápidos en las muestras de heces y si hay discordancia confirmar con un tercer test el resultado definitivo.

- 1er escalón: determinación de la presencia de GDH mediante EIA
- 2º escalón: detección de toxinas TcdA y/o TcdB mediante EIA. Resultados
 - Si GDH (+) y toxina (+) → diagnóstico de ICD
 - Si GDH (-) y toxina (-) → descartada ICD
 - Si GDH (+) y toxina (-) → 3er escalón para confirmar si la cepa es no toxigénica
 - Si GDH (-) y toxina (+) → 3er escalón para confirmar si es un falso positivo.
- 3er escalón: confirmación por otra técnica (cultivo, técnicas moleculares...).
 - Si PCR (+) → diagnóstico de ICD
 - Si PCR (-) → cepa no toxigénica

Estudios que comparan los algoritmos basados en técnicas de diagnóstico rápidas con técnicas de referencia que incluyen la NAAT, destacan su alta sensibilidad y especificidad, e incluso un estudio presenta la combinación de determinación de GDH seguida de NAAT como la de mayor sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de *C. difficile* (Planche et al., 2013). En algunos centros se realiza el estudio directamente con técnicas moleculares, que permiten realizar también el ribotipado de la cepa para estudios epidemiológicos. El tipo de estudio va a condicionar la técnica a utilizar, pudiéndose elegir entre las de restricción genómica, las de amplificación por PCR y las de secuenciación (Rodríguez-Pardo et al., 2013).

Tipado molecular

Las técnicas de tipificación molecular son útiles en la vigilancia y control de brotes porque permiten conocer la clonalidad entre aislados, identificar reservorios y determinar vías de transmisión.

- Ribotipado

El ribotipado se basa en la amplificación mediante PCR del espacio intergénico (ISR) situado entre los genes 16S y 23S, que constituyen el operon que codifica para el ARN ribosomal. Estos genes son multicopia en *C. difficile* y su disposición, número y tamaño dentro del cromosoma varía de unas cepas a otras. El diseño de iniciadores complementarios de los extremos 16S y 23S permite amplificar distintos fragmentos que al ser separados por electroforesis en geles de agarosa, dan lugar a un patrón de bandas que depende de la disposición de dichos genes a lo largo del cromosoma en cada una de las cepas. Cada patrón de bandas que varía en el número de bandas o en la posición de al menos una de ellas se corresponde con un ribotipo diferente (se han descrito más de 500 ribotipos diferentes).

TRATAMIENTO

Sensibilidad a antibióticos

Hasta hace unos pocos años, metronidazol y vancomicina eran los únicos fármacos de elección para el tratamiento de la ICD. Sin embargo, se han incorporado recientemente nuevos fármacos como nuevos antimicrobianos de elección para ciertos casos de ICD recurrentes. Aunque durante muchos años no había un especial interés por conocer los patrones de sensibilidad de los aislados toxigénicos de *C. difficile* debido a su uniforme sensibilidad *in vitro* a metronidazol y vancomicina, este interés se incrementó enormemente con la emergencia, a finales del siglo XX, de cepas con resistencia o sensibilidad disminuida a estos antimicrobianos.

La concentración que metronidazol alcanzan en la mucosa colónica varía dependiendo de la consistencia de las heces. Conforme la consistencia va siendo menos acuosa, la concentración de estos fármacos va disminuyendo hasta casi desaparecer. Este hallazgo ha impulsado al EUCAST a recomendar un punto de corte para metronidazol y *C. difficile* de 4 mg/L en vez de 16 mg/L que es el recomendado por el CLSI *Clinical and Laboratory Standards Institute*).

La utilización de nuevas quinolonas, entre ellas el levofloxacino y el moxifloxacino, (SEMERGEN - Medicina de Familia, 2004) han aumentado en los últimos tiempos para el tratamiento de las infecciones respiratorias adquiridas en la comunidad. Los factores que han contribuido a esta mayor utilización, son el aumento de las resistencias a penicilina, las “alergias medicamentosas” a beta-lactámicos, la comodidad en su posología y su amplio espectro antibacteriano. Sin embargo, este perfil no le exime de la aparición de complicaciones ya descritas en otros antibióticos de amplio espectro, ya que desde 2002, se han reportado cepas de *C. difficile* resistentes a las fluoroquinolonas con un nuevo genotipo que constituye la cepa BI/NAP1/027, la cual produce una enfermedad con mayor incidencia, mayor severidad y recurrencia y que adicionalmente afecta más frecuentemente a la población anciana, generando una importante carga en morbi-mortalidad.

Material y Métodos

Técnicas de diagnóstico microbiológico

Para realizar el estudio sobre el diagnóstico con la introducción de las nuevas técnicas y algoritmos diagnósticos se analizaron los datos recogidos durante 1 año (18 de enero del 2016 hasta el 29 de diciembre del 2016) en una base de datos Excel sobre las peticiones de muestras para estudio de *C. difficile* en el Hospital Clínico Universitario “Lozano Blesa”, centro de referencia para el diagnóstico microbiológico del Sector Sanitario Zaragoza 3.

A las muestras procesadas se les realizaron las pruebas diagnósticas indicadas según el nuevo protocolo de estudio de muestras para diagnóstico de ICD establecido en el HCU en enero de 2014. A todas se les realiza una prueba de EIA que detecta en un único dispositivo de forma simultánea la presencia de GDH y toxinas A y B (C Diff Quik-Chek Complete, TechLab, Blacksburg, VA, USA), y a los casos discrepantes una prueba de PCR en tiempo real, que detecta el gen de la TcdB (GenomEra *C. difficile*; Abacus Diagnostica, Turku, Finlandia) para confirmar o descartar el diagnóstico, siguiendo el algoritmo que se presenta a continuación:



Nuevo protocolo 2014 para diagnóstico microbiológico ante sospecha de ICD en el HCU

En caso de obtenerse un resultado positivo con el test de screening (GDH) se realiza un cultivo toxigénico de la muestra para poder tener la cepa de *C. difficile* y poder realizarle antibiograma y archivo para estudios posteriores (Malditof, ribotipo....)

Cultivo toxigénico

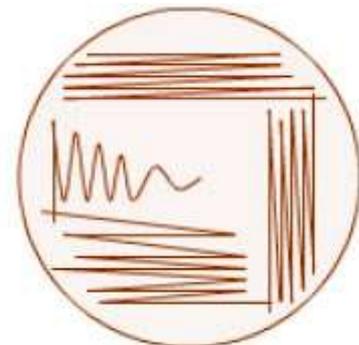
El cultivo toxigénico consiste en el cultivo de las muestras de heces en medios selectivos, seguido de la detección de toxinas *in vitro*, con el fin de determinar la toxigenicidad de las cepas aisladas. Existen diferentes medios selectivos para el aislamiento de *C. difficile* a partir de muestras de heces. Los medios tradicionalmente más utilizados son el CCFA (agar cicloserina, cefoxitina, fructosa) y Brazier's o CCEY (agar cicloserina, cefoxitina y yema de huevo) aunque están siendo desplazados por medios también con antibióticos pero a los que se adiciona sangre como favorecedor del crecimiento. También, pueden utilizarse medios no selectivos como el agar sangre, agar Brucella o el agar Schaedler enriquecido con 5% de sangre de carnero, vitamina K1 y hemina.

En medios con sangre y tras 48 horas de incubación, las colonias de *C. difficile* presentan un aspecto de un color verde-grisáceo, no beta-hemolíticas, planas, mate e irregulares con apariencia de vidrio esmerilado y con un halo blanquecino en el centro. En la tinción de Gram de estas colonias se observan bacilos grampositivos que pueden presentar esporas ovales subterminales. Posteriormente se realiza la identificación con pruebas bioquímicas como la producción de L-prolina aminopeptidasa o la detección de GDH, o mediante galerías bioquímicas comerciales o espectrometría de masas (MALDI-TOF).

Una vez confirmado el crecimiento de colonias de *C. difficile* debe procederse a la detección de las toxinas *in vitro*, directamente de la colonia. La técnica utilizada era el ensayo de citotoxicidad, sin embargo, en la actualidad es preferible el uso de técnicas rápidas para la detección de toxinas tales como IEs o técnicas de amplificación molecular comerciales, que permiten disponer del resultado el mismo día.

Siembra por agotamiento

Es el método más utilizado. Se prepara una placa Petri con el medio de cultivo a la que se le elimina el exceso de humedad. Primero, se marca la parte exterior de la contratapa de acuerdo al esquema. Se carga el asa con la muestra, se deposita en un punto de la superficie del sector (I) cercano al borde, y se extiende en el mismo con estrías próximas y



paralelas. A continuación se quema el asa y se deja enfriar. Se gira la placa 90 °, se pasa el asa una vez sobre la última estría de la región ya inoculada y se arrastra al sector (II) efectuando sobre él la siembra sin superponer las estrías con las realizadas antes. Se quema nuevamente el asa y de la misma manera se estría el sector (III). Luego de quemar el asa, en el sector (IV) se realizan estrías con el material que se arrastra de (III), más amplias y que terminan en el centro de la placa.

Técnicas de identificación

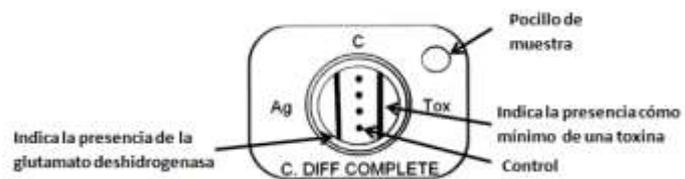
- Enzimoimmunoensayo para la detección de GDH

El test *C.diff quick chek complete* es un enzimoimmunoensayo rápido de membrana para la detección simultánea del antígeno glutamato deshidrogenasa de *Clostridium difficile* y de toxinas A y B en un mismo pocillo de reacción. El test detecta el antígeno de *C.difficile*, la glutamato deshidrogenasa, como criba para detectar la presencia de *C.difficile* y confirmar la presencia de *C.difficile* toxigénica a través de la detección de las toxinas

A y B en muestras fecales de personas sospechosas de padecer la enfermedad causada por *C.difficile*.

El test utiliza anticuerpos

específicos frente a la glutamato deshidrogenasa y las toxinas A y B de *C. difficile*. El dispositivo contiene una ventana de reacción con tres líneas verticales con anticuerpos inmovilizados. La línea de control es una línea de puntos que contiene anticuerpos anti peroxidasa de *C. difficile*. La línea de toxinas A y B del test contiene anticuerpos frente a las toxinas A y B de *C. difficile*. El conjugado consiste en anticuerpos frente a la glutamato deshidrogenasa y anticuerpos frente a las toxinas A y B unidos a la peroxidasa de rábano.



- MALDI-TOF MS

La identificación bacteriana basada en la espectrometría de masas, específicamente en el MALDI-TOF MS, *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometer* utiliza el cálculo de tiempo de migración (tiempo de vuelo) de cada fragmento de una molécula a través de un trayecto predeterminado previa desorción/ionización láser de la molécula en una matriz determinada. La identificación microbiana por MALDI-TOF MS consta de cuatro pasos: la recuperación de una colonia aislada, la realización de un espectro de masas, la comparación con la base de datos y la entrega de resultados.

- RT-PCR (VIASURE)

El kit DNA Master Mix con IC (Control Interno) está diseñado para la detección y cuantificación de muestras de ADN mediante un ensayo de PCR en tiempo real usando cebadores específicos y una sonda fluorescente. Este producto se basa en la actividad 5'-exonucleasa de la ADN polimerasa. Durante la amplificación del ADN, esta enzima corta la sonda unida a la secuencia de ADN complementaria, separando el gen reportero. Esta reacción genera un aumento de la

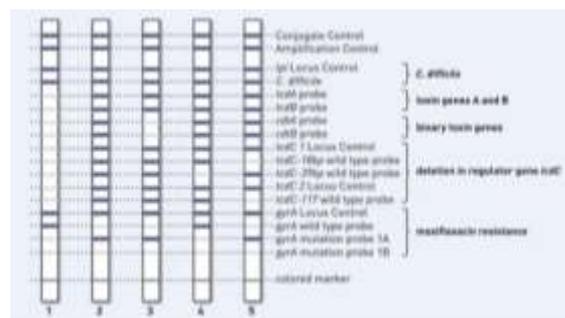
señal fluorescente que es proporcional a la cantidad de la secuencia diana hidrolizada y que podría medirse en plataformas de PCR en tiempo real.

1. Determinar y separar el número de reacciones requeridas incluyendo muestras y controles. Se incluye un control positivo y negativo o un control sin plantilla (NTC) en cada prueba.
2. Preparar un PreMix. Agregar los siguientes componentes a un tubo de microcentrifuga, mezcle suavemente y centrifugue brevemente. Se recomienda preparar $n + 1$ volúmenes de PreMix (donde n es el número de reacción), con el fin de reducir los errores de pipeteo. Minimizar la exposición de la sonda fluorescente marcada a la luz.
3. Reconstituir el número de pozos que necesita añadiendo 15 μ L de PreMix en cada pocillo.
4. Adición de muestras y controles. Añadir 5 μ l de molde de ADN de muestra, control positivo, control negativo o NTC en diferentes pocillos. Cargue la placa o las tiras en el termociclador.
5. Instale su termociclador.
6. Analizar los resultados. El análisis de las muestras se realiza por el propio software del equipo de PCR en tiempo real utilizado según instrucciones de uso del fabricante. Comprobar la señal de control interno exógena para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación y / o excluir una inhibición de la reacción de PCR.

- Ensayo GenoType CDiff

El ensayo de GenoType CDiff es un ensayo cualitativo in vitro, para la identificación de *Clostridium difficile* a partir de muestra de heces o cultivo, y para la diferenciación entre cepas no patogénicas, virulentas e hipervirulentas, como el ribotipo 027. La identificación de *C. difficile* se realiza mediante la detección del gen *tpi*. La detección del gen de toxina *tcdA* (codifica para la toxina A) y del *tcdB* (codifica para la toxina B) permiten una evaluación de la virulencia de la cepa de *C. difficile* testada. Para la identificación del ribotipo hipervirulento 027 se detectan adicionalmente los siguientes marcadores: los genes *cdtA/cdtB* de la toxina binaria (codifican por la toxina binaria CDT), la delección característica en el gen regulador *tcdC*, y la mutación del gen *gyrA* mediadora de la resistencia a moxifloxacina.

El procedimiento completo se divide en tres pasos: extracción de DNA procedente de cultivo o muestras de heces, o frotis rectales, una amplificación multiplex con primers marcados con biotina y una hibridación reversa. La mezcla del primer/nucleótido (PNM) contiene primers unidos a biotina para la amplificación de regiones específicas del genoma de las bacterias. Las tiras de membrana están recubiertas con sondas específicas complementarias a los ácidos nucleicos amplificados. Después de la desnaturalización, las cadenas simples de los amplicones se unen a las sondas. La alta especificidad de unión de las sondas con el DNA complementario está asegurada por las condiciones astringentes resultantes de la combinación de la composición del tampón y la correcta temperatura. La fosfatasa alcalina conjugada con la estreptavidina se une a la biotina de los amplicones a través de la fracción de estreptavidina. Finalmente, la fosfatasa alcalina transforma el sustrato añadido en un colorante que resulta visible en la membrana en forma de precipitado de color.



- Pruebas bioquímicas (API 20A)

Los sistemas miniaturizados API® son métodos rápidos que permiten identificar microorganismos a través de la realización de diferentes pruebas bioquímicas. Estos sistemas consisten en un dispositivo de plástico con microtubos que contienen diferentes medios de cultivo deshidratados o de sustratos de enzimas de acuerdo al tipo de prueba que se requiere montar. Con este sistema se montan las pruebas bioquímicas que permiten la identificación de bacterias anaerobias. Una vez inoculada la galería con la suspensión del microorganismo a identificar, el sistema se incuba en una jarra Gaspak® u otro sistema que provea condiciones de anaerobiosis. Cuando se utiliza esta galería las cartas de colores correspondientes a las pruebas negativas y positivas son las siguientes (BioMérieux. 2010).



Epidemiología molecular

- Ribotipado

El procedimiento de ribotipado consiste:

1. Extracción y purificación de ácidos nucleicos: Se deben recoger varias colonias y resuspenderlas en 200 µl de resina Chelex Instagene Matrix. A continuación se incubarán las muestras a 56°C en termobloque durante 30 minutos. Luego se agitarán en vortex a máxima velocidad durante 30 segundos y se hervirán en baño de agua durante 8 minutos. Se agitará de nuevo en vortex a máxima velocidad durante 10 segundos. Finalmente se centrifugará la suspensión a 12.000 rpm durante 3 minutos. Se separarán 50 µl del sobrenadante que contiene el ADN bacteriano y se conservarán refrigerados hasta su uso.
2. Reacción de amplificación: Reacción de PCR (modificado de Stubbs y cols 1999) Se utiliza un control negativo (H₂O libre de nucleasas) y un control positivo que son las cepas control de los ribotipos 014/020, 001/072, 078/126 y 027 que son los utilizados en el estudio ya que son los más frecuentes en España.

Componente	
Oligo ribst-16S-F (5pmol/µl)	3,5 µl
Oligo ribst-23S-R (5pmol/µl)	3,5 µl
H₂O	0,5 µl
MM multiplex Quiagen	12,5 µl

Iniciadores de PCR	Secuencia (5'-3')
ribst-16S-F Posición 1445-1466 de 16S rARN	CTGGGGTGAAGTCGTAACAA GG
ribst-23S-R Posición 20-1 de 23S rARN	GCGCCCTTTGTAGCTTGACC

3. Detección de los productos e amplificación: Preparar un gel de agarosa MS-8 al 3 % en TBE 1X y con Real Safe u otro agente intercalante e introducirlo en una cubeta de electroforesis con TBE 1X. El tamaño del gel debe ser el adecuado para una correcta separación de los fragmentos.
4. Lectura e interpretación de resultados: Visualizar el gel con transiluminador UV.

Sensibilidad a antibióticos

Este es un método cualitativo, fácilmente estandarizable y que está indicado para microorganismos no exigentes de crecimiento rápido. Se realiza un cultivo puro de una muestra clínica para poder comenzar el estudio de la sensibilidad antibiótica. El antibiograma por disco difusión basado en el trabajo de Bauer, Kirby y colaboradores, es uno de los métodos que el NCCLS recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antibióticos.

- Método de difusión en disco o Kirby-Bauer modificado
1. Se colocan entre 4 y 5 ml de suero fisiológico estéril en un tubo de ensayo. Se toma con un asa bacteriológica tres o cuatro colonias morfológicamente similares y se suspenden en el tubo hasta alcanzar una turbidez comparable a la solución de Mc Farland 0.5.
 2. Tras preparar el inóculo con la cepa en estudio se introduce el hisopo estéril en el inóculo, de manera que quede embebido completamente. Antes de retirarlo se debe escurrir sobre las paredes del tubo para retirar el exceso de líquido del mismo.
 3. Sembrar la placa de MH de manera de obtener un crecimiento confluyente, para lo cual se estría con el hisopo en forma paralela y bien compacta abarcando toda la superficie de la misma. Luego se repite el procedimiento rotando la placa 60° en dos oportunidades más.
 4. Dejar secar 3 a 5 minutos antes de colocar los discos.
 5. Colocar los discos. Estos deben ser colocados con dispensador o pinza estéril. Luego de estar sobre el agar se debe presionar los discos levemente para que queden adheridos al mismo. Deben estar a más de 15 mm del borde de la placa y deben distribuirse de manera de que no haya superposición de los halos de inhibición.
 6. Luego de colocados los discos las placas deben incubarse a 35°C a 37°C en grupos no mayores a cinco placas durante 18 hs.

Detección de determinantes de patogenicidad

- Detección de la toxina B.
- El kit de detección de PCR en tiempo real contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para el ensayo de PCR en tiempo real (cebadores / sondas específicos, dNTPS, tampón, polimerasa) en un formato estabilizado, así como un control interno para descartar la inhibición de la actividad polimerasa. El procedimiento es el siguiente:

1. Las muestras de heces se recogen en contenedores limpios y se procesan lo antes posible para garantizar la calidad de la prueba.
2. Homogeneizar la muestra de heces lo más minuciosamente posible antes de la preparación.
3. Extracción de DNA con el kit Viasure en nuestro caso.
4. Añadir 100µL de agua libre de RNasa/DNasa al liofilizado del CP de la toxina B de *C. difficile*.

5. Determinar el número de reacciones que se requieren teniendo en cuenta el control positivo y el negativo. Y reconstituir el número de pocillos necesarios añadiendo 15 µL del tampón de rehidratación.
6. Añadir 5 µL de cada muestra de DNA y centrifugar.
7. Programar el termociclador y recoger los datos fluorogénicos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

DATOS DE PREVALENCIA

Se han evaluado los datos recogidos en un año, del 1 de enero al 31 de diciembre del 2016 en el programa Modulab de laboratorio del Hospital Clínico Lozano Blesa. En total hubo 1855 pacientes a los que se les solicitó diagnóstico de posible infección por *Clostridium difficile*.

Se realizó el diagnóstico siguiendo el protocolo, siendo positivo para 178 pacientes (9.6%). Tras esta detección se continuó con el protocolo para comprobar si se trataba de una infección por *C. difficile* toxigénica o por una colonización de *C. difficile* no toxigénica. Sesenta y uno de los 178 pacientes que portaban *C. difficile* eran toxigénicos. Los 117 pacientes restantes que el enzimoanálisis dio negativo para las toxinas A y B, se les realizó una PCR que amplifica el gen de la toxina B, técnica más sensible utilizada para mejorar la sensibilidad en casos discordantes entre la GDH y toxinas mediante enzimoanálisis. De los 117 pacientes 57 resultaron toxigénicos y 60 no toxigénicos. Se confirmó que 118 pacientes padecieron una infección de *Clostridium difficile*. La prevalencia de ICD en pacientes que lo solicitan fue del 6.62% en 2016.

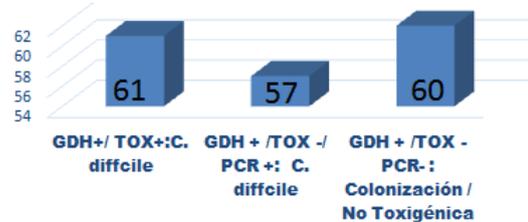


Figura 1: Número de casos positivos a cada una de las técnicas empleadas para el diagnóstico.

En relación a la edad de los pacientes, el 59% de los afectados presenta una edad por encima de los 65 años mientras que el 41% eran menores de los 65 años. La edad media era de 63 años. Se estudiaron los casos agrupándolos en rangos de edad. El 36% de los pacientes tenía una edad por encima de los 80 años de edad y solo un 6% eran menores de 17 años.



Figura 2: Gráficos que muestran todos los casos de ICD por rango de edad.

Se observó que 53 (45%) pacientes con ICD eran de sexo masculino y 65 (55%) de sexo femenino no estando relacionada esta infección con ninguno de los dos géneros, acorde con la literatura revisada, en la que no hay un claro predominio de afectación en un sexo. (ELSEVIER DOYMA, 2012)

Revisando los servicios del hospital que más casos de ICD tuvieron, podemos mostrar cómo se muestra en la figura 4, que la mayoría de los pacientes pertenecían al servicio de Digestivo (38, 32%) pacientes del total, seguido del servicio de Medicina Interna (31, 26%).



Figura 3: Afectación de ICD por sexo

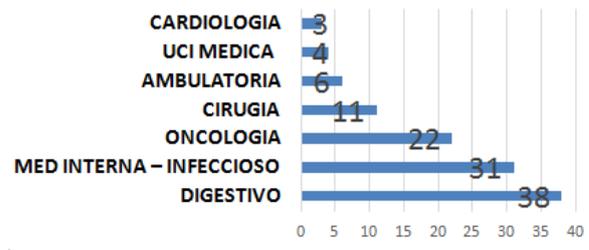


Figura 4: ICD según los servicios del hospital en los que fueron diagnosticados.

TIPADO MOLECULAR DE LAS CEPAS

De los 118 pacientes con ICD se analizó el ribotipo de cada una de las cepas mediante ribotipado y mediante la técnica comercial Ensayo Geno type C.diff:

1. Ribotipado

Recuperamos las cepas de los pacientes con ICD que estaban congeladas a -80°C en criobolas y las sembramos en placas de *Clostridium difficile*, medio de cultivo CLO (biomerieux) y se incubaron en anaerobiosis 48-72 horas. A partir de estos cultivos, se realizó la extracción y amplificación de su DNA, y una separación mediante una electroforesis en gel de agarosa tal y como se indica en material y métodos. El estudio del ribotipo de cada una de las cepas se basó en la comparación de nuestras muestras con 4 cepas de referencia (elegidas por su virulencia y su frecuencia), de aproximadamente 500 identificadas, que disponía el HCULB y que habían sido cedidas por cortesía del hospital Gregorio Marañón para este estudio. De las 118 cepas pudimos tipar 71. Estas 71 cepas pudieron asignarse un ribotipo de los 4 que teníamos de referencia (027, 126, 001 y 014). El resto de las cepas o pertenecían a un ribotipo diferente que no disponía el laboratorio o hubo algún problema de viabilidad bacteriana. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente figura:

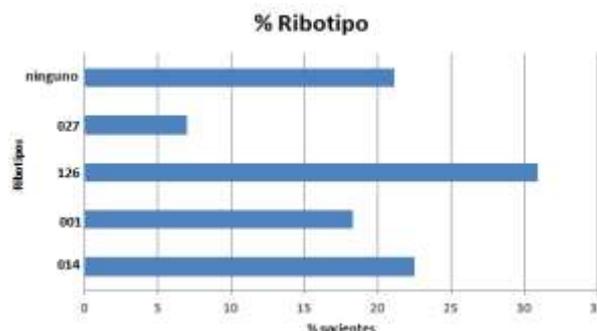
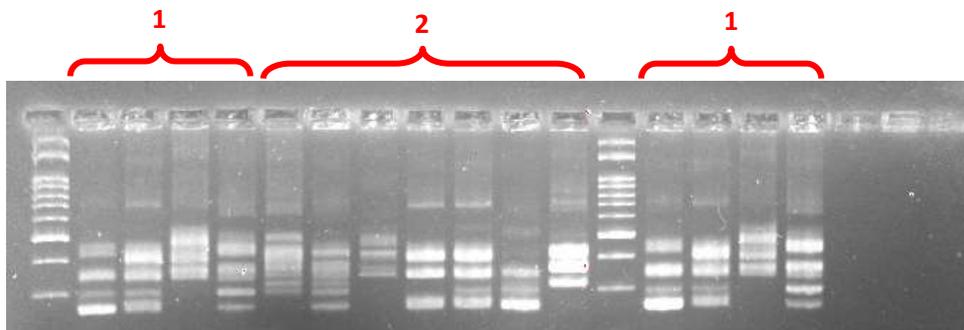


Figura 5: Porcentaje obtenido de cada ribotipo.

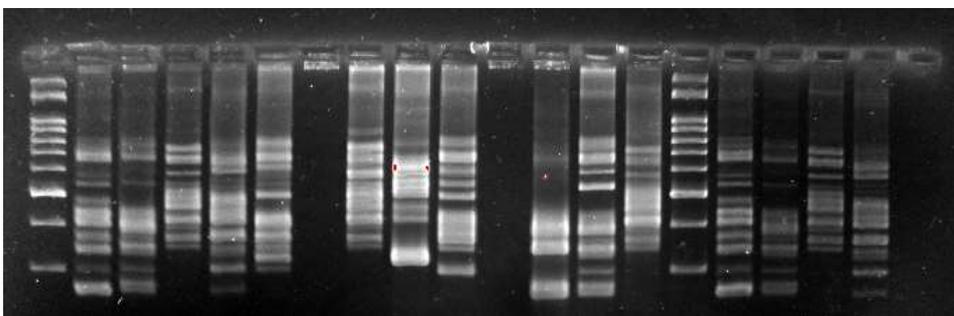
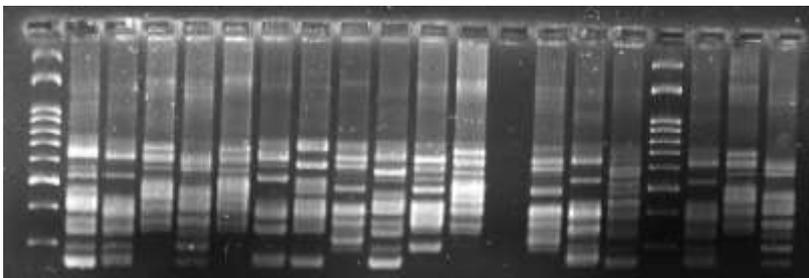
Obtuvimos el mayor porcentaje de cepas del ribotipo 126, seguido del 014, 001 y 027.

Cepa 014	Cepa 001	Cepa 126	Cepa 027	Ninguna de referencia
22,50%	18,30%	30,90%	7,04%	21,10%



Gel de agarosa con nuestras muestras de DNA de *C.difficile* y DNA de las cepas de referencia.

- 1) Ribotipos de referencia. 001, 014, 126, 027 respectivamente.
- 2) Nuestras cepas a estudiar.



Imágenes de más geles de agarosa con nuestras muestras de DNA de *C.difficile* y DNA de las cepas de referencia. Misma referencia. (Ejemplo: carril 8 prácticamente igual al carril 4 que corresponde a la cepa de referencia 126)

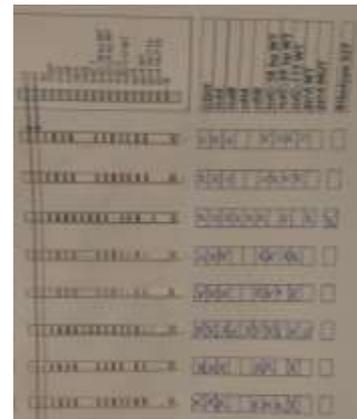
2. Ensayo GenoType CDiff

Esta técnica se basa, principalmente, en la identificación del ribotipo 027. La infección por *Clostridium difficile* ribotipo 027 se ha asociado especialmente en pacientes con edad avanzada y con una mayor gravedad, transmisibilidad y posibilidad de recurrencia (Thomson Reuters, Journal Citation Reports, 2016).

Analizamos 8 cepas, 4 de ellas fueron elegidas porque eran sospechosas de ser cepas 027 mediante la técnica de ribotipado y 4 fueron elegidas por ser pacientes que habían recidivado en varias ocasiones. La identificación del ribotipo 027 se realiza en esta técnica como esta descrito en material y métodos mediante la detección de los siguientes marcadores (Rodríguez-Pardo et al., 2013):

- ❖ Los genes *cdtA/cdtB* (genes que codifican para la toxina binaria CDT).
- ❖ La delección característica en el gen regular *tcdC*.
- ❖ Resistencia al moxifloxacino causada por mutación en el gen *gyrA*.

En los resultados que obtuvimos con esta técnica podemos observar que solo una de las cepas que creíamos que podían ser ribotipo 027 mediante la técnica de ribotipado, lo fue mediante esta técnica. Y en el caso de las cepas de pacientes con varias recidivas, vimos que ninguna de ellas resultó ser del ribotipo 027. Por lo que podemos decir que el ribotipo 027 puede ser muy parecido a otros ribotipos de los 500 descritos en cuanto a sus bandas proteicas observadas en la electroforesis, sirviendo la técnica de ribotipado como screening inicial pero teniendo en cuenta que hay que realizar una confirmación posterior para mejorar la especificidad.



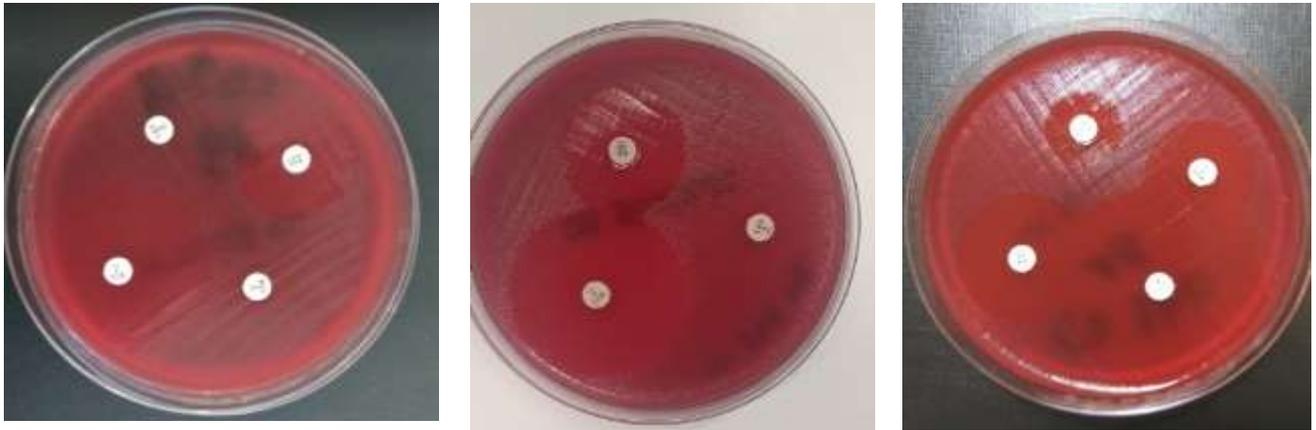
Resultados de la prueba. Los 4 primeros resultados corresponden a las posibles cepas 027 y las 4 últimas a las cepas pertenecientes a pacientes con recidivas.

La muestra que correspondía al ribotipo 027 es la muestra en la tercera posición de la imagen empezando por arriba. Si vamos analizado las bandas que aparecen vemos que tiene las bandas de los dos controles positivos, el control de conjugación y el de amplificación. También observamos el *tpi* Locus Control que sirve para detectar la presencia de *C. difficile*. Además salen positivos los genes de las toxinas A y B y los genes de la toxina binaria (*cdtA/cdtB*). Después vienen los marcadores que muestran la delección del gen regulador *tcdC*. En nuestro caso, se ve la ausencia de señal en una de las sondas *tcdC wild type* que identifica una delección en este gen. Y por último tenemos las sondas que nos marcan la resistencia a moxifloxacino. En este caso no tenemos señal de la sonda del gen *gyrA* WT, en cambio, tenemos la señal de este mismo gen mutado. Esto nos indica una resistencia a moxifloxacino en la cepa que hemos analizado.

3. Sensibilidad y resistencia a los antibióticos

Se realizó un estudio de sensibilidad a los antibióticos metronidazol y vancomicina, mediante el método de difusión en disco. Estos dos antibióticos fueron elegidos por ser los antibióticos de elección para tratar la ICD en el caso de infección leve o grave, respectivamente. Queríamos demostrar si existen cepas resistentes en nuestro entorno porque de manera rutinaria no se realiza antibiograma a este microorganismo. Estos fueron usados por que eran los únicos fármacos de elección para el tratamiento de la ICD.

Posteriormente, con motivo del estudio de las cepas sospechosas de ser ribotipo 027, incorporamos dos nuevos antibióticos que fueron moxifloxacino y levofloxacino (*Bradley Healthcare and Rehabilitation Center, PubMed 2002*) para hacer un análisis comparativo entre la resistencia a estos antibióticos y el ribotipo que asignábamos a las cepas, sobre todo para las cepas 027, ya que como hemos nombrado anteriormente estas cepas presentan resistencia a moxifloxacino causada por mutación en el gen *gyrA*.



Imágenes de varios antibiogramas con dichos antibióticos.

Los puntos de corte utilizados fueron los del Comité Francés del Antibiograma puesto que otros comités no disponen de puntos de corte para este microorganismo

	SENSIBLE	RESISTENTE
Levofloxacina	<20mm	≤17mm
Moxifloxacino	≥ 24mm	<21mm
Metronidazol	>21mm	≤21mm
Vancomicina	>10mm	≤10mm

Nuestros resultados fueron los siguientes:

TOTAL	48	Levofloxacina		Moxifloxacino	
		Sensible	Resistente	Sensible	Resistente
		>20	<17	>24	<21
		32	16	31	17
		66,67%	33,33%	64,58%	35,40%

TOTAL	70	Metronidazol		Vancomicina	
		Sensible	Resistente	Sensible	Resistente
		>21	<21	>10	<10
		63	7	70	0
		90%	10%	100%	0%

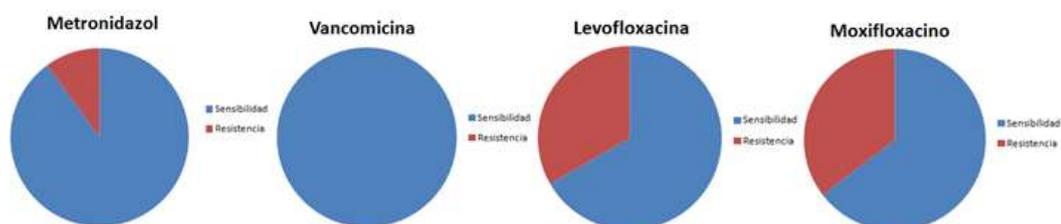


Figura 6: Diagramas que muestran la resistencia a los antibióticos (granate) y sensibilidad (azul).

Además realizamos una comparación de las cepas resistentes a moxifloxacino y levofloxacina con su ribotipado, para ver si correspondían al ribotipo 027.

Resistencia a moxifloxacino

Resistencia a levofloxacina

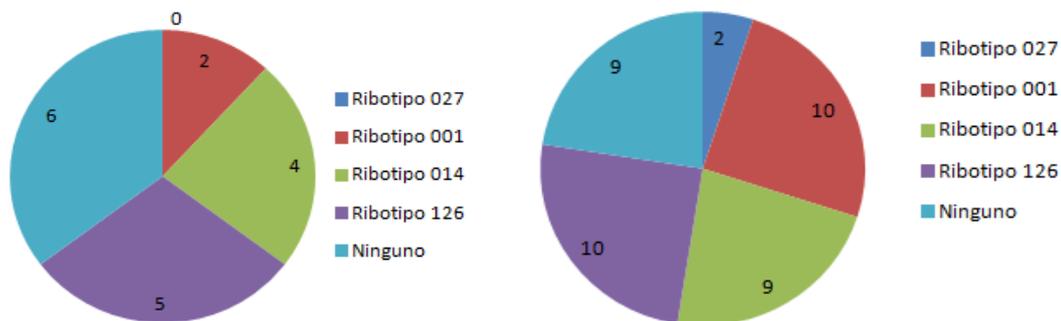


Figura 7: Cepas resistentes a moxifloxacino y levofloxacina y los correspondientes ribotipos.

Como podemos observar en los gráficos, en nuestro caso ninguna cepa con resistencia a moxifloxacino correspondía con un ribotipo 027. En el caso de la resistencia a levofloxacina (igualmente una fluoroquinolona) hemos obtenido solamente 2 cepas con ribotipo 027, por lo que podemos decir que éste no es un marcador específico para detectar este ribotipo aunque podría utilizarse como método de screening en el laboratorio por la sencillez del método. La limitación de utilizarlo es que requeriría de un tiempo de 48h por el tiempo de incubación del antibiograma y por eso está siendo sustituido por utilización de PCR que detecte el gen de la toxina binaria. (2012 Elsevier España, S.L)

4. Recurrencias y recidivas en la ICD.

Una vez analizadas las técnicas de ribotipado y de detección de la sensibilidad las utilizamos para estudiar los casos que había habido de recurrencias en el año 2016 en la ICD.

Como se puede ver en la gráfica 93 pacientes (78,8%) presentaron una única infección por *C.difficile*. Veintinun pacientes (17,7%) presentaron más de un caso de ICD en el mismo año y 4 pacientes (3,3%) presentaron más de una recurrencia.



Figura 8: Gráfico con el porcentaje de pacientes con recidivas.

Las recurrencias de la infección son muy frecuentes, llegando al 15-30% tras el primer episodio (pudiendo presentarse de forma severa hasta en el 11% de los casos) y hasta el 33-60% tras la primera recurrencia (Rodríguez-Pardo et al., 2013). Suelen ocurrir durante el primer mes tras el tratamiento aunque se han documentado episodios hasta 4 meses después.

Cuando se habla de recurrencia comprende dos terminos a la vez, recidiva (o recaída) y reinfección. Se considera recidiva cuando se debe a la misma cepa, ineficazmente eliminada con el tratamiento antibiótico administrado, que normalmente acontece a los 10-14 días tras finalizarlo; y reinfección cuando se debe a una cepa distinta, habitualmente 4 semanas después de finalizar el tratamiento y que suele deberse a que el paciente continua con la microbiota alterada siendo paciente de riesgo de ser colonizado/infectado por otras cepas de *Clostridium difficile* que haya en el ambiente. En la practica clínica no sabemos a cual de los dos se refiere cuando hay una recurrencia porque no se hace ribotipado en la rutina del

laboratorio siendo este objetivo muy interesante por su aplicación al conocimiento de la epidemiología local. (Debast et al., 2014).

Para una mayor especificidad del estudio, hemos realizado una comparación en cuanto al ribotipo de las cepas de cuatro pacientes (*cepas analizadas mediante el ensayo GenoType CDiff anteriormente*) que presentan varias recidivas, para poder afirmar si se trata de una reinfección o de una recidiva.

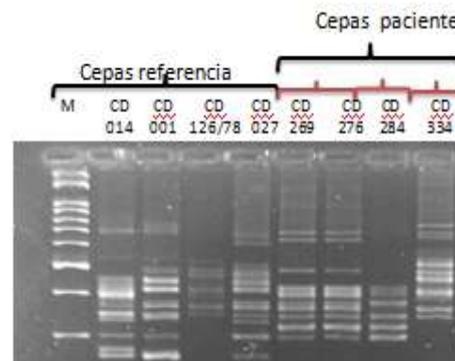
CASO 1

En el primer caso estudiado hemos observado como el paciente tiene asignadas 6 cepas diferentes de los tres episodios de ICD. En primer lugar tuvo una ICD producida por el ribotipo 0126/78. Posteriormente y un mes después tuvo una reinfección por otra cepa diferente perteneciente al ribotipo 014, muy virulento. Tres meses después tuvo de nuevo otra reinfección por una cepa que no pudimos tipar por no ser hipervirulenta y pertenecer a los ribotipos que teníamos de control pero esta vez la cepa era no toxigenica con lo que podemos decir que en este caso estaba colonizado por *Clostridium difficile* pero no le estaba produciendo infección.



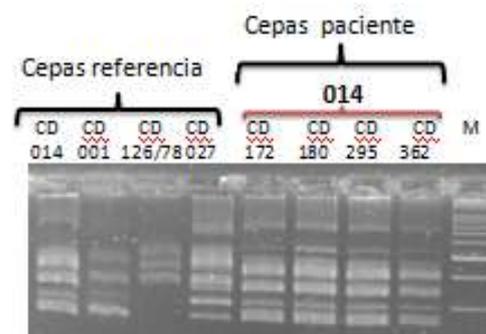
CASO 2

Respecto a este paciente, observamos que su primera ICD fue con ribotipo que no pudimos tipar ya que no corresponde a ninguno de los ribotipos de referencia. Un mes después tuvo una reinfección por otra cepa diferente pero que tampoco hemos podido tipar debido a que no se trata de ninguna de las utilizadas. Por último, 5 meses después vuelve a tener una segunda reinfección por otra cepa a la cual tampoco podemos asignarle ningún ribotipo.



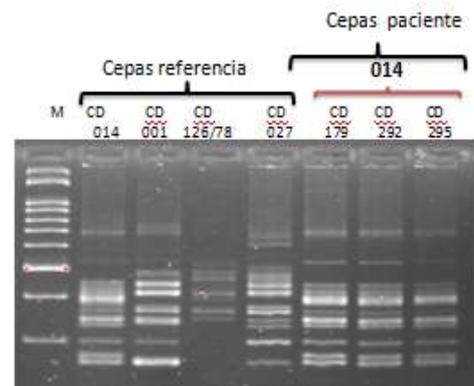
CASO 3

En el caso de este paciente, tiene asignadas 4 cepas. Su primera ICD fue producida por un ribotipo 014, y aunque posteriormente se le han asignado diferentes cepas, podemos observar que se tratan de 3 recidivas posteriores ya que se tratan de cepas con el mismo ribotipo, en este caso el ribotipo 014.



CASO 4

Por último, en el último paciente, hemos observado que se trata de un caso similar al caso 3 descrito previamente. Su primera ICD fue producida por una cepa con ribotipo 014, tras diez meses observamos una reinfección pero en este caso se trata de la misma cepa ya que tiene un ribotipo idéntico. Por último a los dos meses el paciente tiene una recidiva de la misma cepa con ribotipo 014.



CONCLUSIONES

Las conclusiones extraídas tras la realización del presente Trabajo de Fin de Grado son las siguientes:

1. El diagnóstico de la ICD ha mejorado en los últimos años, detectando a los pacientes con infección y a los pacientes colonizados por *C. difficile* por la utilización reciente de un algoritmo diagnóstico.
2. La técnica de referencia para tipado molecular de *C. difficile*, es una técnica de PCR más electroforesis del DNA de las cepas de *C. difficile*, que permite una asignación de un ribotipo por comparación con los de referencia, siendo una técnica que solo los laboratorios de referencia pueden realizar por necesitar una biblioteca de más de 500 ribotipos de referencia para su comparación.
3. El ribotipo de *C. difficile* más frecuente es el 126 y el ribotipo más virulento el 027. El ribotipo 027 es el que se da en un menor número de casos en nuestro entorno, siendo muy diferente a lo que sucede en otras comunidades autónomas.
4. La utilización del resultado de sensibilidad a fluoroquinolonas (moxifloxacino o levofloxacino) no son buenos marcadores para detectar los ribotipos virulentos porque aunque son muy sensibles son muy poco específicos.
5. Poder realizar ribotipado de las cepas capacita al laboratorio a clasificar las recurrencias de CD como recidivas (cepa diferente) o recaídas (misma cepa) con un componente clínico importante en cuanto a la selección del tratamiento adecuado

Lista de referencias

- Alcalá L, Marín M, Martín A, Sánchez-Somolinos M, Catalán P, Peláez MT et al. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infection in Spain: a population-based survey. *Journal of Hospital Infection*. 2011;79:13–17.
- Arora V, Kachroo S, Ghantaji SS, Dupont HL, Garey KW. High Horn's index score predicts poor outcomes in patients with *Clostridium difficile* infection. *Journal of Hospital Infection*. 2011;79(1):23-26.
- Asensio A, Monge D. Epidemiología de la infección por *Clostridium difficile* en España. *Revista de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2012;30(6):333–337.
- Bagdasarian N, Rao K, Malani PN. Diagnosis and Treatment of *Clostridium difficile* in Adults: A Systematic Review. *JAMA Internal Medicine*. 2015;313(4):398-408.
- Bartlett JG. Historical perspectives on studies of *Clostridium difficile* and *C. difficile* infection. *Clinical Infectious Diseases*. 2008; 46(1):4-11.
- Bauer MP, Notermans DW, Van Benthem BHB, Brazier JS, Wilcox MH, Rupnik M. et al. (2011). *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey. *The Lancet*. 2011;377:63-73.
- Berrutti D, Limongi G, Cancela M. Colitis por *Clostridium Difficile*. *Archives of Internal Medicine*. 2012; 34(1): 4-4.
- Blanco A, Ruiz O, Otero W, Gómez M. Infección por *Clostridium difficile* en ancianos. *Revista Colombiana de Gastroenterología*.2013;28 (1).
- Calvo N, Siller M, Asensio-Calle ML, De Frutos-Serna M. Mejora del diagnóstico de infección por *Clostridium difficile* toxigénico. *Revista de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2012;30(7).
- García P, Allende F, Legarraga P, Huilcaman M, Solari S. Identificación bacteriana basada en el espectro de masas de proteínas: Una nueva mirada a la microbiología del siglo XXI. *Revista Chilena de Infectología*. 2012;29(3):263-272.
- Davies KA, Longshaw CM, Davis GL, Bouza E, Barbut F, Barna Z et al. Underdiagnosis of *Clostridium difficile* across Europe: the European, multicentre, prospective, biannual, point-prevalence study of *Clostridium difficile* infection in hospitalised patients with diarrhoea (EUCLID). *The Lancet Infectious Diseases*. 2014;14(12):1208-1219.
- Dubberke ER, Carling P, Carrico R, Donskey CJ, Loo VG, McDonald LC, et al. Strategies to prevent *Clostridium difficile* infections in acute care hospitals. *Infection Control & Hospital Epidemiology*. 2014;35(6):628-645.
- Garimella PS, Agarwal R, Katz A. The utility of repeat enzyme immunoassay testing for the diagnosis

of *Clostridium difficile* infection: a systematic review of the literature. *Journal of Postgraduate Medicine*. 2012;58(3):194-198.

Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, 5th edition. U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA 2009.

Hall IC, O'Toole E. Intestinal flora in new-born infants with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. *The American Journal of Diseases of Children*. 1935;49(2):390-402.

Louie TJ, Miller MA, Mullane KM, Weiss K, Lentnek A, Golan Y et al. Fidaxomicin versus vancomycin for *Clostridium difficile* infection. *New England Journal of Medicine*. 2011;364(5):422-431.

Miller MA, Louie T, Mullane K, Weiss K, Lentnek A, Golan Y et al. Derivation and validation of a simple clinical bedside score (ATLAS) for *Clostridium difficile* infection which predicts response to therapy. *BMC Infectious Diseases*. 2013;13:148.

Mulherin DW, Hutchison AM, Thomas GJ, Hansen RA, Childress DT. Concordance of the SHEA-IDSA severity classification for *Clostridium difficile* infection and the ATLAS bedside scoring system in hospitalized adult patients. *Infection*. 2014;42(6):999-1005.

Mullane K, Lee C, Bressler A, Buitrago M, Weiss K, Dabovic K, et al. Multicenter, Randomized Clinical Trial To Compare the Safety and Efficacy of LFF571 and Vancomycin for *Clostridium difficile* Infections. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 2015;59(3):1435-1440.

Ozawa TT, Valadez T. *Clostridium difficile* infection associated with levofloxacin treatment. *Tennessee Medicine: Journal of the Tennessee Medical Association*. 2002; 95(3):113-5.

Riggs MM, Sethi AK, Zabarsky TF, Eckstein EC, Jump RL, Donskey CJ. Asymptomatic carriers are a potential source for transmission of epidemic and nonepidemic *Clostridium difficile* strains among long-term care facility residents. *Clinical Infectious Diseases*. 2007;45(8):992-998.

Rodríguez-Pardo D, Mirelis B, Navarro F. Infecciones producidas por *Clostridium difficile*. *Revista de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2013;31(4).

Ruiz MV, Villa JC, López-Hermosa P. Diarrea por *Clostridium difficile* en relación con levofloxacino. *SEMERGEN - Medicina de Familia*. 2004;30(7):356-359.

Rupnik M, Wilcox MH, Gerding DN. *Clostridium difficile* infection: New developments in epidemiology and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*. 2009;7:526–536.

Theriot CM, Schumacher CA, Bassis CM, Seekatz AM, Young VB. Effects of Tigecycline and Vancomycin Administration on Established *Clostridium difficile* Infection. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 2015;59(3):1596-1604.