

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de
Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica



53

Diagnóstico microbiológico de la infección por *Clostridium difficile*

Editores

Emilia Cercenado Mansilla
Rafael Cantón Moreno

Coordinador

Luis Alcalá Hernández

Autores

Luis Alcalá Hernández
Mercedes Marín Arriaza
Ana Mena Ribas
Jordi Niubó Bosh



ISBN: 978-84-608-1491-7

EDITORES:

Emilia Cercenado Mansilla. Servicio de Microbiología. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid.

Rafael Cantón Moreno, Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Ramón y Cajal e Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS). Madrid.

SUGERENCIA DE CITACIÓN:

Alcalá Hernández L, Marín Arriaza M, Mena Ribas A, Niubó Bosh J. Diagnóstico microbiológico de la infección por *Clostridium difficile*. 53. Alcalá Hernández L (coordinador). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2015.

AVISO:

Reservados todos los derechos. Los documentos SEIMC o cualquiera de sus partes no podrán ser reproducidos, almacenados, transmitidos, distribuidos, comunicados públicamente o transformados mediante ningún medio o sistema sin la previa autorización de sus responsables, salvo excepción prevista por la ley. Cualquier publicación secundaria debe referenciarse incluyendo “Este documento ha sido elaborado por la SEIMC (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica) y su contenido puede encontrarse en la página web www.seimc.org”

Procedimientos en Microbiología Clínica

Diagnóstico microbiológico
de la infección por *Clostridium difficile*

Editores:

Emilia Cercenado Mansilla
Rafael Cantón Moreno

53. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LA INFECCIÓN POR *CLOSTRIDIUM DIFFICILE*. 2015

Coordinador:

Luis Alcalá Hernández

Autores:

Luis Alcalá Hernández¹
Mercedes Marín Arriaza¹
Ana Mena Ribas²
Jordi Niubó Bosh³



¹ Servicio de Microbiología y Enfermedades Infecciosas. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid,
² Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Son Espases. Palma de Mallorca, ³ Servicio de Microbiología.
Hospital Universitari de Bellvitge. L'Hospitalet de Llobregat.

ÍNDICE DEL DOCUMENTO CIENTÍFICO

1.	Introducción.....	6
2.	Consideraciones clínicas.....	6
	2.1. Infecciones intestinales por <i>Clostridium difficile</i>	8
	2.1.1. Diarrea asociada a <i>C. difficile</i>	8
	2.1.2. Otras infecciones intestinales.....	9
	2.2. Infecciones extraintestinales por <i>C. difficile</i>	9
3.	Recogida de la muestra.....	10
4.	Transporte y conservación de la muestra.....	10
5.	Manejo de la muestra en su recepción en el laboratorio de Microbiología.....	10
6.	Pruebas diagnósticas de la infección por <i>C. difficile</i>	11
	6.1. Pruebas de detección rápida.....	11
	6.1.1. Detección de las toxinas A y/o B.....	11
	6.1.2. Detección de la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH).....	12
	6.1.3. Detección de los genes de las toxinas A y/o B.....	12
	6.1.4. Otros métodos de detección rápida.....	13
	6.2. Otras pruebas de detección.....	13
	6.2.1. Detección de la toxina B de <i>C. difficile</i> en las heces sobre cultivo celular.....	13
	6.2.2. Cultivo toxigénico.....	13
7.	Procedimientos diagnósticos de la infección por <i>C. difficile</i>	14
	7.1. Algoritmos diagnósticos rápidos.....	14
	7.2. Otros procedimientos de diagnóstico rápido.....	16
	7.3. Procedimientos diagnósticos de referencia.....	16
8.	Procedimientos diagnósticos en situaciones especiales.....	17
9.	Estudios de sensibilidad <i>in vitro</i> a los antimicrobianos.....	18
10.	Caracterización molecular de <i>C. difficile</i>	19
	10.1. Importancia de la caracterización molecular de <i>C. difficile</i> toxigénico.....	19
	10.2. Epidemiología molecular de <i>C. difficile</i>	19
	10.3. Métodos habituales de tipado molecular de <i>C. difficile</i>	20
	10.3.1. PCR-ribotipado.....	21
	10.3.2. Electroforesis en campo pulsado (PFGE).....	22
	10.3.3. Análisis de fragmentos de restricción (REA).....	22
	10.3.4. Variabilidad del número de repeticiones en tándem en múltiples locus (MLVA).....	22
	10.3.5. Tipado de secuencias de múltiples locus (MLST).....	23
	10.4. Otros métodos de caracterización molecular de <i>C. difficile</i>	23
	10.4.1. Toxinotipado.....	23
	10.4.2. Secuenciación del genoma completo (WGS).....	24
	10.5. Requerimientos de los aislados en los estudios de tipado molecular de <i>C. difficile</i>	24

11	Información de resultados.....	25
12	Bibliografía.....	25

DOCUMENTOS TÉCNICOS

1. PNT-CD-1. Detección en las heces de la toxina B de *Clostridium difficile* sobre cultivo celular.
2. PNT-CD-2. Cultivo toxigénico.
3. PNT-CD-3. Procedimientos diagnósticos de la infección por *Clostridium difficile*.
4. PNT-CD-4. Tipado molecular de cepas de *Clostridium difficile* mediante PCR-ribotipado.

1. INTRODUCCIÓN

Clostridium difficile fue descrito por primera vez por Hall y O'Toole en 1935 como un anaerobio estricto esporulado que colonizaba la mucosa intestinal de neonatos sanos. Denominado en un primer momento como *Bacillus difficilis* por la dificultad para ser aislado en medios de cultivo, no fue descrito como agente infeccioso hasta finales de los 70 del siglo pasado cuando se comprobó que ciertas variantes producían unas toxinas (toxinas A y B) con capacidad patógena en humanos.

La infección por *C. difficile* (ICD) se manifiesta habitualmente en forma de diarrea con síntomas que varían desde formas leves hasta episodios severos que pueden poner en peligro la vida del paciente. Dado que *C. difficile* es capaz de producir esporas que persisten en el ambiente durante largos periodos de tiempo y son resistentes a un gran número de desinfectantes, este patógeno es altamente transmisible, especialmente a partir de las manos del personal sanitario. Actualmente, la ICD es la primera causa de diarrea nosocomial en los países desarrollados y uno de los principales agentes etiológicos de la diarrea de adquisición comunitaria. La irrupción de la cepa hipervirulenta de *C. difficile* NAP1/BI/027 en Canadá a principios de este siglo y su propagación a Estados Unidos y gran parte de Europa ha contribuido enormemente tanto al aumento de la incidencia de la ICD como a su mortalidad asociada en estos países. Un estudio realizado en 2011 estimó en cerca de medio millón el número de episodios anuales de ICD en EEUU y en 30.000 el número de muertos que producía esta enfermedad. Debido a que la ICD no es una enfermedad de declaración obligatoria en España no existen datos oficiales acerca de la incidencia de esta infección en nuestro país aunque se estima que se producen anualmente alrededor de 30.000 episodios con un gasto asociado de más de 100 millones de euros. Hasta hace poco, España se había mantenido al margen de la epidemia de la cepa NAP1/BI/027 con la existencia de solo unos pocos casos aislados. Sin embargo, su incidencia ha aumentado desde 2014 hasta el punto que varios hospitales han tenido importantes brotes que han llegado a afectar a cientos de pacientes.

La prevención es, claramente, el mejor instrumento que tenemos para reducir la incidencia de la ICD nosocomial. El aislamiento de contacto del paciente infectado y, especialmente, el cumplimiento estricto del protocolo de lavado de manos son fundamentales

para evitar la transmisión de *C. difficile*. Un factor clave para asegurar el éxito de las medidas de prevención es, sin duda, un óptimo diagnóstico de la ICD basado en dos pilares fundamentales: una correcta sospecha clínica del episodio y un diagnóstico de laboratorio rápido y certero que se acompañe de una información rápida del resultado obtenido tanto al clínico que atiende al paciente como al preventivista y al personal de enfermería. Diversos estudios realizados a lo largo de estos últimos años han mostrado que sigue existiendo una falta de sospecha clínica de la ICD en aquellos pacientes que no cumplen los factores de riesgo tradicionales por lo que existe un importante infradiagnóstico, sobre todo, en pacientes jóvenes y en pacientes no hospitalizados. Sin duda alguna, el diagnóstico de laboratorio de la ICD es el factor relacionado con la detección de la ICD que más ha evolucionado a lo largo de estos últimos años, pasando de basarse en técnicas lentas y poco sensibles a técnicas muy rápidas que ofrecen resultados en pocos minutos tras la recepción de la muestra y con unos valores óptimos de sensibilidad y especificidad. Por otra parte, se han desarrollado técnicas de caracterización molecular cada vez más rápidas y precisas que nos permiten diferenciar distintos clones de *C. difficile* y poder, así, detectar brotes de ICD y facilitar su control y eliminación.

El presente documento pretende realizar una revisión de los aspectos clínicos de la ICD y una revisión en profundidad del diagnóstico de laboratorio de esta enfermedad, desde la toma de la muestra hasta la caracterización molecular de los aislados pasando por las diferentes etapas del diagnóstico de laboratorio de la ICD.

2. CONSIDERACIONES CLÍNICAS

La ICD puede cursar con diferentes manifestaciones clínicas que comprenden desde una diarrea leve o moderada a colitis pseudomembranosa fulminante, megacolon tóxico y muerte (tabla 1). El tipo de enfermedad y su gravedad dependerán tanto de factores del microorganismo como del paciente, principalmente de la virulencia de la cepa infectiva y de la respuesta inmune del hospedador. El contacto con esporas de una cepa de *C. difficile* productora de toxinas en combinación con la alteración de la microbiota colónica permite la colonización por este microorganismo. Las cepas toxigénicas de *C. difficile*, a diferencia de las no toxigénicas, poseen un locus de patogenicidad (PaLoc) donde se localizan los genes que codifican para las

Tabla 1. Cuadros clínicos compatibles con ICD

Cuadro clínico	Comentarios
Diarrea	<p>a. Deposiciones sueltas, que adquieren la forma del receptáculo o tipo 5 a 7 en la escala de Bristol</p> <p>b. Frecuencia de deposiciones percibida como muy alta por parte del paciente</p>
Íleo	<p>a. Signos de disrupción severa del tránsito intestinal como vómitos y ausencia de deposiciones</p> <p>b. Signos radiológicos de distensión intestinal</p>
Megacolon tóxico	<p>a. Signos radiológicos de distensión del colon</p> <p>b. Respuesta inflamatoria sistémica severa</p>

toxinas A y B (*tcdA* y *tcdB*), exotoxinas que principalmente causan la desestructuración del citoesqueleto y muerte celular, que puede conllevar la pérdida de la barrera intestinal y colitis neutrofílica. Además, algunas cepas toxigénicas poseen la capacidad de producir una tercera toxina, conocida como toxina binaria. Se trata de una ADP-ribosiltransferasa codificada por genes que no se encuentran en el PaLoc y cuyo papel en la patogénesis no está todavía muy claro. Otros factores de virulencia importantes que contribuyen a la patogénesis de *C. difficile* incluyen adhesinas, fimbrias, flagelos, cápsula y proteínas de la capa superficial.

Los principales factores de riesgo que se han asociado con este tipo de infección son la exposición antibiótica (especialmente a clindamicina, cefalosporinas, betalactámicos y fluoroquinolonas), la hospitalización prolongada, el ingreso en una unidad de cuidados intensivos, la proximidad física de un individuo infectado, la edad avanzada (mayores de 65 años), la gravedad de otra enfermedad subyacente, la inmunosupresión, una escasa respuesta inmune a las toxinas de *C. difficile*, la realización de procedimientos gastrointestinales no quirúrgicos y, posiblemente, el uso de antiácidos.

Aunque los pacientes mayores hospitalizados y en tratamiento antibiótico son el principal grupo de riesgo de esta infección, se ha observado un aumento de casos en poblaciones especiales como pueden ser niños, pacientes inmunodeprimidos o pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal. Por otro lado, cada vez se observan más casos de infecciones asociadas o adquiridas en la comunidad, de hecho, constituyen

en torno a un 25% del total de casos de ICD y se dan en pacientes que no presentan los factores de riesgo tradicionales sino que muchas veces se trata de pacientes jóvenes que no han tenido relación con instituciones sanitarias o tratamiento antibiótico. Se considera ICD adquirida en la comunidad cuando el paciente no ha pernoctado en un centro socio-sanitario en las 12 semanas previas al comienzo de la infección. En definitiva, esto conlleva que deba descartarse la ICD en cualquier tipo de paciente que presente diarrea persistente.

Debe tenerse en consideración que el 1-3% de la población son portadores sanos así como alrededor de un 20% de los pacientes hospitalizados (posiblemente con inmunidad natural) y que, en consecuencia, no debe solicitarse el estudio de *C. difficile* en pacientes que no presentan sintomatología. Además, alrededor del 80% de los niños menores de 1 año suelen ser portadores asintomáticos de este patógeno, probablemente por la falta de receptores para las toxinas en su intestino. En este sentido, debe actuarse con precaución a la hora de realizar el diagnóstico de ICD en niños, realizándose únicamente en aquellos que presenten diarrea clínicamente significativa y descartando siempre otros posibles enteropatógenos.

En los pacientes con síntomas clínicos la enfermedad puede clasificarse según diferentes criterios de gravedad que se resumen en la tabla 2. Esta clasificación es importante a la hora de valorar la necesidad de tratamiento, el tipo de terapia antimicrobiana o, incluso, la necesidad de cirugía o ingreso en una unidad de cuidados intensivos para controlar la infección.

Tabla 2. Clasificación de la ICD según la gravedad de la enfermedad (adaptado de Bagdasarian *et al.*, JAMA 2015)

Categoría de la ICD	Signos clínicos y de laboratorio	Factores de riesgo asociados
Leve a moderada	Diarrea sin signos sistémicos de infección, recuentos leucocitarios de < 15.000/ μ l, creatinina sérica <1,5 veces el nivel basal	Uso de antibióticos, hospitalización previa, prolongada estancia hospitalaria, uso de inhibidores de la bomba de protones, quimioterapia, enfermedad renal crónica, sonda alimentación
Grave	Signos sistémicos de infección y/o recuentos leucocitarios de \geq 15.000/ μ l o creatinina sérica \geq 1,5 veces el nivel basal	Edad avanzada, infección por la cepa BI/NAP1/027
Grave, complicada	Signos sistémicos de infección incluyendo hipotensión, íleo o megacolon	Todos los anteriores más cirugía reciente, historia de enfermedad inflamatoria intestinal y tratamiento intravenoso con inmunoglobulinas
Recurrente	Recurrencia en las 8 semanas siguientes tras haber completado el tratamiento para ICD correctamente	Paciente de \geq 65 años, uso concomitante de antibióticos, presencia de comorbilidades significativas, uso concomitante de inhibidores de la bomba de protones, mayor gravedad del episodio inicial, alta carga de <i>C. difficile</i> en muestra de heces

2.1. INFECCIONES INTESTINALES POR *Clostridium difficile*

Las manifestaciones intestinales de la ICD pueden ir desde la diarrea leve-moderada a manifestaciones más severas con presencia de dolor abdominal, fiebre y leucocitosis. La ICD fulminante o grave complicada se caracteriza por presentar lesiones inflamatorias y la formación de pseudomembranas en el colon (colitis pseudomembranosa), megacolon tóxico o perforación intestinal que puede llevar a sepsis, shock o muerte.

El riesgo de recurrencia oscila entre un 20% tras la infección inicial a un 60% tras múltiples recurrencias, siendo la tasa de recurrencia similar en la infección nosocomial o adquirida en la comunidad. Los factores de riesgo de la infección recurrente incluyen edad avanzada, un episodio inicial grave de *C. difficile*, el uso concomitante de antibióticos y una alta carga de *C. difficile* en muestra de heces.

2.1.1. Diarrea asociada a *C. difficile*

La diarrea es la manifestación clínica más frecuente en la ICD y está mediada por las toxinas A y B. De hecho, *C. difficile* es un microorganismo no invasivo en sí mismo, de modo que la infección fuera del co-

lon es extremadamente rara. Se define como diarrea la presencia de heces sueltas (que adoptan la forma del recipiente o clasificadas entre los tipos 5 y 7 en la escala de Bristol), acompañada de tres deposiciones en 24 horas o menos, o bien, la percepción por parte del paciente de un número de deposiciones más elevado de lo normal. En ocasiones se puede dar incontinencia fecal y los pacientes pueden experimentar más de 10 deposiciones al día, aunque el número suele ser considerablemente menor. Suele tratarse de heces acuosas, verdosas y con un característico mal olor aunque, en ocasiones, pueden ser mucosas y blandas. La presencia de sangre es rara.

C. difficile es la principal causa de diarrea nosocomial en países desarrollados. La presentación clínica más frecuente de ICD es la diarrea asociada al consumo de antibióticos provocando entre un 15 y un 25% de los casos de diarrea asociada a antibióticos (DAA). La probabilidad de que *C. difficile* sea la causa de DAA aumenta con la gravedad de la enfermedad alcanzando el 95-100% en pacientes con colitis pseudomembranosa. El inicio de la diarrea se produce típicamente durante o poco después de recibir terapia antibiótica pero puede ocurrir desde unos pocos días después

del inicio del tratamiento antibiótico hasta 8 semanas tras finalizar el tratamiento. En un 5-15% de los episodios de ICD el paciente no ha tomado antibióticos en los últimos meses.

La enfermedad leve se caracteriza por presentar únicamente diarrea en ausencia de síntomas y signos de colitis, mientras que los pacientes con enfermedad moderada suelen presentar diarrea con evidencia de colitis caracterizada por fiebre y cólico abdominal, normalmente en los cuadrantes inferiores. Algunos signos típicos de laboratorio en la ICD leve-moderada son leucocitosis <15.000 cél/ μ l y niveles de creatinina sérica por debajo de 1,5 veces los niveles premorbididad.

Las manifestaciones sistémicas suelen aparecer en caso de enfermedad moderada o grave. La evidencia de colitis grave incluye fiebre (de hasta 40°C), cólico abdominal, leucocitosis ≥ 15.000 cél/ μ l, hipoalbuminemia (con niveles de albúmina sérica $<2,5$ mg/dl), presencia de leucocitos en heces e inflamación colónica visualizada por endoscopia (para pseudomembranas) o tomografía axial computerizada (para observar el engrosamiento de la pared del colon). Como se ha comentado anteriormente, la presencia de colitis pseudomembranosa puede ser suficiente para el diagnóstico de la ICD en ausencia de otra causa evidente, ya que está causada por *C. difficile* en la gran mayoría de los casos. Ésta se diagnostica mediante endoscopia, tras colectomía o bien en la autopsia.

La enfermedad fulminante por *C. difficile* ocurre en menos del 5% de los pacientes y se caracteriza por dolor abdominal severo, diarrea abundante (aunque en ocasiones puede cursar sin diarrea), mientras el paciente progresa rápidamente al desarrollo de íleo o megacolon tóxico (ver punto 2.1.2).

2.1.2. Otras infecciones intestinales

La enfermedad grave por *C. difficile* puede causar íleo que puede evolucionar a megacolon tóxico, condición en la que el colon se distiende más de 6 cm con peligro de perforación. El recuento leucocitario puede llegar a ser de 50.000 cel/ μ l o superior. Estos casos se consideran de mal pronóstico y pueden indicar la necesidad de cirugía urgente. La presencia de niveles de lactato sérico > 5 mmol/L también es pronóstico de una mala evolución.

La definición de íleo incluye signos de disrupción severa del tránsito intestinal como vómitos y ausencia de deposiciones, combinado con signos radiológicos de distensión intestinal. Por lo tanto, incluso en ausencia

de diarrea hay que plantearse la sospecha de ICD en pacientes con exposición reciente a antibióticos, que presenten síntomas como fiebre de origen desconocido, leucocitosis y dolor abdominal. Estos casos se observan con más frecuencia en pacientes operados que reciben narcóticos para el dolor.

El megacolon tóxico se define mediante signos radiológicos de distensión del colon combinado con una respuesta inflamatoria sistémica severa con náuseas, vómitos, deshidratación, letargia o taquicardia además de fiebre y dolor abdominal. Los pacientes con enfermedad avanzada pueden tener una reacción leucemoide con recuentos leucocitarios de >100.000 cél/ μ l, shock y fallo renal, o bien podrían tener hipoalbuminemia severa resultando en anasarca.

En general, se puede considerar que un episodio de ICD es grave si se cumple uno o más de los siguientes criterios:

- Recuento leucocitario ≥ 15.000 cél/ μ l
- Incremento de la creatinina $>50\%$ de los niveles basales
- Se considera que un episodio es grave y complicado si se cumple alguno de los siguientes criterios:
 - Presión arterial baja o sepsis
 - Íleo paralítico
 - Megacolon tóxico
 - Perforación intestinal
 - Ingreso en UCI
 - Cirugía debido a complicaciones de la ICD
 - Muerte

2.2. INFECCIONES EXTRAINTESTINALES POR *C. difficile*

Aunque la patología intestinal es la manifestación más frecuente de ICD, también se han descrito casos de infección extraintestinal, representando aproximadamente un 0,6% de todas las infecciones por este patógeno. Este tipo de infecciones ocurren predominantemente en pacientes hospitalizados que presentan comorbilidades significativas, especialmente en aquellos que han sufrido una manipulación quirúrgica reciente del tracto gastrointestinal y con factores de riesgo comunes a la ICD intestinal (población de edad avanzada, inmunocomprometida, con una alta exposición a los antibióticos, antiácidos, quimioterapia y cuidados sanitarios). En general, se caracterizan por presentar una mala evolución con alta mortalidad, sobre todo cuando se trata de infecciones tempranas o con enfermedad grave asociada.

Los factores de virulencia responsables de las infecciones extraintestinales no se conocen bien aunque se han descrito numerosos casos en los que la infección está causada por cepas de *C. difficile* no productoras de toxinas A y/o B, sugiriendo la implicación de factores de virulencia no toxigénicos. Por otro lado, son frecuentes las infecciones polimicrobianas aunque también puede observarse *C. difficile* como único patógeno causante de la infección.

La mayoría de las infecciones se caracterizan por afectar a la región abdominopélvica debido, generalmente, a una perforación intestinal tras infección o a una filtración tras cirugía. También se han descrito casos de infección de herida tras contaminación por heces, o bacteriemia, pudiendo producirse infecciones en otras localizaciones mediante diseminación por bacteriemias transitorias.

3. RECOGIDA DE LA MUESTRA

La muestra adecuada para el diagnóstico de la diarrea producida por *C. difficile* en el laboratorio de Microbiología son heces acuosas, sueltas o no formes recogidas en recipientes estériles, de cierre hermético y sin medio de transporte (muestra de heces frescas). Sin embargo, diferentes estudios han demostrado que los recipientes con medio de transporte que se utilizan habitualmente para el estudio de otros enteropatógenos como, por ejemplo, el medio de Cary Blair, pueden ser igualmente útiles para la detección de *C. difficile*.

A diferencia de otros enteropatógenos, se recomienda recoger una sola muestra de heces durante el curso de un mismo episodio de ICD ya que la detección rutinaria de múltiples muestras apenas aumenta el rendimiento y puede generar falsos positivos por lo que se considera una práctica no coste-eficaz. Sólo en casos de epidemia podría ser recomendable la aceptación de una segunda muestra ya que el aumento de la prevalencia de la enfermedad derivado de la situación epidémica incrementaría considerablemente el valor predictivo de los resultados positivos. No se recomienda la detección de *C. difficile* para la confirmación de la curación postratamiento de la ICD ya que no tiene correlación con la resolución de los síntomas. Por tanto, se han de rechazar las muestras de heces pertenecientes a todo paciente diagnosticado microbiológicamente de ICD en los 7 días previos, como mínimo, al envío de la muestra.

Únicamente en aquellos casos en los que no sea posible obtener muestra de heces (íleo, megacolon tóxico o distensión abdominal sin diarrea) se puede aceptar una

muestra rectal o perirectal. La detección de *C. difficile* en biopsias colónicas es menos sensible que en muestras de heces en pacientes que presentan colitis.

4. TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

El transporte de las muestras debe realizarse lo antes posible al laboratorio de Microbiología. En general, se recomienda conservar la muestra en frío (2-8°C) durante las primeras 48-72 h o congelada (de -60 a -80°C) si no se va a procesar la muestra durante las 72 horas posteriores a su recogida. Debe tenerse en cuenta que las toxinas de *C. difficile* se degradan rápidamente a temperatura ambiente. Aunque el cultivo no queda tan afectado como la detección de las toxinas debido a la capacidad de *C. difficile* de producir esporas, se ha comprobado que su rendimiento diagnóstico también disminuye. Las condiciones de tiempo y temperatura tanto para el transporte de la muestra como para su conservación se detallan en el número 1a de los Procedimientos en Microbiología Clínica.

5. MANEJO DE LA MUESTRA EN SU RECEPCIÓN EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

Las muestras para detección de *C. difficile* toxigénico deben procesarse lo antes posible una vez que llegan al laboratorio. En principio, no se requiere ningún tipo de procesamiento de éstas para la realización de las técnicas rápidas que se utilizan habitualmente (detección de glutamato deshidrogenasa y toxinas, y técnicas comerciales de amplificación de ácidos nucleicos). Diversos estudios tanto nacionales como internacionales demuestran que, incluso en el mejor de los escenarios, existe una falta de sospecha clínica de la ICD en pacientes con procesos diarreicos que conlleva a un infra-diagnóstico de esta infección. Por ello, se recomienda procesar para diagnóstico de la ICD las muestras procedentes de pacientes con diarrea independientemente de su edad (salvo menores de 2 años), su origen (hospitalizado o comunitario) o la petición microbiológica del clínico demandante. Las únicas excepciones serían aquellas muestras de heces transportadas en medios esporicidas como algunos medios de transporte para parásitos que contienen formaldehído.

En caso de que se vaya a realizar el ensayo de citotoxicidad directa deben filtrarse las heces mediante un filtro de membrana. Por otro lado, si se va a realizar

un cultivo, optativamente puede realizarse un pretratamiento de las heces mediante shock con etanol absoluto homogeneizando volúmenes iguales de muestra durante 5 minutos (se ha comprobado que 5 minutos de contacto son tan eficaces como 60 minutos para eliminar a los microorganismos no esporulados), o mediante choque térmico de 15 minutos a 80°C con el fin de incrementar la sensibilidad (sólo recomendable para medios de cultivo muy poco selectivos).

La adecuada frecuencia de realización de las técnicas diagnósticas de la ICD es clave para conseguir un correcto manejo del paciente. Se recomienda realizar el diagnóstico de la ICD al menos una vez al día, incluidos los fines de semana y los festivos, con la muestra acumuladas hasta entonces aunque lo ideal sería realizar el diagnóstico conforme la muestra se recibe en el laboratorio.

Los detalles sobre la recepción de muestras en el laboratorio se han descrito en el número 1a de los Procedimientos en Microbiología Clínica.

6. PRUEBAS DIAGNÓSTICAS DE LA INFECCIÓN POR *C. difficile*

Las pruebas de laboratorio para la detección de *C. difficile* no pueden diferenciar entre colonización asintomática e infección clínica, por ello, para realizar el diagnóstico de la ICD deben cumplirse, al menos, dos criterios: por un lado la detección microbiológica de la toxina y/o aislamiento de *C. difficile* productor de toxina en muestra fecal en ausencia de otra causa para la diarrea o bien existir evidencias colonoscópicas o histopatológicas de colitis pseudomembranosa y, por otro, la presencia de diarrea (>3 deposiciones no formes en 24 horas) o bien, evidencia de íleo o megacolon tóxico mediante pruebas de imagen. El diagnóstico de laboratorio debe realizarse solamente en los pacientes sintomáticos (diarrea y/o dolor abdominal, frecuentemente acompañados de leucocitosis y fiebre) y en heces no formes (niveles 5 a 7 de la escala de Bristol), con la importante excepción de los casos en que haya sospecha de íleo paralítico o megacolon tóxico donde la diarrea puede no estar presente y las heces pueden estar formadas.

Existen multitud de pruebas de laboratorio para el diagnóstico de la ICD, muchas de ellas son técnicas rápidas de detección de antígenos propios de *C. difficile* que ofrecen resultados en pocos minutos u horas y que suelen detectar las toxinas A y/o B aunque tam-

bién pueden detectar otros antígenos. La detección del antígeno glutamato deshidrogenasa (GDH) de *C. difficile* mejora la sensibilidad pero detecta también las cepas de *C. difficile* no productoras de toxina. Durante los últimos años también se han desarrollado técnicas diagnósticas rápidas basadas en la detección de ácidos nucleicos relacionados con las toxinas. Las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos en sus distintas versiones (reacción en cadena de la polimerasa, amplificaciones isotérmicas, etc) son rápidas, sensibles y específicas pero pueden presentar inconvenientes técnicos y económicos.

6.1. PRUEBAS DE DETECCIÓN RÁPIDA

Se dispone de técnicas inmunológicas comerciales para la detección de la toxina A y/o B, para la enzima GDH y, también, combinaciones de ambas (toxinas y GDH). Asimismo, las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos permiten en el mismo día de la recepción de la muestra realizar la detección de los genes que codifican para las toxinas A y/o B.

6.1.1. Detección de las toxinas A y/o B

Dado que la toxina B es el principal factor de patogenicidad de *C. difficile* y que en una proporción significativa de las cepas patógenas la toxina A está ausente, las principales técnicas diagnósticas rápidas suelen incluir la detección de la toxina B o la de su gen. Dado que la toxina binaria tiene un papel discutido en la patogenicidad de la ICD, su detección como método diagnóstico único no está recomendada. Puesto que las toxinas A y B están codificadas por genes incluidos en un mismo locus de patogenicidad, el cual también incluye el gen regulador negativo *tcdC*, las alteraciones en este gen suelen dar lugar a la hiperproducción de las toxinas con el consiguiente aumento del poder patógeno de la cepa en cuestión.

La detección rápida de las toxinas A y/o B se lleva a cabo mediante técnicas de inmunoensayo (IE). La diversidad genética entre diferentes aislados de *C. difficile* en los genes codificantes de las toxinas puede afectar a la afinidad de los anticuerpos utilizados en los equipos comerciales por las toxinas y por tanto a su sensibilidad. Existen diversos ensayos comerciales para la detección inmunológica rápida de las toxinas A y B: éstas van desde técnicas inmunocromatográficas basadas en flujo lateral, que no requieren ninguna tecnología específica, hasta técnicas de enzimoimmunoensayo basadas en una lectura final mediante espectrofotometría o quimioluminiscencia. Los métodos con lectura objetiva permiten la cuantificación o semicuantificación de

la toxina presente en la muestra en los que los valores próximos al punto de corte o en la zona gris se deben evaluar con cautela. La principal desventaja de la detección de toxinas por métodos de IE es su relativa falta de sensibilidad con valores que están en el rango del 40-60% cuando se comparan con el cultivo toxigénico. La especificidad suele ser superior al 90% y en algunos casos se acerca al 100%. El comportamiento de estas técnicas puede dar lugar a un importante número de falsos positivos y falsos negativos. Por ejemplo, con una sensibilidad del 50%, una especificidad del 96% y un porcentaje de positividad de muestras positivas del 10%, el valor predictivo positivo no llega al 60%. Los falsos positivos pueden conducir a tratamientos innecesarios de la ICD, a la retirada de otros antibióticos y al aislamiento inadecuado del paciente que, a veces, puede compartir habitación con un verdadero caso de ICD. Por otra parte, los falsos negativos pueden impedir el tratamiento de los pacientes con ICD y favorecer así la diseminación del patógeno en el medio hospitalario. En un metaanálisis realizado sobre un gran número de técnicas de IE de detección de toxinas ninguna prueba demostró simultáneamente y de forma consistente una sensibilidad superior al 90%, ni una tasa de falsos positivos inferior al 3% por lo que parece evidente que este tipo de procedimientos no pueden ser utilizados de forma aislada para el diagnóstico de la ICD.

6.1.2. Detección de la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH)

La enzima GDH de *C. difficile*, también denominada antígeno común, es una proteína asociada a la bacteria, producida de forma constitutiva y en grandes cantidades por la mayoría de las cepas de *C. difficile*. Otras bacterias presentes en el tracto intestinal expresan una enzima homóloga lo cual dio lugar a inespecificidad en los equipos de detección iniciales. Los ensayos comerciales actuales para la detección inmunológica rápida de GDH utilizan anticuerpos monoclonales, evitando las reacciones cruzadas, y muestran tanto una sensibilidad como una especificidad elevadas. Como en el caso de la detección de las toxinas mediante IE, la metodología para la detección de la GDH varía desde técnicas de inmunocromatografía hasta técnicas de enzimoimmunoensayo con lectura espectrofotométrica o de quimioluminiscencia. Igualmente, se recomienda cautela al evaluar los resultados con valores próximos al punto de corte en los métodos con lectura objetiva, principalmente para evitar falsos positivos. La prueba de GDH detecta tanto las cepas productoras de toxinas como las no productoras de toxina (en este sentido es una prueba comparable al cultivo anaerobio). Debido a su expresión en cantidad

abundante y a la mayor estabilidad de la GDH comparada con la estabilidad de las toxinas A y B, la sensibilidad de su detección es elevada con valores cercanos al 90% cuando se compara con el cultivo toxigénico. Desgraciadamente, el hecho de que la GDH esté presente en las cepas de *C. difficile* no toxigénicas hace que el valor predictivo positivo de la detección de GDH sea relativamente bajo. Por el contrario, la prueba posee un elevado valor predictivo negativo (95-100%).

6.1.3 Detección de los genes de las toxinas A y/o B

Los ensayos basados en la amplificación de ácidos nucleicos han sido los de más reciente introducción para el diagnóstico de la ICD. Tienen la ventaja de poder ser diseñados con múltiples dianas con finalidad tanto diagnóstica como epidemiológica. Es muy abundante la literatura científica que describe estas técnicas moleculares. Algunas se realizan directamente sobre la muestra, sin necesidad de extracción previa del ADN bacteriano y con una mínima intervención por parte del usuario. Unos ensayos utilizan la amplificación mediada por PCR con posterior detección del producto amplificado o mediante PCR a tiempo real mientras que otros se basan en amplificaciones isotérmicas. Se trata de pruebas bastante rápidas (entre 45 minutos y 3 h) con lo que se puede obtener el resultado en el mismo día de la toma de la muestra. Una limitación de estas técnicas es el coste económico de los reactivos y de la instrumentación, aunque estos costes pueden ser compensados por la rapidez en el diagnóstico ya que disminuye los costes asociados a una prolongación de la estancia hospitalaria por retraso en el tratamiento y a la diseminación de *C. difficile* en el medio hospitalario.

La sensibilidad tanto de los equipos comerciales como de los diseñados por diversos grupos de investigación es elevada. Suele ser superior al 90% tanto para los métodos que utilizan PCR como los que realizan amplificación isotérmica, aunque con estos últimos se cuenta con menor experiencia. Los métodos de diseño propio se deben estandarizar de forma estricta en todas sus fases. El sistema de extracción es de gran importancia tanto para la recuperación del ADN bacteriano como para la eliminación de inhibidores de la reacción de amplificación. El uso de la técnica de PCR a tiempo real con sondas específicas permite la detección en forma eficaz, rápida y simultánea de múltiples patógenos causantes de diarrea. La especificidad también es alta con valores en el rango entre el 94% y el 99% según el equipo utilizado y el método de referencia, tanto para los métodos de PCR como para la amplificación isotérmica. Debe tenerse en cuenta que las pruebas

que requieren extracción y, por tanto, mayor manipulación son más susceptibles de contaminación cruzada. Como regla general, los métodos de amplificación de ácidos nucleicos dirigidos al diagnóstico tienen como diana el gen de la toxina B (*tcdB*), para no omitir las cepas A-/B+, aunque algunos detectan el gen de la toxina A (*tcdA*) o incluso uno o ambos genes de la toxina binaria. Otros equipos son capaces de detectar, además, las cepas hipervirulentas del ribotipo 027 aprovechando el hecho de que poseen mutaciones o deleciones en el gen represor *tcdC*. Los métodos basados únicamente en la amplificación de *tcdA* pueden incluso detectar algunas cepas A-/B+ que conserven regiones de este gen (aunque no lo expresen) pero cuando el gen está ausente por completo, evidentemente, no lo detecta. El valor predictivo positivo de estas pruebas es elevado (80-90%) cuando se comparan con el cultivo toxigénico y asumiendo una prevalencia media alrededor del 10%. Del mismo modo, el valor predictivo negativo también es alto (95-99%, dependiendo asimismo de la prevalencia en la institución).

Un resultado positivo en un paciente sintomático indica con alta probabilidad que estamos frente a un paciente con ICD aunque podría tratarse de un paciente colonizado o portador de *C. difficile* con el gen de la toxina B pero que no es capaz de expresar la toxina (opción muy improbable ya que en la actualidad existen muy pocas cepas de este tipo) y que tiene diarrea por otra causa. Un resultado negativo prácticamente excluye la ICD, el estado de portador o la colonización. Existe también un porcentaje menor pero no por ello despreciable, de muestras con resultado indeterminado debido a la presencia de inhibidores.

6.1.4. Otros métodos de detección rápida

Se han comercializado pruebas de inmunocromatografía para la detección simultánea de antígeno GDH y las toxinas A y/o B, y cuya principal ventaja es ofrecer ambos resultados al mismo tiempo. También existen pruebas de inmunocromatografía para detectar las toxinas A y B en el mismo ensayo pero de forma independiente, en estas técnicas la sensibilidad para la detección de la toxina B suele ser menor y el hecho de determinarlas por separado tampoco añade valor para el diagnóstico de la ICD.

6.2. OTRAS PRUEBAS DE DETECCIÓN

6.2.1. Detección de la toxina B de *C. difficile* en las heces sobre cultivo celular

Esta técnica, que también se denomina ensayo de citotoxicidad, detecta la toxina B preformada en heces

mediante la detección de su efecto citopático sobre cultivo celular. Aunque el ensayo de citotoxicidad ha sido considerado la técnica de referencia para el diagnóstico de la ICD durante muchos años cada vez son más los expertos que prefieren otras técnicas más sensibles. Dos de los principales inconvenientes de este método es la necesidad de mantener líneas celulares y su demora diagnóstica ya que la primera lectura se realiza a las 18-24 horas, siendo necesaria una segunda lectura a las 48 horas y pudiéndose prolongar incluso hasta las 72 horas. Como todo método basado en microscopía, la lectura del efecto citopático es subjetiva. Debido a que otros componentes presentes en las heces pueden causar toxicidad inespecífica que puede dar lugar a falsas interpretaciones siempre es necesaria la utilización de una antitoxina (anticuerpos) frente a la toxina B de *C. difficile* para neutralizar este efecto citopático inespecífico. Se puede acortar el tiempo de respuesta mediante el uso de la medida en tiempo real de la impedancia del cultivo utilizando células HS27. Mediante esta técnica y dependiendo de la concentración de toxina en la muestra la detección del efecto citopático se puede realizar entre 30 minutos y 18 horas. Otra dificultad añadida es el mantenimiento del cultivo celular con subcultivos periódicos y de difícil estandarización. Prácticamente cualquier línea celular de las comúnmente utilizadas es adecuada (MRC-5, CHO, Vero, HEp2, HeLa, riñón de mono etc). Como esta técnica detecta la presencia de toxina B y ésta es muy termolábil se recomienda conservar la muestra refrigerada y procesarla lo más rápidamente posible. La especificidad del ensayo de citotoxicidad es del 100%, por lo que un resultado positivo siempre se asocia a ICD. Por el contrario, un resultado negativo no siempre la excluye ya que esta técnica es poco sensible con valores del 50-70% frente al cultivo toxigénico.

6.2.2 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. La adición de tauro-

colato o lisozima puede mejorar la recuperación de *C. difficile*, debido al aumento de la germinación de las esporas. Ciertos medios de cultivo son, además de selectivos, diferenciales ya que contienen sustancias cromógenas que permiten que las colonias de *C. difficile* adquieran una coloración diferente de la del resto de microorganismos. Incluso existen medios que permiten diferenciar entre aislados toxigénicos y no toxigénicos aunque su utilidad en la práctica real está todavía por comprobar. Como ya se ha comentado anteriormente, la capacidad de producir esporas de este microorganismo permite la posibilidad de realizar un pretratamiento de la muestra mediante calor o alcohol con el fin de reducir el crecimiento de la microbiota habitual y es especialmente recomendable cuando el medio de cultivo tiene una baja concentración de antibióticos y, por tanto, una reducida capacidad selectiva que permita crecer a *C. difficile* con poca competencia microbiana. En el número 16 de los Procedimientos en Microbiología Clínica se detallan aspectos importantes sobre el cultivo de las bacterias anaerobias.

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. Presentan un olor muy característico a “cuadra de caballo” debido a la producción de p-cresol y muestran fluorescencia bajo la luz UV. En la tinción de Gram de estas colonias se observan bacilos grampositivos o gramvariables que pueden presentar esporas ovales subterminales. Posteriormente puede confirmarse la identificación mediante pruebas bioquímicas como la producción de L-prolina aminopeptidasa o la detección de GDH, o simplemente, 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 colonia. Tradicionalmente, 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. Debe tenerse en cuenta que a menudo pueden coexistir cepas toxigénicas y no toxigénicas 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. Por otro lado, también existe la posibilidad de observar diferentes fenotipos de *C. difficile* en un mismo cultivo, en cuyo

caso debería determinarse la toxigenicidad de los distintos fenotipos observados si se considera necesario (principalmente si se van a realizar posteriores estudios de sensibilidad antibiótica o tipado molecular a las diferentes cepas). En este sentido, el uso de una lupa en el laboratorio resulta muy aconsejable para incrementar la sensibilidad de la técnica ya que permite detectar tanto colonias de *C. difficile* ocultas entre colonias de otros microorganismos como la diferenciación entre distintos morfotipos de *C. difficile*.

El cultivo toxigénico es una técnica muy sensible y con una alta especificidad, sin embargo, es lenta (1-3 días), laboriosa y requiere personal preparado. Por otro lado, permite la detección de cepas toxigénicas en aquellos casos en los que éstas no se detectan mediante las técnicas rápidas realizadas directamente sobre la muestra y que resultan menos sensibles. El cultivo toxigénico es necesario para realizar tanto monitorización de técnicas implantadas en la rutina diagnóstica como evaluaciones de otras técnicas de diagnóstico nuevas y, además, se trata de una técnica fundamental para poder realizar estudios de epidemiología molecular o sensibilidad antibiótica.

7. PROCEDIMIENTOS DIAGNÓSTICOS DE LA INFECCIÓN POR *C. difficile*

7.1. ALGORITMOS DIAGNÓSTICOS RÁPIDOS

A pesar de la evidente mejora de la calidad de las técnicas diagnósticas de la ICD durante la última década no existe ninguna técnica que, por sí misma, pueda ser lo suficientemente coste-eficaz como para poder ser utilizada en el momento actual para el diagnóstico rápido de la ICD. Aunque las técnicas de detección de toxinas A y/o B mediante IE son técnicas rápidas, sencillas y de bajo coste, su baja sensibilidad y su no suficientemente buena especificidad las descartan como técnicas únicas de diagnóstico de ICD. La detección de GDH mediante IE es una técnica muy sensible pero tiene el inconveniente de no tener una buena especificidad por su capacidad de detectar tanto cepas toxigénicas como no toxigénicas de *C. difficile*. La combinación de la detección de las toxinas y de la GDH mediante IE da lugar a resultados muy específicos pero su sensibilidad queda limitada por la técnica menos sensible, es decir, por la detección de las toxinas. La alta sensibilidad y especificidad de las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos de *C. difficile* las harían candidatas idóneas para el diagnóstico rápido de la ICD si no fuera

porque su alto precio excede el presupuesto de la mayoría de los laboratorios. Evidentemente, el importante retraso diagnóstico tanto del ensayo de citotoxicidad como del cultivo toxigénico los excluyen definitivamente como técnicas diagnósticas rápidas.

Esta falta de métodos suficientemente coste-eficaces como para poder ser utilizados como métodos únicos para el diagnóstico rápido de la ICD ha dado lugar al diseño de varios algoritmos diagnósticos que aprovechan lo mejor de cada una de las técnicas que los integran (figura 1). La mayoría de los algoritmos diagnósticos utilizan como método inicial o método de cribado la detección mediante IE de la enzima GDH debido a su alta sensibilidad diagnóstica. Sin embargo, como su especificidad no es buena se utilizan técnicas confirmatorias para los resultados GDH (+). En un principio, algunas guías internacionales consideraban al ensayo de citotoxicidad o al cultivo toxigénico como técnicas confirmatorias candidatas a los algoritmos diagnósticos, pero el retraso diagnóstico que ambas conllevan las excluyeron rápidamente. Fue así como se encontró un lugar adecuado para las técnicas moleculares ya que se les podía sacar toda su capacidad de detección a un coste muy inferior del que tienen cuando se usan como métodos diagnósticos únicos. Diversos estudios que han evaluado los algoritmos diagnósticos de dos pasos basados en la detección de GDH y en la confirmación de los resultados positivos por técni-

Figura 1a. Algoritmo diagnóstico de 2 pasos.

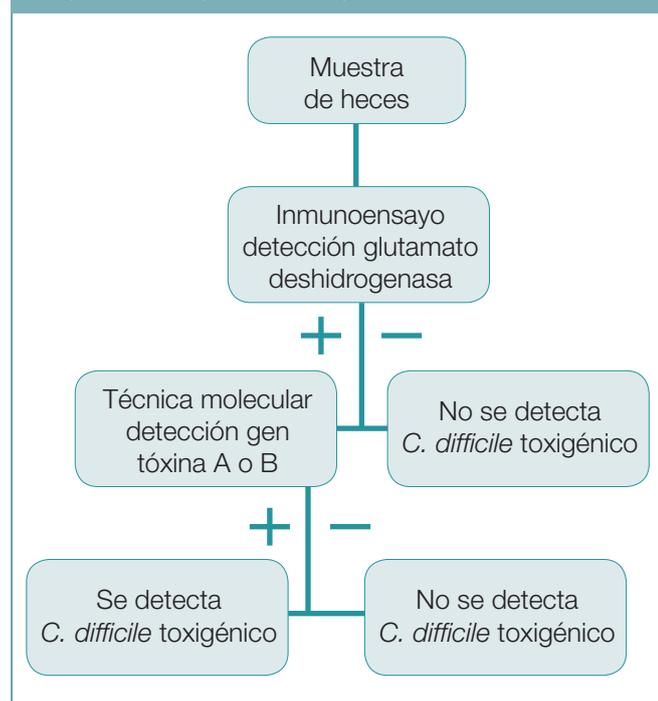


Figura 1b. Algoritmo diagnóstico de 3 pasos.

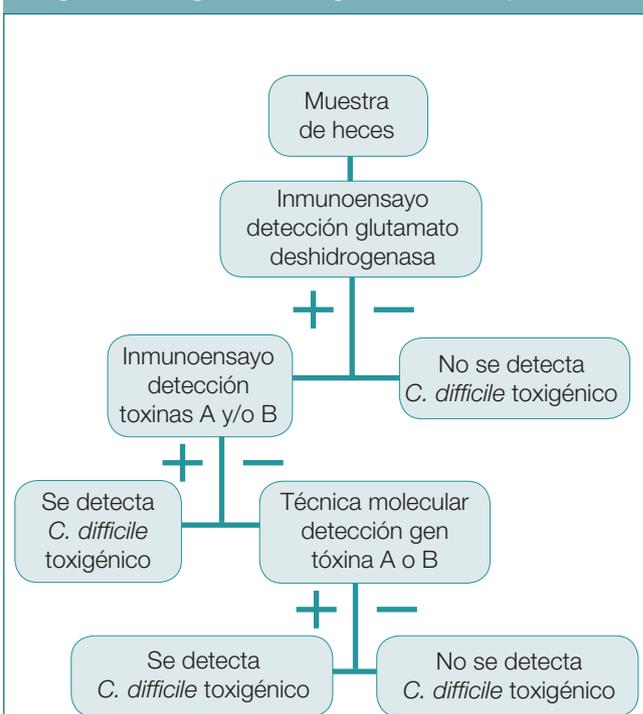


Figura 1c. Algoritmo diagnóstico multipaso con inmunoensayos que detectan simultáneamente glutamato deshidrogenasa y toxina A y/o B.

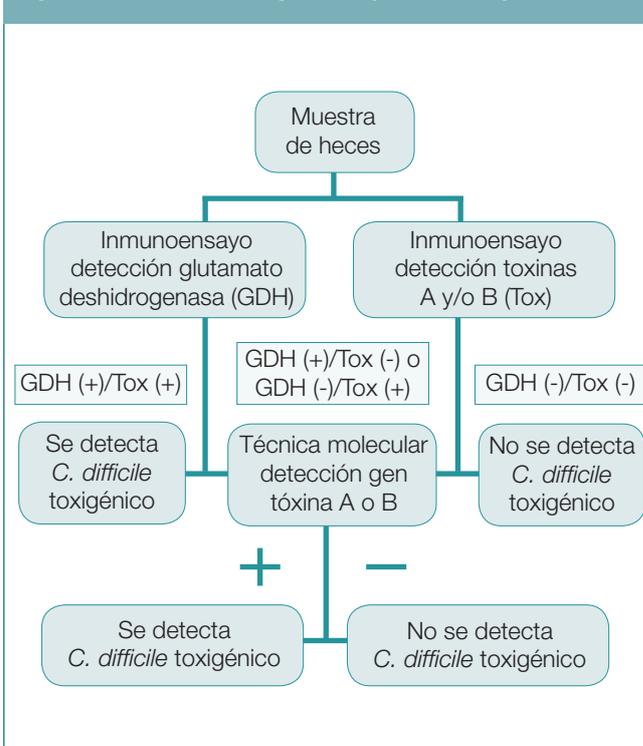


Figura 1. Algoritmos diagnósticos de la infección por *C. difficile*.

cas moleculares han demostrado que poseen valores de sensibilidad cercanos al 90% (sensibilidad limitada por la detección de GDH) y valores de especificidad mayores del 99% con un precio final cercano al de las técnicas basadas en IEs.

Los denominados algoritmos de tres pasos introducen entre la detección de GDH y la técnica molecular un IE que detecta las toxinas A y/o B. De esta forma, los resultados GDH (+) son confirmados por el IE de las toxinas y, en caso de discordancia [GDH(+)/Toxinas (-) o GDH(-)/Toxinas (+)], se utilizan las técnicas moleculares. Los dispositivos que realizan a la vez los IEs de la GDH y de las toxinas reducen el tiempo global del procedimiento. Los estudios que han evaluado el algoritmo de tres pasos muestran que los IEs que detectan las toxinas son capaces de reducir en casi un 50% el número de pruebas moleculares necesarias con el consiguiente ahorro en el uso de estas técnicas diagnósticas.

7.2. OTROS PROCEDIMIENTOS DE DIAGNÓSTICO RÁPIDO

El uso de mezcla de muestras para analizarlas mediante técnicas moleculares es un procedimiento interesante para el diagnóstico de la ICD a bajo coste. Esta estrategia consiste en agrupar muestras de heces para analizar la mezcla conjuntamente con una prueba molecular y así abaratar costes. Si el resultado de la prueba molecular de la mezcla es negativo se asigna a cada una de las muestras de la mezcla un resultado negativo mientras que si el resultado es positivo hay que analizar individualmente cada una de las muestras. Para un número determinado de muestras existe una combinación óptima de muestras que depende del porcentaje de positividad de las muestras recibidas en el laboratorio. Utilizando esta estrategia se puede reducir en un 40-60% el número de pruebas moleculares necesarias con porcentajes de positividad habituales en los laboratorios españoles (5-15%). La utilización de esta estrategia necesita que la técnica molecular reúna dos condiciones fundamentales: por una parte, ha de ser una técnica con suficiente sensibilidad como para mantenerla a pesar de analizar varias muestras a la vez, por otra, el tiempo de respuesta de la técnica molecular no debe ser excesivamente largo ya que este procedimiento requiere frecuentemente que se tenga que realizar análisis secuenciales de confirmación ante resultados positivos. Cuando esta estrategia es utilizada, tanto la sensibilidad como especificidad apenas varían con respecto a los valores de la técnica molecular utilizada de forma individual con un gasto similar al necesario para la realización

del algoritmo diagnóstico. Los inconvenientes de este procedimiento son los ya descritos para las técnicas moleculares.

7.3. PROCEDIMIENTOS DIAGNÓSTICOS DE REFERENCIA

Aunque las pruebas rápidas más coste-eficaces en la actualidad son los algoritmos de dos o tres pasos la principal limitación de estas pruebas es su sensibilidad, que está limitada por la de la prueba de cribado (detección de la GDH) y que no alcanza el 90%. Esta importante limitación hace que estas pruebas no puedan considerarse como procedimientos de referencia para el diagnóstico de la ICD frente a las cuáles poder comparar otras técnicas.

La primera técnica diagnóstica de la ICD que se consideró como método de referencia fue el ensayo de citotoxicidad a finales de la década de los 70 del siglo pasado. Esta técnica, basada en cultivos celulares, se convirtió en la técnica de referencia frente a la cual se comparaban todas las técnicas que se iban desarrollando para el diagnóstico de la ICD. Una de las técnicas que más evolucionaron fue el cultivo toxigénico, que pasó de utilizar medios de cultivo con base de yema de huevo a medios con sangre y con sustancias favorecedoras de la germinación de las esporas. Pronto se comprobó que el aislamiento en estos medios de cultivo junto con la detección sobre colonia de las toxinas daba lugar a una técnica excepcionalmente sensible y específica. Con el desarrollo del cultivo toxigénico se comprobó que el ensayo de citotoxicidad era solamente capaz de detectar en torno a un 50-70% de las muestras con cultivo toxigénico positivo. Este hecho dio lugar a un debate entre los expertos sobre cuál debía ser el estándar de oro para el diagnóstico de la ICD y la respuesta pasaba, sin duda, por establecer el significado clínico de los resultados obtenidos en cada una de las dos técnicas.

Algunos expertos consideran que en aquellas muestras de heces en las que la prueba de citotoxicidad es negativa y aunque el cultivo toxigénico sea positivo no existe toxina B libre en la muestra de heces y, por lo tanto, son muestras que pertenecen a pacientes sin ICD. Estos autores creen que cuando la prueba de citotoxicidad es negativa y el cultivo toxigénico es positivo las muestras contienen aislados de *C. difficile* que contienen el gen de la toxina B pero que no la expresan en el intestino del paciente por lo que son pacientes sin ICD colonizados por cepas potenciales productoras de toxina B y, por tanto, de la enferme-

dad. En resumen, esta hipótesis considera que este grupo de pacientes nunca deben ser tratados aunque recomienda que sean aislados para evitar la transmisión de estas cepas potencialmente patógenas a otros pacientes.

Sin embargo, un número cada vez mayor de expertos considera que unos resultados del ensayo de citotoxicidad negativo y del cultivo toxigénico positivo indican no tanto una ausencia de toxina libre en las heces como una concentración de toxina libre en las heces lo suficientemente baja como para no ser detectada por el ensayo de citotoxicidad y sí por el cultivo toxigénico. Esta hipótesis se apoya en el hecho de la baja sensibilidad del ensayo de citotoxicidad, de la capacidad de estas cepas de producir toxinas *in vitro* y de la variabilidad sensitiva del ensayo de citotoxicidad en muestras seriadas (hasta un 15% de pacientes con ICD y con dos muestras extraídas en un mismo día tuvieron el primer resultado del ensayo de citotoxicidad negativo y el segundo positivo). Esta teoría está siendo cada vez más aceptada y conlleva la idea de que todo paciente con un resultado positivo del cultivo toxigénico, independientemente del resultado de citotoxicidad, debe ser considerado como un posible caso de ICD que debe ser evaluado en último término por el clínico responsable del paciente.

En conclusión, no existe en la actualidad un método de referencia universalmente aceptado por todos los expertos para el diagnóstico de la ICD. Sin embargo, y aunque algunos expertos siguen considerando al ensayo de citotoxicidad como el estándar de oro del diagnóstico de la ICD, la mayor sensibilidad global del cultivo toxigénico y las cada vez más evidentes implicaciones clínicas de los resultados positivos de esta técnica (incluidos aquellos con resultado negativos del ensayo de citotoxicidad) hacen del cultivo toxigénico la técnica recomendada como estándar de oro para el diagnóstico de la ICD por este procedimiento.

8. PROCEDIMIENTOS DIAGNÓSTICOS EN SITUACIONES ESPECIALES

Todas las guías internacionales coinciden en que las muestras de heces no formes son las muestras adecuadas para el diagnóstico de la ICD en pacientes con diarrea. Sin embargo, en aquellos pacientes con íleo o megacolon tóxico se hace muchas veces imposible la obtención de muestras de heces para el diagnóstico de la ICD. En estos casos, las recomendaciones son muy variadas según la guía internacional que se siga.

Por una parte, las guías del *Advisory Committee on Antimicrobial Resistance and Healthcare Associated Infection* recomiendan usar procedimientos como la colonoscopia, recuento leucocitario, creatinina sérica o tomografía axial computerizada. Las guías de la *Society for Healthcare Epidemiology of America* (SHEA) y de la *Infectious Diseases Society of America* (IDSA), en cambio, recomiendan el uso de torundas rectales, mientras que la *American Society for Microbiology* (ASM) solo sugieren el uso de muestras de heces formes, cuando puedan obtenerse, y siempre y cuando se consiga un consenso con el clínico. En nuestra experiencia, el uso de dos torundas rectales y la realización, si es posible, de técnicas moleculares directamente sobre una de ellas y cultivo toxigénico sobre la otra, constituyen el mejor procedimiento diagnóstico de la ICD en este tipo de pacientes.

El diagnóstico de la ICD en pacientes con colitis inespecífica suele basarse en la obtención de una biopsia de colon y en la detección de *C. difficile* toxigénico mediante ensayo de citotoxicidad o mediante cultivo toxigénico. Sin embargo, se ha comprobado que la muestra de heces es mucho más rentable que la biopsia de colon para el diagnóstico de la ICD en este tipo de pacientes. En un estudio comparativo se comprobó que la sensibilidad de la biopsia de colon (21,3%) era significativamente inferior a la de la muestra de heces (94,7%) en pacientes con sospecha de ICD en los que se obtuvieron ambas muestras.

En el caso extraordinario de que el laboratorio de Microbiología sólo tuviera una muestra de biopsia de colon de un paciente con sospecha de ICD y no fuera posible obtener otro tipo de muestra, la recomendación es la de aplicar la técnica más sensible disponible en el laboratorio. Por tanto, lo recomendable sería realizar una técnica molecular directamente sobre la muestra machacada y, si es posible, también hacer cultivo toxigénico.

Como actualmente se recomienda procesar para diagnóstico de la ICD toda muestra de heces no forme de cualquier paciente mayor de 2 años independientemente de la petición clínica, el aumento de volumen de muestras que implica seguir esta recomendación puede exceder el presupuesto del laboratorio. En este caso, una posibilidad sería realizar tanto el algoritmo como el cultivo en aquellas muestras con petición clínica de ICD y realizar solo el cultivo toxigénico en las muestras sin sospecha clínica ya que estas últimas suelen tener un menor porcentaje de positividad y suelen pertenecer a pacientes menos graves.

Debido a que las infecciones producidas por los aislados de *C. difficile* del ribotipo 027 suelen ser más graves, transmisibles y recurrentes que las producidas por otros aislados se recomienda establecer una especial vigilancia para detectar este ribotipo, optimizar el tratamiento y evitar que se disemine este clon en el ambiente hospitalario. Por tanto, en instituciones en las que exista una sospecha fundada de alto riesgo de brote (casos aislados detectados recientemente, existencia de alguna institución cercana en situación epidémica, etc) o en el seno de un brote por el ribotipo 027 es muy recomendable modificar el algoritmo diagnóstico para facilitar la detección de este ribotipo. Por una parte, convendría realizar alguna técnica molecular que detectase rápidamente este ribotipo. Desgraciadamente, el ribotipado es un procedimiento que necesita tanto de instalaciones especiales como de personal especializado en biología molecular, además, el proceso total tarda varios días ya que parte de los aislados. La única posibilidad pasa por la utilización de técnicas moleculares comerciales o caseras muy específicas y rápidas que detecten, como mínimo, tanto al gen de la toxina A o B, como a este ribotipo sobre muestra de heces directamente. Por otra parte, convendría incorporar esta técnica molecular al algoritmo diagnóstico de forma que pueda detectar el mayor número posible de casos producidos por este ribotipo. Para ello, sería recomendable realizar la detección molecular a cualquier muestra de heces con resultado GDH(+) independientemente del resultado de la detección de las toxinas (en el caso de que el algoritmo incluya la detección de toxinas). Este último punto también es muy importante ya que muchos de los aislados del ribotipo 027 son hiperproductores de toxina por lo que una proporción considerable de muestras que los contienen dan lugar a resultados GDH(+)/Toxinas(+) por lo que no serían analizadas mediante técnicas moleculares si se siguiesen las normas del algoritmo diagnóstico estándar. Otra posibilidad es la implantación de un procedimiento diagnóstico basado en un análisis mediante mezcla de muestras utilizando como técnica molecular alguna que detectase tanto el gen de la toxina A o B como al ribotipo 027 aunque son necesarios más estudios para validar esta técnica en este tipo de situaciones.

9. ESTUDIOS DE SENSIBILIDAD *IN VITRO* A LOS ANTIMICROBIANOS

Hasta hace unos pocos años metronidazol y vancomicina eran los únicos fármacos de elección para el tratamiento de la ICD. Sin embargo, fidaxomicina, un

nuevo fármaco macrólido de 18 átomos de carbono, se ha incorporado recientemente a este selecto grupo como nuevo antimicrobiano 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.

En 1997, en un estudio de sensibilidad realizado con cepas toxigénicas de *C. difficile* aisladas en Francia se encontró una cepa con resistencia intermedia a metronidazol (CMI =16 mg/L, por el método de dilución en agar). Posteriormente, un estudio español realizado con cepas de *C. difficile* de origen clínico y aisladas durante el periodo 1993-2000 encontró un 6,3% de resistencia a metronidazol (CMI \geq 32 mg/L; dilución en agar) demostrando que esta resistencia era heterogénea y que podía perderse tras sucesivos subcultivos o tras la congelación de los aislados. En Israel los porcentajes de resistencia a metronidazol fueron del 2% (CMI \geq 32 mg/L; el método de Etest), un porcentaje de resistencia similar al obtenido en Canadá durante el periodo 2004-2006 (CMI \geq 32 mg/L; Etest). Recientemente, se ha descrito hasta un 23,1% de resistencia en aislados toxigénicos aislados en 2008-2009 en China (CMI \geq 32 mg/L; Etest incubado 5 días). Al igual que ocurrió en el estudio español, los autores de los estudios canadiense y chino también comprobaron que sus cepas eran heterorresistentes a metronidazol. Por otra parte, se han descrito aislados con sensibilidad disminuida a vancomicina (CMI >2 mg/L) aunque con menor frecuencia que a metronidazol. Por último, fidaxomicina se ha mostrado muy activa frente a *C. difficile* con CMI menores de 1 mg/L en la mayoría de las cepas.

La concentración que metronidazol y su metabolito hidroximetronidazol alcanzan normalmente en la mucosa colónica varía dependiendo de la consistencia de las heces. Así, conforme la consistencia va siendo menos acuosa, la concentración de estos fármacos va disminuyendo hasta casi desaparecer (la concentración media es de 9,3 μ g/g en heces acuosas de pacientes en el comienzo del tratamiento y de 1,2 μ g/g en heces firmes de pacientes en tratamiento y en los que ha desaparecido la diarrea). Este hallazgo ha impulsado al EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) 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*) (Tabla 3). Por otra parte, los niveles de vancomicina y de fidaxomicina en el colon son muy elevados con concentraciones de 64-760 µg/g y 152-880 µg/g en los días postratamiento +2 y +3, respectivamente, para vancomicina y tan alta como 3.000 µg/g para fidaxomicina. Estas altas concentraciones alcanzadas por vancomicina y fidaxomicina han dado lugar a que se cuestione el significado clínico del hallazgo de cepas con CMI's altas a estos antimicrobianos pero inferiores a los niveles alcanzados en el colon.

Las principales guías internacionales no recomiendan realizar pruebas de sensibilidad rutinarias a todos los aislamientos clínicos de *C. difficile*. Sin embargo, sí que recomiendan la realización de estudios periódicos de vigilancia y seguimiento con el fin de conocer los patrones locales de sensibilidad a los fármacos de elección (especialmente metronidazol) y detectar posibles apariciones de resistencias a éstos. Estos estudios de sensibilidad se deberían realizar en el laboratorio de origen de los aislados si existiera personal preparado o, en su defecto, por un laboratorio de referencia. Las guías recomiendan utilizar un mínimo de 50-100 cepas de *C. difficile* aisladas, a poder ser, a lo largo de varios meses. El método de determinación de sensibilidad recomendado es el método de dilución en agar (consultar el Procedimiento en Microbiología Clínica nº 11 de la SEIMC: "Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos"). Tanto los métodos de difusión como el de la microdilución en caldo no están aprobados para realizar estudios de sensibilidad frente a *C. difficile*. Ciertos estudios han mostrado que el Épsilon test y el método del gradiente en espiral son métodos con un alto grado de correlación con el método de dilución en agar por lo que podrían ser alternativas en laboratorios donde existan dificultades técnicas para la realización de la técnica de referencia (dilución en agar) pero siempre utilizando

cepas control para asegurar la correcta realización de las pruebas. Varios estudios comparativos han mostrado que los sistemas de difusión antibiótica como la técnica de disco-placa (utilizando discos con 5 µg de metronidazol), el Épsilon test y el método del gradiente en espiral son capaces de detectar con mayor fiabilidad que la técnica de dilución en agar la heterorresistencia a metronidazol, sin embargo, como todavía no se ha demostrado una correlación entre ésta y el fracaso terapéutico en pacientes con ICD tratados con metronidazol, su detección en el laboratorio debería ser tratada con prudencia hasta que nuevos estudios aclaren su significado.

10. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *C. difficile*

10.1. IMPORTANCIA DE LA CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *C. difficile* TOXIGÉNICO

Los métodos de caracterización molecular son esenciales para realizar estudios epidemiológicos de la ICD como ocurre en otros microorganismos transmisibles. Su utilización permite sobre todo detectar brotes de la enfermedad, pero también reconocer la diseminación de cepas de alta virulencia o transmisibilidad, establecer las cadenas de transmisión del microorganismo y diferenciar si una recurrencia de la enfermedad es una recidiva causada por la misma cepa o si se debe a una reinfección con una cepa distinta.

10.2. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *C. difficile*

La importancia de los estudios de epidemiología molecular de *C. difficile* quedó patente en 2003, cuando en Norteamérica se registró un importante incremento

Tabla 3. Puntos de corte de los fármacos usados en clínica para el tratamiento de la infección por *C. difficile* según las guías del CLSI y del EUCAST.

Antimicrobiano	CLSI			EUCAST	
	Sensible	Intermedio	Resistente	Sensible	Resistente
Metronidazol	≤8 mg/L	16 mg/L	≥32 mg/L	≤2 mg/L	>2 mg/L
Vancomicina	ND	ND	ND	≤2 mg/L	>2 mg/L
Fidaxomicina	ND	ND	ND	EI	EI

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute. EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. ND: no datos. EI: evidencia insuficiente. Los datos disponibles de CMI muestran entre sí grandes variaciones.

del número de casos graves de ICD relacionados con la diseminación de una cepa perteneciente al pulsotipo NAP1 y al ribotipo 027. Posteriormente, este tipo de cepas se diseminaron a Europa (principalmente Reino Unido y Holanda) y actualmente producen importantes brotes de diarrea nosocomial en hospitales de todo el mundo. A partir de entonces, el interés por el estudio molecular de las cepas de *C. difficile* toxigénico aumentó, reconociéndose que para el control de la ICD es fundamental realizar estudios de epidemiología molecular.

En general, en los servicios de Microbiología Clínica no se llevan a cabo estudios de caracterización molecular de aislados de *C. difficile* de forma rutinaria y suelen estar limitados a centros de referencia regionales, nacionales o especializados en la investigación de este microorganismo. En este sentido, en Europa el programa “más activo” de vigilancia de *C. difficile* se encuentra en Leeds (Reino Unido), donde se ha creado un centro de referencia nacional (*Clostridium difficile* Ribotyping Network <https://www.gov.uk/government/collections/clostridium-difficile-ribotyping-network-cdrn-service>), al que se envían todos los aislados de *C. difficile* toxigénico para realizar ribotipado y métodos avanzados de subtipado que incluyen MLVA (*multilocus variable-number of tandem-repeat analysis*) y WGS (*Whole-Genome-sequencing*). Así mismo, el ECDC (*European Center for Disease Control*) ha promovido varios estudios de vigilancia de la enfermedad, incluyendo la caracterización molecular de los aislados. En España por el momento, no existe un registro de los casos, ni un centro de referencia a donde los servicios de Microbiología Clínica puedan enviar los aislados de *C. difficile* para su estudio y caracterización molecular.

La epidemiología molecular de la ICD varía mucho de unos países a otros. En el último estudio europeo realizado en 2013, se tiparon 1.211 aislados recogidos en 482 hospitales de 20 países y se comprobó que, aunque se detectaron 138 ribotipos diferentes, la expansión de las cepas del ribotipo 027 continuaba aumentando, de modo que su incidencia pasó del 5% (2008) al 18% (2013). Los otros ribotipos mayoritarios encontrados en estos estudios son el 001/072 y 014/020 como en estudios anteriores. Actualmente, aunque países como Reino Unido han documentado un descenso de la incidencia del ribotipo 027, se ha registrado un incremento en zonas donde eran otros los ribotipos predominantes (014/020, 078 y 001/072) como Alemania, Hungría, Rumanía y Polonia.

En España, los escasos estudios que incluyen una descripción de la epidemiología molecular de *C. diffi-*

cile demuestran que hasta 2014 el ribotipo 027 era muy poco prevalente (3,5% en 2013), siendo mayoritarios los ribotipos 014/020, 001/072 y 078/126. Sin embargo, actualmente en España se está registrando un aumento en la incidencia de aislados de *C. difficile* del ribotipo 027, detectados en gran medida gracias al empleo de métodos de diagnóstico molecular capaces de diferenciar este tipo de cepas el mismo día de la obtención de la muestra.

10.3. MÉTODOS HABITUALES DE TIPADO MOLECULAR DE *C. difficile*

Las distintas cepas de *C. difficile* son prácticamente indistinguibles por métodos fenotípicos, siendo necesarios estudios moleculares para su diferenciación y para establecer relaciones epidemiológicas entre ellas. Desde la descripción de *C. difficile* como patógeno relacionado con la entonces denominada diarrea asociada a antibióticos, se han empleado numerosos métodos moleculares para abordar su tipado molecular, que han ido evolucionando a lo largo de los años. En el presente procedimiento se revisan brevemente los que se han utilizado con más frecuencia en los últimos años.

Para que un método de tipado sea adecuado para abordar estudios de epidemiología molecular, idealmente debe cumplir una serie de condiciones como son: tener suficiente poder de discriminación, adecuada tipabilidad (capacidad inequívoca de caracterizar la mayoría de los aislados de una población), buena reproducibilidad y exportabilidad (capacidad para obtener los mismos resultados en diferentes laboratorios y en diferentes momentos). Además, es conveniente que los métodos de tipado molecular aporten ciertas características técnicas como rapidez, precio asequible y sencillez técnica en cuanto a su realización e interpretación, sobre todo cuando se quieren aplicar en laboratorios de Microbiología Clínica.

En principio, los métodos más usados para el tipado molecular de *C. difficile* se pueden clasificar en dos grupos, dependiendo de si se basan en el análisis de bandas (ribotipado, electroforesis en campo pulsado o PFGE y *multilocus variable number of tandem repeat analysis* o MLVA) o de secuencias (*multilocus sequence typing* o MLST y secuenciación de genoma completo o WGS -*whole genome sequencing*-). Por el momento, y en espera de que los métodos de WGS sean más asequibles, el método de tipado molecular más usado en Europa y Australia continúa siendo el ribotipado, mientras que en Norteamérica se ha utili-

zado tradicionalmente el tipado mediante análisis de los fragmentos de restricción (REA o *restriction endonuclease analysis*) y, sobre todo, la electroforesis en campo pulsado, aunque cada vez se utiliza más el ribotipado. Las principales características de los métodos utilizados actualmente para la caracterización molecular *C. difficile* se comparan en la tabla 4 y se resumen en los apartados siguientes.

10.3.1. PCR-ribotipado

La técnica de ribotipado se basa en la amplificación mediante PCR del espacio intergénico (ISR) existente entre los genes 16S y 23S que codifican para el ARN ribosómico. Estos genes son multicopia en *C. difficile* y su disposición, número y tamaño varía dentro del cromosoma de *C. difficile* entre unas cepas y otras, permitiendo así su diferenciación.

Para la amplificación por PCR de los diferentes ISR distribuidos por el cromosoma de las distintas cepas de *C. difficile*, se han empleado distintos tipos de iniciadores, todos ellos complementarios de los extremos 16S y 23S. Actualmente, los más utilizados son los descritos por Stubbs y cols. En este método, los distintos fragmentos obtenidos en la amplificación por PCR, se separan por electroforesis en geles de agarosa, obteniéndose un patrón de bandas. En cada patrón se considera el número de bandas y su posición,

siendo dos patrones diferentes si tienen más de una banda de diferencia o están distintas posiciones. El análisis de los patrones de bandas se puede realizar visualmente sólo cuando se analizan pocos aislados (figura 2). Lo recomendable es la construcción de dendrogramas de similitud, con programas informáticos de reconocimiento de imagen y análisis filogenético que permiten la comparación de numerosos aislados. El ribotipado es un método sencillo y no demasiado caro que tiene una adecuada reproducibilidad intralaboratorio, pero que tiene el gran inconveniente de tener poca reproducibilidad interlaboratorio incluso aunque se sigan protocolos estandarizados. Este inconveniente determina que, para correlacionar la nomenclatura de los ribotipos obtenidos en cada laboratorio con los ribotipos considerados internacionales (librería británica de ribotipos depositada en el centro de referencia de Leeds), se deban analizar en paralelo cepas de referencia de los principales ribotipos. Por el momento se han descrito más de 500 ribotipos de *C. difficile*, lo que dificulta la correlación de los ribotipos obtenidos en cada laboratorio con la nomenclatura internacional, que es numérica con 3 dígitos (por ejemplo ribotipo 001, 027, etc).

Como el principal inconveniente del ribotipado es su baja reproducibilidad entre laboratorios, en 2008 se modificó el método tradicional adaptándolo al análisis

Tabla 4. Características técnicas, tiempo y coste de los métodos más utilizados para el tipado molecular de *C. difficile*.

Métodos	Diana	Poder de discriminación	Tipabilidad	Facilidad de interpretación	Sencillez técnica	Reproducibilidad interlaboratorio	Coste por cepa
Basados en análisis de bandas							
REA	Cromosoma. Restricción <i>HindIII</i>	+++	+++	+	++	+	+
PFGE	Cromosoma. Restricción <i>SmaI</i>	++	++	++	+	++	++
PCR-Ribotipo	PCR16S-23S ARNr	+++	+++	++	++	+	+
MLVA	VNTR; 7-15 loci	++++					
Basados en análisis de secuencias							
MLST	Secuenciación de 7 genes <i>housekeeping</i> .	+++	+++	+++	++	++++	+++
WGS	Cromosoma, SNP's	++++	+++	+	+	+++	++++

+ Bajo, ++ Moderado, +++ Bueno, ++++ Excelente.

VNTR: *variable number of tandem repeats*; SNP's: *single nucleotide polymorphisms*. Adaptado de las referencias de Knetsch y cols y Huber y cols

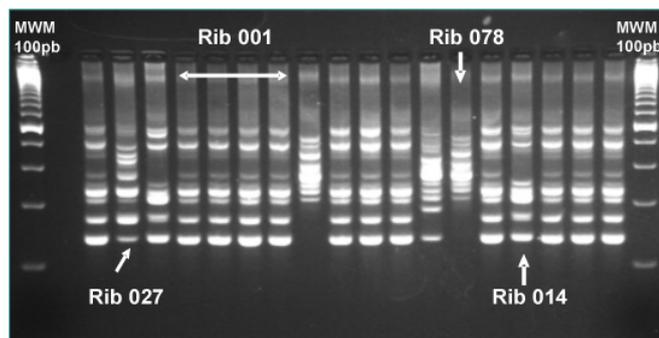


Figura 2. Gel de electroforesis de una PCR-ribotipado. Se muestran los perfiles de bandas obtenidos para algunos de los ribotipos más frecuentes en España (001, 014 y 078) junto con el ribotipo de referencia 027.

mediante electroforesis capilar. La metodología es muy similar al ribotipo tradicional, pero se usan iniciadores de PCR marcados con fluorescencia y en vez de geles de agarosa, los fragmentos obtenidos se resuelven en secuenciadores de ácidos nucleicos, lo que mejora su capacidad de discriminación, hace más objetiva la interpretación de los patrones de bandas obtenidos y permite el intercambio de datos entre laboratorios. En este sentido, se ha creado una página web que facilita la comparación de patrones entre laboratorios (<http://webribo.ages.at>). Sin embargo, comparado con el ribotipado tradicional esta técnica es más cara y depende de la disponibilidad de un secuenciador, además se ha visto que también tiene dificultades de estandarización entre laboratorios, con lo que la nomenclatura de los ribotipos continúa siendo un problema.

El ribotipado tiene un buen poder de discriminación comparado con otras técnicas, sin embargo no es óptimo y, cuando se requiere estudiar brotes o recurrencias causadas por cepas del mismo ribotipo, se debe asociar con un método de subtipado más discriminativo, como es el MLVA que se describe en apartados posteriores.

10.3.2. Electroforesis en campo pulsado (PFGE)

Se basa en la separación mediante electroforesis en campo pulsado (*pulsed field gel electrophoresis* o PFGE) de los fragmentos generados al digerir el cromosoma de *C. difficile* con el enzima de restricción *SmaI*, que es de corte poco frecuente. Se obtienen fragmentos de ADN de tamaño grande, que requieren para su separación realizar una electroforesis a altos voltajes y con cambio de orientación del campo eléctrico (pul-

so). Esta técnica se realiza en sistemas de electroforesis especiales, que permitan separar fragmentos de gran tamaño eficientemente, como el sistema CHEF (*contour clamped homogeneous electric field*). Es una técnica laboriosa, que requiere varios días para su realización y que, en el caso de *C. difficile*, plantea algunos problemas debido a la facilidad de degradación del ADN de este microorganismo y a la dificultad para lisar las esporas. Es una técnica algo menos discriminativa que el ribotipado y que presenta sus mismos inconvenientes para la transferencia de datos entre laboratorios, aunque también se empleen protocolos estandarizados de trabajo. Además, el sistema de electroforesis es más costoso que los empleados en el ribotipado lo que encarece algo la técnica, pero por otro lado, estos sistemas de PFGE se pueden usar para tipar bacterias de otros géneros.

El análisis de los patrones de bandas obtenidos por PFGE se realiza de forma similar a como se hace con el ribotipado. El PFGE fue uno de los primeros métodos aplicados al estudio de *C. difficile* y tradicionalmente ha sido la técnica más usada en Canadá y Estados Unidos y la recomendada por el CDC (<http://www.cdc.gov/pulsenet/>), que emplea la abreviatura NAP (*Northamerica pulsotype*) seguida de un número para denominar los distintos pulsotipos (NAP1 es la denominación del ribotipo 027). Actualmente para evitar la laboriosidad del PFGE y su menor capacidad de discriminación, numerosos trabajos publicados en Estados Unidos emplean ya el ribotipado asociado al MLVA.

10.3.3. Análisis de fragmentos de restricción (REA)

La técnica de REA (*restriction endonuclease analysis*) analiza mediante electroforesis en geles de agarosa, los fragmentos de ADN generados en la restricción del genoma completo de *C. difficile* con la endonucleasa de restricción de corte frecuente *HindIII*. Tras la restricción se generan multitud de fragmentos de muy diversos tamaños, que se separan mediante geles de electroforesis con lo que se obtienen patrones de numerosas bandas cuyo análisis es bastante complejo. Este método se ha empleado desde 1986 principalmente en Norteamérica. Tiene un buen poder de discriminación pero es difícil de analizar y poco intercambiable entre laboratorios. Actualmente está en desuso.

10.3.4. Variabilidad del número de repeticiones en tándem en múltiples locus (MLVA)

La técnica MLVA consiste en la amplificación mediante PCR de varias regiones de ADN (multilocus) en las que

hay secuencias cortas repetidas en tándem (denominadas microsátélites). El número de las repeticiones que hay en cada locus es variable en las distintas cepas de *C. difficile*. Estas regiones, se encuentran dispersas por todo el genoma de *C. difficile*. El método consiste en la amplificación de cada uno de los locus por PCR con iniciadores marcados con fluorescencia, que permiten posteriormente analizar el tamaño de los amplicones obtenidos mediante electroforesis capilar en secuenciador de ácidos nucleicos. El número de repeticiones que hay en cada locus se calcula por comparación del tamaño del fragmento obtenido para cada cepa, con el tamaño que tendría el fragmento con una repetición y considerando el número de pares de bases de cada repetición, para ello se emplean programas informáticos del tipo Gene Mapper® de Applied Biosystems o Bionumerics® de Applied Maths. El estudio también se puede hacer mediante la secuenciación de cada fragmento y contando el número de repeticiones, pero es más laborioso y caro. Para cada cepa se obtiene un patrón de 7 dígitos correspondientes a la suma de las repeticiones detectadas en cada locus.

El análisis de los patrones numéricos obtenidos se lleva a cabo mediante la construcción de un diagrama de similitud del tipo *minimum spanning tree* que mide la distancia genética entre aislados. Este diagrama se construye mediante programas de análisis filogenético, utilizando la diferencia entre las sumas de las repeticiones en tandem de todos los loci (*summed tandem repeats difference* o STRD) y el número de loci variantes. Normalmente, se considera que forman parte de un complejo clonal los aislados con STRD ≤ 2 y que están genéticamente relacionados los aislados que se diferencian entre $2 \leq \text{STRD} \leq 10$. En consecuencia, se consideran no relacionados genéticamente (diferentes) los aislados con STRD ≥ 10 .

El MLVA es una técnica rápida, que en general es muy discriminativa para todos los ribotipos y que proporciona resultados comparables al WGS. Hoy día se utiliza en la mayoría de los estudios epidemiológicos como método de subtipado asociado al ribotipo. Este método se emplea para investigar brotes causados por cepas del mismo ribotipo e identificar rutas de transmisión entre pacientes. Además, es una técnica que al realizarse en secuenciadores e interpretarse mediante perfiles numéricos, permite un análisis más reproducible y objetivo que los métodos basados en análisis de bandas. Otra de sus ventajas, es que establece relaciones filogenéticas entre aislados, lo que permite hacer un seguimiento de la evolución de las cepas de un ribotipo en un entorno determinado. Su principal inconveniente,

es la necesidad de disponer de secuenciadores automáticos, lo que encarece el procedimiento.

Se han descrito varios esquemas de MLVA, los más utilizados emplean 7 o 15 loci. El poder de discriminación aumenta al analizar un mayor número de loci, pero esto también incrementa los costes y dificulta la realización de la técnica. La técnica de 15 loci permite además inferir el ribotipo, con lo que no sería estrictamente necesaria su realización previa.

10.3.5. Tipado de secuencias de múltiples locus (MLST)

La técnica del MLST se basa en la amplificación y secuenciación de entre 300 y 500 pb de siete genes conservados en *C. difficile* (genes *housekeeping*). A cada variante de secuencia se le asigna un número y la combinación de los 7 números (cada uno correspondiente a la secuencia de un gen) da lugar a un perfil alélico al que se asigna una secuencia tipo o ST. La comparación de los ST de cada cepa se realiza de forma sencilla y objetiva a través de bases de datos públicas depositadas en Internet en las que actualmente hay descritos 295 ST's para *C. difficile* (<http://pubmlst.org/cdifficile/>, última actualización 13 de marzo de 2015).

El poder de discriminación del MLST es similar al del ribotipo pero, al contrario que éste, permite un análisis objetivo, más sencillo e intercambiable entre laboratorios. Además, muchos laboratorios de Microbiología Clínica están familiarizados con este tipo de análisis, ya que se emplean métodos similares para el tipado de numerosas especies bacterianas. Pero, por otro lado hay que tener en cuenta que es más costoso al tener que hacer 7 secuencias por cada cepa, lo que quizás determina que el ribotipo siga siendo el método de tipado más usado en los laboratorios europeos.

Otra de las ventajas del MLST con respecto a otros métodos, es que permite establecer relaciones evolutivas entre distintas cepas, lo que ha permitido estudiar la filogenia de *C. difficile*, que parece haber evolucionado en 6 linajes diferentes (clades), siendo el linaje 1 el que agrupa a la mayoría de los ST's descritos.

10.4. OTROS MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *C. difficile*

10.4.1. Toxinotipado

El toxinotipado es un método de caracterización molecular que estudia las variaciones de la estructura del

locus de patogenicidad de *C. difficile* (PaLoc) en el que se encuentran los genes que codifican para la toxina A (*tcdA*), la toxina B (*tcdB*) y diversos genes reguladores. Para ello se realiza el análisis de los fragmentos de restricción de 10 regiones del PaLoc amplificadas por PCR. Por el momento, se han descrito 32 toxinotipos que se designan desde el 0 al XXXII (<http://www.mf.uni-mb.si/mikro/tox>). El toxinotipado permite reconocer cepas con distintas alteraciones en la secuencias de los genes que codifican para las toxinas (excepto para la toxina binaria cuyos genes codificantes se encuentran fuera del PaLoc). Dentro de cada toxinotipo se incluyen numerosos ribotipos diferentes. Su importancia actual, quizás radica en detectar cepas variantes como las A-B+ o aquellas que presentan alguna alteración en la secuencia de los genes de las toxinas que actúan como diana de los métodos moleculares de diagnóstico de *C. difficile* toxigénico en heces.

10.4.2. Secuenciación del genoma completo (WGS)

La técnica WGS es una metodología novedosa de caracterización molecular de microorganismos, que se ha empleado con éxito en estudios de epidemiología molecular de *C. difficile*, en los que ha demostrado un alto poder de discriminación y también que las técnicas convencionales tienen limitaciones para establecer las cadenas de transmisión de forma correcta.

En la WGS se realiza la “lectura” de todo el genoma de *C. difficile* y permite, entre otras muchas utilidades, estudiar diferencias a nivel de un sólo nucleótido (SNP's o *single nucleotide polymorphisms*) en las secuencias de cepas diferentes, mejorando mucho el poder de discriminación. Con la WGS se pueden establecer las cadenas epidemiológicas de transmisión con gran precisión y además se pueden definir linajes epidemiológicos, deducir el perfil de MLST e incluso distinguir entre cepas diferentes por el “simple” cambio de un nucleótido. Sin embargo, en lo referente al tipado de *C. difficile*, queda por establecer cuantos SNP's de diferencia tiene que haber para considerar si dos cepas están genéticamente relacionadas o no. En la actualidad, está aumentando su uso, gracias al desarrollo de analizadores más asequibles en coste y manejo y sobre todo, por la necesidad de resolver algunas de las limitaciones que presentan las otras técnicas de tipado molecular. Sin embargo, por ahora su elevado coste y la complejidad del análisis bioinformático que requiere, hacen que su uso esté restringido a centros de investigación o laboratorios de referencia nacionales o supranacionales.

10.5. REQUERIMIENTOS DE LOS AISLADOS EN LOS ESTUDIOS DE TIPADO MOLECULAR DE *C. difficile*

En principio, para realizar el tipado molecular de *C. difficile*, se deben seguir las mismas normas de calidad que para el tipado de otras bacterias como ya ha sido descrito en el Procedimiento en Microbiología nº 18 de la SEIMC.

En general, el tipado molecular *C. difficile* se debe realizar con aislados toxigénicos que estén en cultivo puro. Idealmente, se debe trabajar con cultivos recientes y se debe evitar realizar muchos subcultivos de la cepa que se quiere estudiar. Si existen colonias con varias morfologías se deben separar hasta obtener cultivos puros y se deben estudiar por separado para detectar posibles infecciones policlonales. El medio de cultivo en el que se reciben los aislados no es determinante, pero por todo lo anterior son preferibles los medios sólidos, que se deben mantener refrigerados hasta la extracción del ADN cromosómico.

La extracción de ADN se debe realizar lo antes posible y para ello se pueden utilizar distintos métodos: hervido, resinas de extracción tipo Chelex, purificación con columnas, extracción automatizada, etc. Si se desea conservar el ADN extraído porque no se va a realizar el análisis molecular de forma inmediata, es conveniente la purificación con columnas (tipo Quiagen o similar) o el empleo de extractores automáticos, que permiten obtener ADN más puro y más resistente a la degradación. En el caso de la PFGE o WGS se deben emplear metodologías específicas que se pueden consultar en la bibliografía recomendada.

La conservación del ADN extraído se puede hacer a 4°C si se va a usar en poco tiempo. Cuando los estudios moleculares se van a retrasar, es conveniente congelar el ADN a -20°C o -70°C, siendo muy importante que no se someta a ciclos de congelación y descongelación.

El método molecular de tipado a elegir dependerá sobre todo del número de cepas a analizar y el material de laboratorio disponible (secuenciador principalmente) y de nivel de discriminación requerido. Si se quiere hacer un análisis descriptivo de la epidemiología local de *C. difficile* y no se dispone de secuenciador de ácidos nucleicos quizás el ribotipo es la técnica de elección. Si se dispone de secuenciador se puede emplear el ribotipo o MLST. En este caso, si se estudian un número elevado de aislados, hay que tener en cuenta

los costes del MLST. Cuando el estudio molecular se realiza para caracterizar un brote, es conveniente asociar una técnica de alta discriminación como MLVA. Disponer de secuenciadores de genoma completo y de financiación suficiente, es la situación ideal que permitiría abordar los estudios completos de epidemiología molecular, además de estudiar por ejemplo factores de virulencia, mutaciones asociadas a alta transmisibilidad, etc.

Los métodos de tipado basados en PCR (que son la mayoría) se deben realizar en laboratorios dotados de 3 áreas diferenciadas de trabajo, para así evitar contaminaciones cruzadas. Estos métodos requieren seguir normas de calidad adecuadas al trabajo en laboratorios de PCR (consultar el PNT-CD-4 de PCR-ribotipado incluido en este procedimiento).

Para la realización de cada técnica concreta lo mejor es consultar el artículo que la describe y adaptar la metodología a las condiciones de cada laboratorio, ya que las posibles variaciones debidas a los distintos termocicladores, cubetas de electroforesis, agentes intercalantes, etc. afectan en gran medida a los resultados obtenidos.

11. INFORMACIÓN DE RESULTADOS

La información de los resultados obtenidos en el laboratorio al personal sanitario responsable del paciente y al preventivista constituye uno de los pasos más críticos para optimizar el tratamiento y el control de la transmisión. El *Center for Disease Control* (CDC) recomienda poner los medios necesarios para asegurar que haya una rápida transmisión de los resultados obtenidos con el diagnóstico de laboratorio de la ICD incluidos los fines de semana y días festivos. La rápida información de un resultado positivo en el laboratorio es fundamental para conseguir un adecuado tratamiento del episodio de ICD y para poner en marcha las medidas de aislamiento necesarias para evitar la transmisión de la infección a otro paciente, además, puede evitar que el paciente quede expuesto a fármacos innecesarios como agentes antiperistálticos o narcóticos que pueden complicar el episodio de ICD. Por otra parte, una rápida información de un resultado negativo puede evitar tratamientos empíricos y facilitar la identificación de la verdadera causa de los síntomas.

Se recomienda que, cuando el laboratorio realice únicamente un procedimiento rápido de diagnóstico de la

ICD, informe inmediatamente los resultados positivos y negativos tanto telefónicamente como mediante la emisión de un informe de resultados. Cuando el procedimiento diagnóstico del laboratorio se componga de varias técnicas con distintos tiempos de emisión de resultados, por ejemplo, un algoritmo rápido y un cultivo toxigénico, se recomienda informar rápidamente la técnica más precoz tanto telefónicamente como mediante emisión de un informe de resultados mientras que se recomienda informar los subsiguientes procedimientos solamente mediante informe de resultados salvo cuando se obtengan resultados discordantes en cuyo caso habría que informarlos también telefónicamente.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Alcalá L, Reigadas E, Marín M, Martín A, Catalán P, Bouza E, on behalf of the Spanish *Clostridium difficile* Study Group. Impact of clinical awareness and diagnostic tests on the underdiagnosis of *Clostridium difficile* infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015 Apr; 34(4):DOI: 10.1007/s10096-015-2380-3.
2. Alcalá L, Reigadas E, Marín M, Catalán P, Bouza E. Diagnóstico de la infección por *Clostridium difficile* por Genexpert a bajo coste. XIX Congreso Nacional SEIMC. Sevilla 2015; abstract nº 543.
3. Bouza E, Marín M, Peláez T, Alcalá L, on behalf of the group for *Clostridium difficile* Infection of the Spanish Society for Chemotherapy. The situation and management of *Clostridium difficile* infection in Spain: an opinion document. *Rev Esp Quimioter*. 2013; 26:261-286.
4. Bumham CD, Carroll KC. Diagnosis of *C. difficile* infection: an ongoing conundrum for clinicians. *Clin Microbiol Rev*. 2013; 26:604-630.
5. Cantón R, García-Sánchez JE, Gómez-Lus ML, Martínez-Martínez L, Rodríguez-Avial C, Vila J. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. 11. García-Rodríguez JA (coordinador). Procedimientos en Microbiología Clínica. Picazo JJ (editor). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2000.
6. Carroll KC. Tests for diagnosis of *Clostridium difficile* infection: the next generation. *Anaerobe*. 2011;17:170-174.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-third Informational Supplement. CLSI document M100-S23. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013.
8. Cohen SH, Gerding DN, Johnson S, Kelly CP, Loo VG, McDonald LC, et al. 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;31:431-455.
9. Coll P, Coque MT, Domínguez MA, Vázquez J, Vila J. Métodos moleculares de tipificación epidemiológica en bacteriología. Número 18. Domínguez MA (coordinadora). *Procedimientos en Microbiología Clínica*. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2005.
 10. Crobach EM, J. T, Dekkers OM, Wilcox MH, Kuijper EJ. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): Data review and recommendations for diagnosing *Clostridium difficile*-infection (CDI). *Clin Microbiol Infect.* 2009;15:1053-1066.
 11. Eyre DW, Cule ML, Wilson DJ, Griffiths D, Vaughan A, O'Connor L, et al. Diverse sources of *C. difficile* infection identified on whole-genome sequencing. *N Engl J Med.* 2013;369:1195-1205.
 12. Fang FC, Wilcox MH, Planche T. What is the current role of algorithmic approaches for diagnosis of *Clostridium difficile* infection? *J Clin Microbiol.* 2010;48:4347-4353.
 13. Griffiths D, Fawley W, Kachrimanidou M, Bowden R, Crook DW, Fung R, et al. Multilocus sequence typing of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol.* 2010;48:770-778.
 14. Hall IC, O'Toole E. Intestinal flora in new-born infants: with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. *Am J Dis Child.* 1935;49:390-402.
 15. Huber CA, Foster NF, Riley TV, Paterson DL. Challenges for standardization of *Clostridium difficile* typing methods. *J Clin Microbiol.* 2013;51:2810-2814.
 16. Killgore G, Thompson A, Johnson S, Brazier J, Kuijper E, Pepin J, et al. Comparison of seven techniques for typing international epidemic strains of *Clostridium difficile*: restriction endonuclease analysis, pulsed-field gel electrophoresis, PCR-ribotyping, multilocus sequence typing, multilocus variable-number tandem-repeat analysis, amplified fragment length polymorphism, and surface layer protein A gene sequence typing. *J Clin Microbiol.* 2008;46:431-437.
 17. Knetsch CW, Lawley TD, Hensgens MP, Corver J, Wilcox MW, Kuijper EJ. Current application and future perspectives of molecular typing methods to study *Clostridium difficile* infections. *Euro Surveill.* 2013;18:20381.
 18. Lewis SJ, Heaton KW. Stool form scale as a useful guide to intestinal transit time. *Scand. J. Gastroenterol.* 1997;32:920-924.
 19. Mattila E, Arkkila P, Mattila PS, Tarkka E, Tissari P, Anttila VJ. Extraintestinal *Clostridium difficile* infections. *Clin Infect Dis.* 2013; 57:e148-53.
 20. O'Horo JC, Jones A, Stemke M, Harper C, Safdar N. Molecular techniques for diagnosis of *Clostridium difficile* infection: Systematic review and meta-analysis. *Mayo Clin Proc.* 2012; 87:643-651.
 21. Persson S, de Boer RF, Kooistra-Smid A, Olsen K. Five commercial DNA extraction systems tested and compared on a stool sample collection. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011; 69:240-244.
 22. Planche T, Davies KA, Coen PG, Finney JM, Monahan IM, Morris KA, et al. Differences in outcome according to *Clostridium difficile* testing method: a prospective multicentre diagnostic validation study of *C. difficile* infection. *Lancet Infect Dis.* 2013; 13:936-945.
 23. Shetty N, Wren MDW, Coen PG. The role of glutamate dehydrogenase for the detection of *Clostridium difficile* in faecal samples: a meta-analysis. *J Hosp Infect.* 2011;77:1-6.
 24. Stubbs SL, Brazier JS, O'Neill GL, Duerden BI. PCR targeted to the 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region of *Clostridium difficile* and construction of a library consisting of 116 different PCR ribotypes. *J Clin Microbiol.* 1999;37:461-463.
 25. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Beakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 5. 0, 2015. <http://www.eucast.org>.
 26. Tenover FC, Baron EJ, Peterson LR, Persing DH. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infection. Can molecular amplification methods move us out of uncertainty? *J Molec Diagn.* 2011; 13:573-582.
 27. van den Berg RJ, Schaap I, Templeton KE, Klaassen CH, Kuijper EJ. Typing and subtyping of *Clostridium difficile* isolates by using multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis. *J Clin Microbiol.* 2007;45:1024-1028.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección en las heces de la toxina B de <i>Clostridium difficile</i> sobre cultivo celular	PNT-CD-01	
		Edición N° 01	Página 1 de 6

PNT-CD-01

Detección en las heces de la toxina B de *Clostridium difficile* sobre cultivo celular

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre / Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA N° ASIGNADA A

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro.....
La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección en las heces de la toxina B de <i>Clostridium difficile</i> sobre cultivo celular	PNT-CD-01	
		Edición N° 01	Página 2 de 6

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo del presente documento es describir el procesamiento en las muestras fecales para detectar la presencia de la citotoxina B de *C. difficile* en los pacientes con diarrea. También se aplica a la confirmación de la toxigenicidad de las cepas aisladas en cultivo anaerobio.

2. FUNDAMENTO

Clostridium difficile es el patógeno entérico más frecuentemente implicado en la diarrea intrahospitalaria. En la patogenia de la infección por *C. difficile* (ICD) intervienen generalmente dos factores clave, el ser portador de una cepa productora de toxinas B y/o A (no todas son capaces) y estar recibiendo antibióticos que modifican la microbiota intestinal y permiten el crecimiento de *C. difficile*. Es posible el estado de portador de una cepa productora de toxinas sin que se desarrollen los síntomas asociados a la ICD. Los niños son portadores con frecuencia en sus primeros años de vida, y hasta un 10-20% de los pacientes hospitalizados son portadores de una cepa toxigénica, lo que les convierte en pacientes de riesgo para la ICD. Por lo tanto, la principal indicación de la investigación de *C. difficile* y sus toxinas se aplica a los pacientes con diarrea adquirida en el hospital o relacionada con el medio socio-sanitario, particularmente los que estén sometidos a tratamiento antibiótico.

La detección de toxina B en cultivo celular con neutralización de la misma con la antitoxina específica, ha sido tradicionalmente la técnica de referencia para las diversas técnicas, más rápidas, para la detección de las toxinas de *C. difficile*. Sin embargo, su relativa baja sensibilidad la ha relegado a un segundo plano a favor del cultivo toxigénico, mucho más sensible y con la misma especificidad. En el presente documento se describe el método a seguir para detectar la presencia de la citotoxina B de *C. difficile* sobre cultivo celular en los pacientes con diarrea.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

1. García LS. "Quality Control". En: Clinical Microbiology Procedures Handbook, 3th edition, vol.3. Section 14.2. Washington DC: ASM Press; 2010.
2. Alcalá L, Betriu C, García Sánchez JE, Reig M. Bacterias anaerobias. 16. García Sánchez JE (coordinador). Procedimientos en Microbiología clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2004. Disponible en <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>.
3. Alados Arboledas JC, Gómez García de la Pedrosa E, Leiva León J, Pérez Sáenz JL, Rojo Molinero E. Seguridad en el laboratorio de Microbiología Clínica. 10a. Pérez Sáenz JL (coordinador). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2014. <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>
4. Guerrero Gómez C, Sánchez Carrillo C. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de Microbiología. 1a. Sánchez Carrillo C (coordinador). Procedimientos en Microbiología clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2003. <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>

4. MUESTRAS

4.1. VOLANTE DE PETICIÓN

El volante de petición o la petición electrónica que acompaña a cada muestra se deben cumplimentar correctamente y en él deberán constar claramente:

- Datos demográficos del paciente (filiación, edad, número de historia), servicio de procedencia y datos del clínico que realiza la petición.
- Datos de la muestra y determinaciones microbiológicas solicitadas.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección en las heces de la toxina B de <i>Clostridium difficile</i> sobre cultivo celular	PNT-CD-01	
		Edición N° 01	Página 3 de 6

- Datos clínicos (diagnóstico del paciente, enfermedad de base, tratamiento antibiótico previo, alergias medicamentosas).

4.2. RECOGIDA, TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

Se recogerán las deposiciones diarreicas en un frasco estéril, sin conservantes, de boca ancha en un mínimo de 2 ml. Para esta técnica no son útiles los escobillados rectales.

El transporte se realizará de forma inmediata tras la obtención de la muestra a temperatura ambiente. La toxina es inestable y su detección disminuye si el tiempo de transporte es superior a las cuatro horas.

Deben procesarse a su llegada al laboratorio y, en caso de que esto no sea posible, refrigerarse a 2-8°C (hasta 72 h) o congelarse.

Una vez procesadas, conviene conservarlas durante al menos 3-5 días.

4.3. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO

La técnica se aplica sobre muestras de heces diarreicas o, a lo sumo, de consistencia pastosa. No son admisibles las muestras de heces formes. En la vertiente de confirmación de la toxigenicidad de las cepas aisladas en cultivo, se aplica sólo si han sido identificadas previamente como *C. difficile*.

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

5.1. MEDIOS DE CULTIVO

Viales de fondo plano con monocapa de células MRC-5. Alternativamente, puede emplearse cualquier otro tipo de substrato celular (células Vero, CHO HEp2, HeLa, McCoy, riñón de mono, etc.) y en cualquier otro formato (tubos, placas de pocillos múltiples, etc.)

5.2. REACTIVOS Y PRODUCTOS

Tampón fosfato salino PBS (pH 7,2±0,2), de procedencia comercial o preparado en el propio laboratorio, tanto estéril como no estéril.

Suero antitoxina de *C. difficile* (*C. difficile* Toxin Detection Kit, TechLab). La antitoxina viene liofilizada, en viales. Se reconstituye asépticamente con agua destilada estéril, de acuerdo con las especificaciones del fabricante (solución madre), y se reparte en alícuotas de 25 µl que se mantienen congeladas a -20 °C.

6. APARATOS Y MATERIAL

- Filtros de 0,45 µm.
- Puntas de pipeta estériles con capacidad para 100-200 µl.
- Jeringas estériles con capacidad de 2-5 ml.
- Tubos de plástico estériles de 5 ml.
- Cabina de extracción de humos o cabina de flujo laminar. No es imprescindible cabina de seguridad biológica.
- Pipeta para puntas de 100-200 µl
- Agitador mecánico
- Centrífuga para tubos con capacidad mínima para 2000 xg
- Microscopio invertido para lectura de cultivos celulares.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección en las heces de la toxina B de <i>Clostridium difficile</i> sobre cultivo celular	PNT-CD-01	
		Edición N° 01	Página 4 de 6

7. PROCEDIMIENTO

7.1. EXTRACCIÓN DE LA TOXINA E INOCULACIÓN DE LOS CULTIVOS CELULARES

En un tubo de plástico estéril y rotulado con el número de laboratorio, realizar una suspensión 1:2 de la muestra de heces, utilizando un volumen igual de PBS (1 ml de muestra + 1 ml de PBS, no es necesario que éste sea estéril). Homogeneizar la suspensión lo mejor posible con un agitador mecánico.

Si la muestra de partida es una cepa de *C. difficile* se recomienda unos 2 ml de un caldo de cultivo tras 24 h de incubación en anaerobiosis.

Centrifugar, al menos, a 2000 xg durante 15 min.

Aspirar el sobrenadante con una jeringa de 2 ml y filtrarlo a través de un filtro de 0,45 µm. A partir de este momento se opera en condiciones de esterilidad.

Recoger el extracto en un tubo estéril de plástico (dilución 1/2).

Rotular cada uno de los viales con la monocapa crecida de células MRC-5 (Vero, u otra línea celular) con el número de laboratorio correspondiente y fecha de inoculación. Previamente habremos comprobado el estado de la monocapa.

Inocular 0,2 ml del extracto en estos viales de 2 ml, sin retirar el medio de cultivo celular. La dilución final tras la dilución ½ de la muestra en PBS y 1/10 del extracto en el medio de cultivo celular es de 1/20 aproximadamente.

Guardar en un congelador a -20 °C los tubos con los extractos, por si fuera pertinente realizar el ensayo de neutralización.

7.2. CONDICIONES DE INCUBACIÓN

Incubar los viales en una estufa a 37±2°C durante 24-48 horas.

7.3. LECTURA DE CULTIVOS

7.3.1. Lectura del cultivo celular

Proceder a la lectura de la monocapa de los viales en el microscopio invertido, a las 24 y 48 horas de su inoculación en busca del efecto citopático característico (abalonamiento de las células, ver ANEXO), que deberá abarcar, al menos, el 50% de la monocapa.

7.3.2. Neutralización de las muestras con efecto citopático

Descongelar una alícuota de solución madre de antitoxina. Diluir dicha antitoxina al 1:25 utilizando PBS estéril (mezclar 600 µl de PBS con los 25 µl de antitoxina, homogeneizando bien). Esta será la solución de trabajo.

Descongelar el extracto a probar.

Mezclar, en un tubo estéril, volúmenes iguales del extracto de la muestra descongelado y de la solución de trabajo de antitoxina (0,2 ml del extracto + 0,2 ml de solución de trabajo de antitoxina).

Homogeneizar dicha mezcla e incubarla 15-30 min a temperatura ambiente.

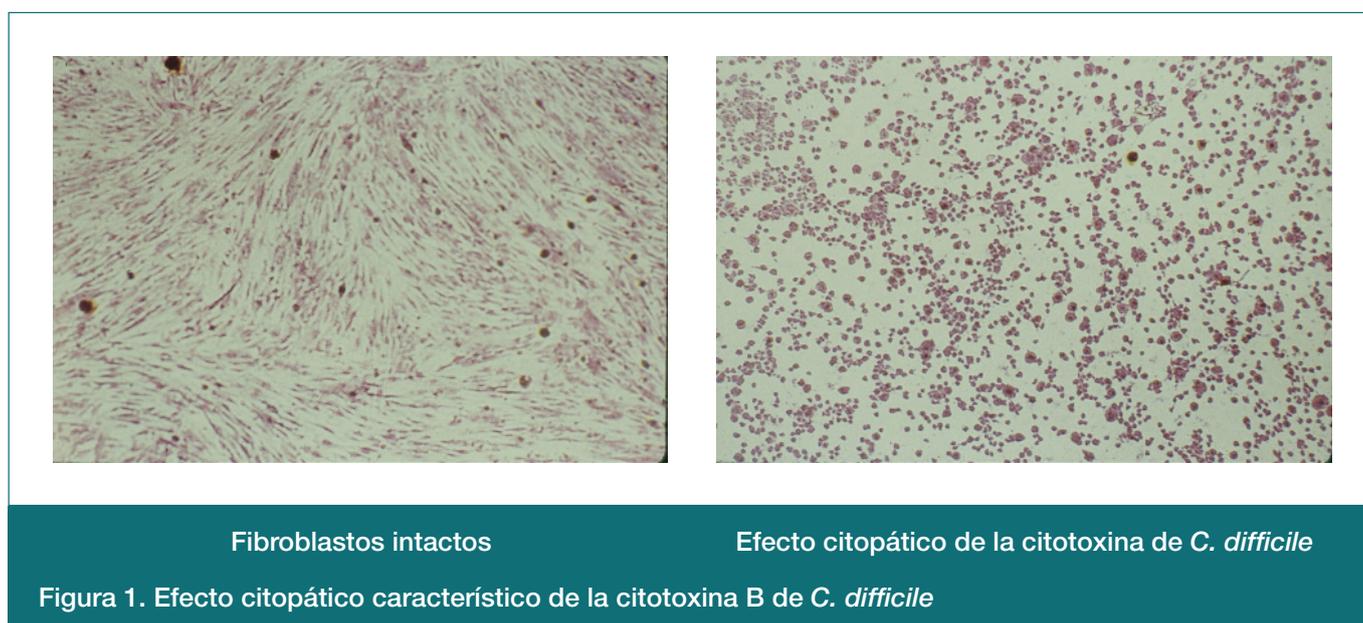
Inocular 0,2 ml de la mezcla neutralizada por cada ml de medio de un vial con cultivo celular. Rotular adecuadamente cada vial con el número de laboratorio, la fecha y la mezcla inoculada (con o sin antitoxina)

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección en las heces de la toxina B de <i>Clostridium difficile</i> sobre cultivo celular	PNT-CD-01	
		Edición N° 01	Página 5 de 6

Incubar los viales en una estufa a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24-48 horas.

Proceder a la lectura conjunta de los dos viales a las 24 y 48 horas de su inoculación en busca del efecto citopático característico.

Los extractos con toxina B de *C. difficile* se neutralizarán por efecto de la antitoxina de forma que la monocapa no mostrará el efecto citopático. Los extractos con toxicidad por otras causas no se neutralizan y por tanto muestran toxicidad. Las cepas de *C. difficile* productoras de toxina mostrarán el efecto citopático en el vial sin neutralizar y no mostrarán ningún efecto en el vial neutralizado. Las cepas no toxigénicas no producen efecto citopático en ninguno de los dos viales (neutralizado y sin neutralizar). Ver figura 1.



7.4. CONTROL DE CALIDAD

Verificar la caducidad de los medios y los estándares de calidad de los medios de cultivo preparados en el laboratorio (control de esterilidad y eficiencia en cada nuevo lote de células preparado).

Se considera que las células son altamente sensibles a la citotoxina. Evaluar los lotes de substratos celulares mediante una cepa (*C. difficile* ATCC 9689) o una cepa clínica productora de toxina, haciéndola crecer en anaerobiosis y probándola como ya se ha descrito.

Cada lote de antitoxina será evaluado previamente con una cepa productora de toxina B, sea de procedencia clínica o de una colección de cultivos tipo (*C. difficile* ATCC 9689). La antitoxina congelada mantiene su actividad durante años, pero debe controlarse, al menos, una vez anualmente.

Registrar los resultados de los controles realizados. Si no son adecuados, adoptar medidas correctoras.

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Si el efecto citopático es negativo en el vial inoculado, se informará como: NEGATIVO.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección en las heces de la toxina B de <i>Clostridium difficile</i> sobre cultivo celular	PNT-CD-01	
		Edición N° 01	Página 6 de 6

Si, tras el ensayo de neutralización, el efecto citopático es positivo en el vial sin neutralizar y negativo en el vial neutralizado con la antitoxina específica de *C. difficile*, se informará como: POSITIVO para la toxina B de *C. difficile*.

Cuando el efecto citopático es positivo tanto en el vial sin neutralizar y como en el vial neutralizado, se informará como: INDETERMINADO (muestra tóxica).

Las cepas de *C. difficile* productoras de toxina mostrarán el efecto citopático en el vial sin neutralizar y no mostrarán efecto en el vial neutralizado. Se informará como: *C. difficile* productor de toxina.

Las cepas no toxigénicas no producen efecto citopático en ninguno de los dos casos (neutralizado y sin neutralizar). Se informará como: *C. difficile* no productor de toxina.

9. RESPONSABILIDADES

El proceso de recogida de la muestra es responsabilidad del servicio solicitante. La información sobre las normas de recogida, transporte y conservación de las muestras y su distribución a los servicios solicitantes es responsabilidad del laboratorio de Microbiología.

El facultativo encargado del área de recepción y procesamiento de muestras del laboratorio es responsable de la supervisión de la recepción, identificación y procesamiento de las muestras, así como del rechazo de las muestras remitidas en condiciones defectuosas (medios de transporte inadecuados, derramadas) y adopción de medidas correctoras.

El personal técnico es responsable de los procedimientos microbiológicos, así como también del registro de resultados.

El personal facultativo es responsable de la valoración de la lectura de los cultivos, así como de la supervisión del trabajo del personal técnico, comunicación de los resultados preliminares, validación de los resultados preliminares y definitivos y firma de los informes. También es responsable de mantener al día los procedimientos y responder a las interconsultas.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

El criterio de rechazo de las muestras formes debe cumplirse de forma estricta excepto en el caso en que se sospeche íleo paralítico o megacolon tóxico.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

La demora superior a 4 horas en el transporte de las muestras disminuye la detección de la toxina.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Bouza E, Marín M, Peláez T, Alcalá L, on behalf of the group for *Clostridium difficile* Infection of the Spanish Society for Chemotherapy. The situation and management of *Clostridium difficile* infection in Spain: an opinion document. Rev Esp Quimioter. 2013; 26:261-286.
2. Brazier JS. The diagnosis of *Clostridium difficile*-associated disease. J Antimicrob Chemother 1998; 41 (Suppl. C):29-40.
3. Cohen SH, Gerding DN, Johnson S, Kelly CP, Loo VG, McDonald LC, Pepin J, Wilcox MH. 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 and Hosp Epidemiol 2010; 31:431-455.
4. Freeman J, Wilcox MH. The effects of storage conditions on viability of *Clostridium difficile* vegetative cells and spores and toxin activity in human faeces. J Clin Pathol 2003; 56:126-128.

Servicio / Unidad de Microbiología	Cultivo toxigénico	PNT-CD-2	
Hospital.....		Edición N° 01	Página 2 de 7

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo de este documento es describir el procedimiento para realizar el cultivo toxigénico para la detección y aislamiento de *Clostridium difficile* productor de toxinas a partir de muestras de heces. Este procedimiento es aplicable a todos los laboratorios de Microbiología clínica que cuenten con los medios y experiencia adecuados para el manejo de este microorganismo y que, o bien incluyan esta técnica en el algoritmo para la detección de este patógeno, o realicen técnicas de tipado molecular o sensibilidad antibiótica.

2. FUNDAMENTO

El diagnóstico de la infección por *C. difficile* toxigénico (ICD) debe realizarse lo antes posible desde su sospecha clínica, por ello, en muchos casos, se utilizan técnicas rápidas pero poco sensibles para la detección directa en heces de este microorganismo. Por este motivo se recomienda realizar un algoritmo diagnóstico que incluya, además de estas técnicas rápidas, una técnica con mayor sensibilidad, como puede ser el cultivo toxigénico, ya que se trata de una técnica muy sensible. El cultivo, además, permite el aislamiento de las cepas de *C. difficile* para realizar posteriores pruebas de sensibilidad antibiótica o tipado molecular. Actualmente el cultivo toxigénico es considerada por muchos expertos como la técnica de referencia para la detección de *C. difficile*.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

1. Alados Arboledas JC, Gómez García de la Pedrosa E, Leiva León J, Pérez Sáenz JL, Rojo Molinero E. Seguridad en el laboratorio de Microbiología Clínica. 10a. Pérez Sáenz JL (coordinador). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2014. Disponible en <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>.
2. Alonso C, Bartolomé R, Domínguez J, Matas L, Rabella N. Técnicas rápidas de detección de antígeno. 19. Domínguez J (coordinador). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2005. Disponible en <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>.
3. Guerrero Gómez C, Sánchez Carrillo C. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de Microbiología. 1a. Sánchez Carrillo C (coordinador). Procedimientos en Microbiología clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2003. Disponible en <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>.
4. Alcalá L, Betriu C, García Sánchez JE, Reig M. Bacterias anaerobias. 16. García Sánchez JE (coordinador). Procedimientos en Microbiología clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2004. Disponible en <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>.

4. MUESTRAS

4.1. VOLANTE DE PETICIÓN

El volante de petición o la petición electrónica que acompaña a cada muestra deben estar correctamente cumplimentados y en ellos deberán constar con claridad:

- Los datos demográficos del paciente (filiación, edad y número de historia), servicio de procedencia y datos del clínico peticionario.
- Los datos de la muestra (tipo, fecha y hora de obtención) y determinaciones microbiológicas solicitadas.
- Los datos clínicos (diagnóstico del paciente, enfermedad de base, tratamiento antibiótico previo).

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Cultivo toxigénico	PNT-CD-2	
		Edición N° 01	Página 3 de 7

4.2. RECOGIDA Y TRANSPORTE DE LA MUESTRA

Se debe recoger una muestra de heces no formes preferiblemente en un recipiente estéril, de cierre hermético y sin medio de transporte. También puede recogerse en recipientes con medios de transporte para enteropatógenos aerobios como el medio de Cary-Blair.

En pacientes con íleo paralítico o megacolon tóxico se recomienda recoger dos exudados rectales con torundas de algodón preferiblemente una sin medio de transporte (para la detección rápida de la ICD) y otra con medio de transporte (para el cultivo toxigénico).

Se recomienda recoger las biopsias de colon en un tubo estéril con 1 ml de suero fisiológico.

Cuando el transporte de la muestra se realice en menos de 1 hora no es necesario refrigerar la muestra. Si se prevé que el transporte se realice en un periodo estimado de 1-72 horas se recomienda refrigerar la muestra a 2-8°C mientras que si se prevé que el periodo sea superior se recomienda congelar la muestra a una temperatura de -20°C.

4.3. CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

Las muestras deben refrigerarse a 2-8°C cuando el tiempo de conservación previsto sea inferior a 72 horas mientras que deben congelarse a -60/-80°C para tiempos de conservación superiores.

4.4. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO

Se recomienda procesar para diagnóstico de la ICD las muestras procedentes de pacientes con diarrea independientemente de su edad (salvo menores de 2 años), su origen (hospitalizado o comunitario) o la petición microbiológica del clínico demandante. Las únicas excepciones serían aquellas muestras de heces transportadas en medios esporicidas como algunos medios de transporte para parásitos que contienen formaldehído. Sólo se aceptarán muestras de heces no formes, definidas como aquellas que adoptan la forma del recipiente en el que están (Bristol 5-7). Solamente se aceptarán heces sólidas en aquellos pacientes con íleo paralítico, megacolon tóxico o cualquier colitis que curse sin diarrea (en muchos de estos casos no será posible tampoco la obtención de muestra de heces sólidas por lo que habrá que obtener exudados rectales mediante torunda). Se recomienda recoger una sola muestra de heces durante el curso de un mismo episodio de ICD pudiendo establecer un periodo de 7-10 días para poder solicitar una nueva determinación. Por tanto, en un contexto no epidémico, deben rechazarse aquellas muestras que se reciban para realizar determinaciones seriadas (menos de 7 días desde la última muestra). Tampoco se recomienda el cultivo de muestras para hacer control postratamiento o control de curación. Optativamente, al tratarse de un microorganismo formador de esporas, puede realizarse un pretratamiento de las heces mediante choque con etanol absoluto homogeneizando volúmenes iguales de muestra durante 5 minutos, o mediante choque térmico de 15 min a 80 °C con el fin de incrementar la sensibilidad del cultivo en medios de cultivo poco o nada selectivos ya que en medios selectivos puede verse afectada la sensibilidad del procedimiento.

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

5.1. MEDIOS DE CULTIVO

Para la siembra directa de la muestra se recomienda utilizar medios selectivos para *C. difficile* como:

- agar CCFA (agar cicloserina, cefoxitina, fructosa) o
- Brazier's o CCEY (agar cicloserina, cefoxitina y yema de huevo),

Servicio / Unidad de Microbiología	Cultivo toxigénico	PNT-CD-2	
Hospital.....		Edición N° 01	Página 4 de 7

aunque también es posible utilizar medios no selectivos como:

- agar Brucella
- agar Schaedler
- agar sangre

Algunos medios selectivos pueden enriquecerse con un 5% de sangre de carnero, vitamina K1 y hemina. La adición de taurocolato o lisozima a los medios también puede mejorar la recuperación de *C. difficile*.

5.2. REACTIVOS:

- Colorantes para tinción de Gram.
- Agua oxigenada para catalasa.
- PRO-disk (L-prolina naftilamida) para la prueba de L-prolina aminopeptidasa.
- Galerías de identificación de anaerobios.
- Prueba de detección de glutamato deshidrogenasa mediante inmunoensayo (IE).
- Prueba de detección de toxinas A y/o B mediante IE.
- Prueba de detección molecular de los genes de la toxina A o B.
- Alcohol absoluto, cuando se realice pretratamiento mediante choque alcohólico en el cultivo toxigénico.
- Bloque térmico con capacidad para calentar a 80°C, cuando se realice pretratamiento mediante choque térmico en el cultivo toxigénico.

Una vez sembradas e identificadas correctamente, las placas deben incubarse inmediatamente en condiciones de anaerobiosis a 37°C.

6. APARATOS Y MATERIAL

- Cámara de anaerobiosis (si se dispone de ella en el laboratorio).
- Cabina de seguridad biológica.
- Vórtex.
- Estufa a 35-37°C para incubar los medios de cultivo en condiciones adecuadas.
- Nevera y congelador.
- Microscopio.
- Asas desechables.
- Pipetas Pasteur.
- Portas.
- Jarras, bolsas o cajas para incubar los medios de cultivo en condiciones adecuadas.
- Sobres generadores de anaerobiosis.
- Guantes.
- Papel de filtro.
- Lupa, necesaria para la óptima detección de colonias sospechosas y para el adecuado aislamiento de los distintos morfotipos de *C. difficile*.

7. PROCEDIMIENTO

Es aconsejable procesar la muestra lo antes posible tras su llegada al laboratorio de Microbiología.

Si se va a realizar choque con alcohol, debe homogeneizarse un volumen igual de heces y etanol absoluto durante 5 minutos o choque térmico durante 15 minutos a 80°C.

Servicio / Unidad de Microbiología	Cultivo toxigénico	PNT-CD-2	
Hospital.....		Edición N° 01	Página 5 de 7

Sembrar las heces, estén pretratadas o no, por agotamiento con la ayuda del asa o de una pipeta Pasteur, si las heces son líquidas. Introducir inmediatamente las placas en una bolsa o jarra en condiciones de anaerobiosis e incubar a 35-37°C durante 24-48 horas, dependiendo del medio.

Cuando se observe el crecimiento de colonias compatibles con *C. difficile* puede realizarse la identificación del microorganismo mediante diferentes pruebas:

- Tinción Gram: se observarán bacilos grampositivos o gramvariables grandes y, en ocasiones, con esporas terminales.
- Test rápido de producción de L-prolina-aminopeptidasa.
- Detección de glutamato deshidrogenasa (GDH).
- Galerías bioquímicas comerciales.
- MALDI-TOF.

Generalmente, las colonias en medios con sangre tienen aspecto verde-grisáceo, no hemolíticas, planas, mate e irregulares con apariencia de vidrio esmerilado y con un halo blanquecino en el centro y un olor a “cuadra de caballo” muy característico que nos permiten identificarlas fácilmente a simple vista sin necesidad de realizar otras pruebas. También muestran fluorescencia bajo luz UV.

Debe tenerse en cuenta la posibilidad de coinfección/colonización por diferentes cepas de *C. difficile*, ya sean toxigénicas o no toxigénicas. Por ello, es recomendable realizar la prueba para la detección de toxinas partiendo de diferentes colonias del cultivo (seleccionando varias colonias al azar). En el caso de que se observen colonias con diferentes fenotipos puede determinarse la presencia o no de toxinas en cada uno de ellos si se considera necesario (preferentemente si se van a realizar otras pruebas como ensayos de sensibilidad o tipado molecular).

La detección de toxinas puede realizarse mediante alguna de las siguientes técnicas:

- Ensayo de citotoxicidad (se describe en el PNT-CD-1 de este procedimiento)
- Inmunoensayo para la detección de toxinas A y/o B
- Detección molecular de los genes de la toxina A o B

Es recomendable utilizar una técnica rápida para la detección de las toxinas para reducir el tiempo de respuesta de la técnica.

Finalmente, pueden realizarse subcultivos del microorganismo mediante subcultivos de las colonias a placas de agar sangre o a medios selectivos si se considera necesario. Tras 24-48 horas pueden usarse los subcultivos para realizar pruebas de sensibilidad antibiótica, tipado molecular o simplemente o congelar las cepas aisladas.

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

En caso de identificar una cepa de *C. difficile* productora de toxinas en el cultivo puede informarse como “Se aísla *C. difficile* toxigénico”.

Si crece una cepa no toxigénica se puede informar el resultado como “Se aísla *C. difficile* NO toxigénico (no patógeno)” o bien dar un resultado negativo.

En cualquier caso, debe evitarse crear confusión a la hora de informar las cepas que no son productoras de toxinas, ya que no se consideran patógenas.

En caso de detectarse un cultivo positivo para *C. difficile* toxigénico, que no haya sido diagnosticado previamente mediante técnicas rápidas se deberá informar telefónicamente a un médico y/o enfermera responsable del

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Cultivo toxigénico	PNT-CD-2	
		Edición N° 01	Página 6 de 7

paciente así como al servicio de Medicina Preventiva (o similar, en su defecto), con el fin de tomar las medidas adecuadas.

9. RESPONSABILIDADES

La recogida de la muestra es responsabilidad del servicio solicitante. La información sobre las normas de recogida, transporte y conservación de las muestras y su distribución a los servicios solicitantes es responsabilidad del laboratorio de Microbiología.

El facultativo encargado del área de recepción y procesamiento de muestras del laboratorio es responsable de la supervisión de la recepción, identificación y procesamiento de las muestras, así como del rechazo de las muestras remitidas en condiciones no adecuadas y de la adopción de medidas correctoras.

El personal técnico es responsable de los procedimientos utilizados para la detección de la ICD mientras que el personal facultativo del área de *Clostridium difficile* es el responsable de la supervisión del trabajo del personal técnico, comunicación y validación de los resultados y firma de los informes. También es responsable de mantener al día los procedimientos y responder a las interconsultas.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Los cultivos toxigénicos también deben servir como un control del buen funcionamiento del algoritmo diagnóstico ya que no es infrecuente la existencia de lotes defectuosos, especialmente en técnicas de IE basadas en inmunocromatografía, que den lugar tanto a resultados falsos positivos como falsos negativos. En caso de que se produzca el hallazgo de un lote defectuoso se deberán retirar todas las pruebas de la prueba, se realizará el pertinente parte de no conformidad y se informará inmediatamente a la casa suministradora para que retire las pruebas y las remplace con un nuevo lote.

Cuando las condiciones del paciente obligue a la toma de exudados rectales para el diagnóstico de la ICD lo recomendable es tomar dos muestras, una sin medio de transporte en el que se realizará directamente una prueba de detección molecular (por la escasa cantidad de muestra, que reduce mucho la sensibilidad de los IEs), y otra con medio de transporte (como el medio de Cary-Blair) que se utilizará para realizar un cultivo toxigénico.

En caso de que se reciba una biopsia de colon para diagnóstico de la ICD se machacará en un mortero con un volumen pequeño de suero salino y la mezcla se utilizará tanto para la detección rápida de la ICD mediante una técnica molecular como para la realización de un cultivo toxigénico.

El cultivo toxigénico se considera por muchos expertos como la técnica de referencia para el diagnóstico de *C. difficile* toxigénico por tratarse de una técnica muy sensible y específica. Sin embargo, no es una técnica imprescindible para el diagnóstico microbiológico de este patógeno en función del algoritmo diagnóstico que se aplique en cada laboratorio. En general, se recurre a técnicas más rápidas aunque menos sensibles, como los algoritmos diagnósticos basados en la detección inicial de GDH o bien, a técnicas moleculares, que son rápidas y muy sensibles. Por otra parte, las técnicas de diagnóstico rápido presentan la desventaja de que no nos permiten trabajar directamente con la cepa para realizar otro tipo de ensayos (sensibilidad antibiótica, tipado molecular, etc.).

Es altamente recomendable la utilización de una lupa para poder optimizar la detección tanto de las colonias sospechosas como los diferentes morfotipos de *C. difficile*.

Ya que se recomienda procesar para diagnóstico de la ICD toda muestra de heces no formes de cualquier paciente mayor de 2 años independientemente de la petición clínica, el aumento de volumen de muestras que implica seguir esta recomendación puede exceder el presupuesto del laboratorio. En este caso, una posibilidad sería realizar tanto el algoritmo como el cultivo en aquellas muestras con petición clínica de ICD y realizar solo el cultivo

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Cultivo toxigénico	PNT-CD-2	
		Edición N° 01	Página 7 de 7

toxigénico en las muestras sin sospecha clínica ya que estas últimas suelen tener un menor porcentaje de positividad y suelen pertenecer a pacientes menos graves.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Se trata de una técnica que requiere bastante tiempo (una mediana de dos días) para poder dar un resultado y que, por tanto, no es útil como única técnica diagnóstica.

Además, se precisa de personal experimentado en el reconocimiento de este tipo de colonias y en la manipulación de este tipo de cultivos.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Bartlett JG, Gerding DN. Clinical recognition and diagnosis of *Clostridium difficile* infection. Clin Infect Dis. 2008; 46 (Suppl 1):S12-18.
2. Bouza E, Marín M, Peláez T, Alcalá L, on behalf of the group for *Clostridium difficile* Infection of the Spanish Society for Chemotherapy. The situation and management of *Clostridium difficile* infection in Spain: an opinion document. Rev Esp Quimioter. 2013; 26:261-286.
3. Bumham CD, Carroll KC. Diagnosis of *C. difficile* infection: an ongoing conundrum for clinicians. Clin Microbiol Rev. 2013; 26:604-630.
4. Crobach EMJT, Dekkers OM, Wilcox MH, Kuijper EJ. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): Data review and recommendations for diagnosing *Clostridium difficile*-infection (CDI). Clin Microbiol Infect 2009; 15:1053-1066.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procedimientos diagnósticos de la infección por <i>Clostridium difficile</i>	PNT-CD-3	
		Edición N° 01	Página 1 de 7

PNT-CD-3

Procedimientos diagnósticos de la infección por *Clostridium difficile*

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre / Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro.....
La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procedimientos diagnósticos de la infección por <i>Clostridium difficile</i>	PNT-CD-3	
		Edición N° 01	Página 2 de 7

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Descripción de los procedimientos de laboratorio para el diagnóstico global de la infección por *Clostridium difficile* (ICD) a partir de muestras de heces, exudados rectales y biopsias de colon. Este procedimiento es aplicable a todos los laboratorios de Microbiología que cuenten con los medios y experiencia adecuados para el manejo de este microorganismo.

2. FUNDAMENTO

A pesar de la evidente mejora de la calidad de las técnicas diagnósticas de la ICD durante la última década no existe actualmente ninguna técnica que, por sí misma, pueda ser lo suficientemente coste-eficaz como para poder ser utilizada para el diagnóstico rápido de la ICD. Aunque las técnicas de detección de toxinas A y/o B mediante inmunoensayo (IE) son técnicas rápidas, sencillas y de bajo coste, su baja sensibilidad y especificidad las descartan como técnicas únicas de diagnóstico de la ICD. Aunque la detección de glutamato deshidrogenasa (GDH) mediante IE es una técnica sensible, tiene el inconveniente de no tener una buena especificidad por su capacidad de detectar tanto cepas toxigénicas como no toxigénicas. Las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos de *C. difficile* son muy sensibles y específicas pero su alto precio excede el presupuesto de la mayoría de los laboratorios. Evidentemente, el importante retraso diagnóstico tanto del ensayo de citotoxicidad como del cultivo toxigénico los excluyen como técnicas diagnósticas rápidas. La mayoría de guías internacionales recomiendan el uso de un algoritmo rápido de diagnóstico de la ICD basado en el combinación de un IE que detecte GDH como método de cribado y la confirmación de los resultados GDH(+) mediante una técnica molecular de detección de los genes de la toxina A o B (algoritmo de dos pasos) con la posibilidad de introducir como prueba intermedia la detección de toxinas mediante IE (algoritmo de tres pasos). Por otra parte, la realización de un cultivo toxigénico a las muestras de heces permite recuperar aproximadamente un 10% de los episodios de ICD que no son capaces de detectar los algoritmos diagnósticos propuestos.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

1. PNT-CD-01 (“Detección de la toxina B de *Clostridium difficile* en las heces sobre cultivo celular”), del presente procedimiento.
2. PNT-CD-02 (“Cultivo toxigénico”), del presente procedimiento.
3. Alados Arboledas JC, Gómez García de la Pedrosa E, Leiva León J, Pérez Sáenz JL, Rojo Molinero E. Seguridad en el laboratorio de Microbiología Clínica. 10a. Pérez Sáenz JL (coordinador). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2014. Disponible en <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>.
4. Alonso C, Bartolomé R, Domínguez J, Matas L, Rabella N. Técnicas rápidas de detección de antígeno. 19. Domínguez J (coordinador). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2005. Disponible en <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>.
5. Guerrero Gómez C, Sánchez Carrillo C. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de Microbiología. 1a. Sánchez Carrillo C (coordinador). Procedimientos en Microbiología clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2003. Disponible en <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>.
6. Alcalá L, Betriu C, García Sánchez JE, Reig M. Bacterias anaerobias. 16. García Sánchez JE (coordinador). Procedimientos en Microbiología clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2004. Disponible en <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procedimientos diagnósticos de la infección por <i>Clostridium difficile</i>	PNT-CD-3	
		Edición N° 01	Página 3 de 7

4. MUESTRAS

4.1. VOLANTE DE PETICIÓN

El volante de petición o la petición electrónica de cada muestra deben estar correctamente cumplimentados y en ellos deberán constar con claridad:

- Los datos demográficos del paciente (como filiación, edad y número de historia), servicio de procedencia y datos del clínico peticionario.
- Los datos de la muestra (tipo, fecha y hora de obtención) y determinaciones microbiológicas solicitadas.
- Los datos clínicos (diagnóstico del paciente, enfermedad de base, tratamiento antibiótico previo).

4.2. RECOGIDA Y TRANSPORTE DE LA MUESTRA

Se debe recoger una muestra de heces no formes preferiblemente en un recipiente estéril, de cierre hermético y sin medio de transporte. También puede recogerse en recipientes con medios de transporte para enteropatógenos aerobios como el medio de Cary-Blair.

En pacientes con íleo paralítico o megacolon tóxico se recomienda recoger dos exudados rectales con torundas de algodón, preferiblemente una sin medio de transporte (para la detección rápida de la ICD) y otra con medio de transporte (para el cultivo toxigénico).

Se recomienda recoger las biopsias de colon en un tubo estéril con 1 ml de suero fisiológico.

Cuando el transporte de la muestra se realice en menos de 1 hora no es necesario refrigerar la muestra. Si se prevé que el transporte se realice en un periodo estimado de 1-72 horas se recomienda refrigerar la muestra a 2-8°C mientras que si se prevé que el periodo sea superior se recomienda congelar la muestra a una temperatura de -20°C.

4.3. CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

Las muestras deben refrigerarse a 2-8°C cuando el tiempo de conservación previsto sea inferior a 72 horas mientras que deben congelarse a -60/-80°C para tiempos de conservación superiores.

4.4. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO

Se recomienda procesar para diagnóstico de la ICD las muestras procedentes de pacientes con diarrea independientemente de su edad (salvo menores de 2 años), su origen (hospitalizado o comunitario) o la petición microbiológica del clínico demandante. Las únicas excepciones serían aquellas muestras de heces transportadas en medios esporicidas como algunos medios de transporte para parásitos que contienen formaldehído.

Sólo se aceptarán muestras de heces no formes, definidas como aquellas que adoptan la forma del recipiente en el que están. Solamente se aceptarán heces sólidas en aquellos pacientes con íleo paralítico, megacolon tóxico o cualquier colitis que curse sin diarrea (en muchos de estos casos no será posible tampoco la obtención de muestra de heces sólidas por lo que habrá que obtener exudados rectales mediante torunda).

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

5.1. MEDIOS DE CULTIVO

Ver PNT-CD-02 ("Cultivo toxigénico"), del presente procedimiento.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procedimientos diagnósticos de la infección por <i>Clostridium difficile</i>	PNT-CD-3	
		Edición N° 01	Página 4 de 7

5.2. REACTIVOS

Reactivos incluidos en el/los IE utilizados en el algoritmo diagnóstico rápido.

Reactivos utilizados en la técnica molecular utilizada en el algoritmo diagnóstico rápido.

Ver PNT-CD-02 (“Cultivo toxigénico”), del presente procedimiento.

5.3. PRODUCTOS

Ver PNT-CD-02 (“Cultivo toxigénico”), del presente procedimiento.

6. APARATOS Y MATERIAL

Ver PNT-CD-02 (“Cultivo toxigénico”), del presente procedimiento.

Los aparatos y materiales especificados en las instrucciones del fabricante de las técnicas de IE y de amplificación molecular utilizados en el algoritmo diagnóstico.

7. PROCEDIMIENTO

7.1. ALGORITMO DIAGNÓSTICO RÁPIDO

7.1.1. Algoritmo diagnóstico de dos pasos

- **Prueba inicial o de cribado.** Se recomienda que se utilice una técnica de detección de GDH mediante IE.
 - Seguir las instrucciones del fabricante para la realización de la técnica.
 - Si el resultado de la prueba es negativo, informar como negativo el resultado final del algoritmo diagnóstico.
 - Si el resultado de la prueba es positivo, proceder a realizar la confirmación del resultado mediante la prueba confirmatoria.
- **Prueba confirmatoria.** Cualquier técnica de amplificación que detecte, al menos, el gen de la toxina B. También se aceptan técnicas que detecten el gen de la toxina A siempre y cuando sean capaces de detectar cepas toxigénicas toxina A (-)/toxina B (+) (se trata de técnicas que detectan una parte del gen de la toxina A que está conservada incluso en aislados que no expresan la toxina A).
 - Realizar la prueba solo cuando el resultado de la prueba inicial haya sido positiva y seguir escrupulosamente las instrucciones del fabricante.
 - Si el resultado de la prueba confirmatoria es negativo, informar como negativo el resultado final del algoritmo diagnóstico.
 - Si el resultado de la prueba confirmatoria es positivo, informar como positivo el resultado final del algoritmo diagnóstico.

7.1.2. Algoritmo diagnóstico de tres pasos

- **Prueba inicial o de cribado.** Se recomienda que se utilice una técnica de detección de GDH mediante IE.
 - Seguir las instrucciones del fabricante para la realización de la técnica.
 - Si el resultado de la prueba es negativo, informar como negativo el resultado final del algoritmo diagnóstico.
 - Si el resultado de la prueba es positivo, proceder a realizar la confirmación del resultado mediante la prueba intermedia.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procedimientos diagnósticos de la infección por <i>Clostridium difficile</i>	PNT-CD-3	
		Edición N° 01	Página 5 de 7

- **Prueba intermedia.** Cualquier técnica de detección de las toxinas A y/o B mediante IE.
 - Seguir las instrucciones del fabricante para la realización de la técnica.
 - Si el resultado de la prueba intermedia es negativo, proceder a realizar la confirmación del resultado mediante la prueba confirmatoria.
 - Si el resultado de la prueba intermedia es positivo, informar como positivo el resultado final del algoritmo diagnóstico.
- **Prueba confirmatoria.** Cualquier técnica de amplificación que detecte, al menos, el gen de la toxina B. También se aceptan técnicas que detecten el gen de la toxina A siempre y cuando sean capaces de detectar cepas toxigénicas toxina A (-)/toxina B (+) (se trata de técnicas que detectan una parte del gen de la toxina A que está conservada incluso en aislados que no expresan la toxina A).
 - Realizar la prueba solo cuando el resultado de la prueba inicial haya sido positiva y el resultado de la prueba intermedia haya sido negativa y seguir escrupulosamente las instrucciones del fabricante.
 - Si el resultado de la prueba confirmatoria es negativo, informar como negativo el resultado final del algoritmo diagnóstico.
 - Si el resultado de la prueba confirmatoria es positivo, informar como positivo el resultado final del algoritmo diagnóstico.

7.1.3. Algoritmo diagnóstico con IEs que detectan simultáneamente GDH y toxinas A y/o B

- **Prueba inicial o de cribado.** Cualquier IE que detecte simultáneamente GDH y las toxinas A y/o B.
 - Seguir las instrucciones del fabricante para la realización de la técnica.
 - Si el resultado de la prueba es GDH (-)/Toxinas (-), informar como negativo el resultado final del algoritmo diagnóstico.
 - Si el resultado de la prueba es GDH (+)/Toxinas (-) o GDH (-)/Toxinas (+), proceder a realizar la confirmación del resultado mediante la prueba confirmatoria.
 - Si el resultado de la prueba es GDH (+)/Toxinas (+), informar como positivo el resultado final del algoritmo diagnóstico.
- **Prueba confirmatoria.** Cualquier técnica de amplificación que detecte, al menos, el gen de la toxina B. También se aceptan técnicas que detecten el gen de la toxina A siempre y cuando sean capaces de detectar cepas toxigénicas toxina A (-)/toxina B (+) (se trata de técnicas que detectan una parte del gen de la toxina A que está conservada incluso en aislados que no expresan la toxina A).
 - Realizar la prueba solo cuando el resultado de la prueba inicial haya sido GDH (+)/Toxinas (-) o GDH (-)/Toxinas (+) y seguir escrupulosamente las instrucciones del fabricante.
 - Si el resultado de la prueba confirmatoria es negativo, informar como negativo el resultado final del algoritmo diagnóstico.
 - Si el resultado de la prueba confirmatoria es positivo, informar como positivo el resultado final del algoritmo diagnóstico.

7.2. CULTIVO TOXIGÉNICO.

Ver PNT-CD-02 ("Cultivo toxigénico"), del presente procedimiento.

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Se recomienda informar rápidamente el resultado obtenido del algoritmo diagnóstico tanto telefónicamente como mediante emisión de un informe de resultados mientras que se recomienda informar el cultivo toxigénico solamen-

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procedimientos diagnósticos de la infección por <i>Clostridium difficile</i>	PNT-CD-3	
		Edición N° 01	Página 6 de 7

te mediante informe de resultados, salvo cuando se obtenga un resultado discordante, en cuyo caso habría que informarlo también telefónicamente.

9. RESPONSABILIDADES

La recogida de la muestra es responsabilidad del servicio solicitante. La información sobre las normas de recogida, transporte y conservación de las muestras y su distribución a los servicios solicitantes es responsabilidad del laboratorio de Microbiología.

El facultativo encargado del área de recepción y procesamiento de muestras del laboratorio es responsable de la supervisión de la recepción, identificación y procesamiento de las muestras, así como del rechazo de las muestras remitidas en condiciones no adecuadas y de la adopción de medidas correctoras.

El personal técnico es responsable de los procedimientos utilizados para la detección de la ICD mientras que el personal facultativo del área de *Clostridium difficile* es el responsable de la supervisión del trabajo del personal técnico, comunicación y validación de los resultados y firma de los informes. También es responsable de mantener al día los procedimientos y responder a las interconsultas.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Los cultivos toxigénicos también deben servir como un control del buen funcionamiento del algoritmo diagnóstico ya que no es infrecuente la existencia de lotes defectuosos, especialmente en técnicas de IE basadas en inmunocromatografía, que den lugar tanto a resultados falsos positivos como falsos negativos. En caso de que se produzca el hallazgo de un lote defectuoso se deberán retirar todas las pruebas de la prueba, se realizará el pertinente parte de no conformidad y se informará inmediatamente a la casa suministradora para que retire las pruebas y las remplace con un nuevo lote.

Cuando las condiciones del paciente obliguen a la toma de exudados rectales para el diagnóstico de la ICD lo recomendable es tomar dos muestras, una sin medio de transporte en el que se realizará directamente una prueba de detección molecular (por la escasa cantidad de muestra, que reduce mucho la sensibilidad de los IEs), y otra con medio de transporte (como el medio de Cary-Blair) que se utilizará para realizar un cultivo toxigénico.

En caso de que se reciba una biopsia de colon para diagnóstico de la ICD se machacará en un mortero con un volumen pequeño de suero salino y la mezcla se utilizará tanto para la detección rápida de la ICD mediante una técnica molecular como para la realización de un cultivo toxigénico.

Debido a que las infecciones producidas por los aislados de *C. difficile* del ribotipo 027 suelen ser más graves que las producidas por otros aislados se recomienda establecer una especial vigilancia para detectar este ribotipo, optimizar el tratamiento y evitar que se disemine este clon en el ambiente hospitalario. Por tanto, en instituciones en las que exista una sospecha fundada de alto riesgo de brote (casos aislados detectados recientemente, existencia de alguna institución cercana en situación epidémica, etc) o en el seno de un brote producido por el ribotipo 027 es muy recomendable modificar el algoritmo diagnóstico para facilitar la detección de este ribotipo. Por una parte, convendría realizar alguna técnica molecular que detectase rápidamente este ribotipo. Desgraciadamente, el ribotipado es un procedimiento que necesita tanto de instalaciones especiales como de personal especializado en biología molecular, además, el proceso total tarda varios días ya que parte de los aislados. La única posibilidad pasa por la utilización de técnicas moleculares muy específicas que detecten, como mínimo, tanto al gen de la toxina A o B, como a este ribotipo sobre muestra de heces directamente. Por otra parte, convendría incorporar esta técnica molecular al algoritmo diagnóstico de forma que pueda detectar el mayor número posible de casos producidos por este ribotipo. Para ello, sería recomendable realizar la detección molecular a cualquier muestra de heces con resultado GDH(+) independientemente del resultado de la detección de las toxinas (en el caso de que el algoritmo incluya la detección de toxinas). Este último punto también es muy importante ya que muchos de

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procedimientos diagnósticos de la infección por <i>Clostridium difficile</i>	PNT-CD-3	
		Edición N° 01	Página 7 de 7

los aislados del ribotipo 027 son hiperproductores de toxina por lo que una proporción considerable de muestras que los contienen dan lugar a resultados GDH(+)/Toxinas(+). Otra posibilidad economicista sería realizar un análisis mediante mezcla de muestras aunque son necesarios más estudios para validar esta técnica en este tipo de situaciones.

11. LIMITACIONES DEL PROCESAMIENTO

Cualquier muestra forme proveniente de un paciente con sospecha de ICD y sin síntomas de íleon paralítico o de megacolon tóxico deberá ser rechazada ya que procederá de un paciente sin diarrea, bien por cese de ésta sin tratamiento, bien porque se trata de un control de cura en pacientes tratados. En este sentido, está totalmente contraindicado realizar un test de cura a cualquier paciente con un episodio previo de ICD ya que está demostrado que las pruebas diagnósticas pueden dar lugar a resultados tanto falsos positivos como falsos negativos.

Puesto que se recomienda procesar para diagnóstico de la ICD toda muestra de heces no forme de cualquier paciente mayor de 2 años independientemente de la petición clínica, el aumento de volumen de muestras que implica seguir esta recomendación puede exceder el presupuesto del laboratorio. En este caso, una posibilidad sería realizar tanto el algoritmo como el cultivo en aquellas muestras con petición clínica de ICD y realizar solo el cultivo toxigénico en las muestras sin sospecha clínica ya que estas últimas suelen tener un menor porcentaje de positividad y suelen pertenecer a pacientes menos graves.

El volumen de muestra de heces debe ser lo suficientemente importante como para permitir la realización del algoritmo diagnóstico y el cultivo toxigénico.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Bouza E, Marín M, Peláez T, Alcalá L, on behalf of the group for *Clostridium difficile* Infection of the Spanish Society for Chemotherapy. The situation and management of *Clostridium difficile* infection in Spain: an opinion document. Rev Esp Quimioter. 2013;;26:261-286.
2. Cohen SH, Gerding DN, Johnson S, Kelly CP, Loo VG, McDonald LC, et al. 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; 31:431-455.
3. Crobach EMJT, Dekkers OM, Wilcox MH, Kuijper EJ. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): Data review and recommendations for diagnosing *Clostridium difficile*-infection (CDI). Clin Microbiol Infect. 2009;15:1053-1066.
4. Isenberg HD. Clinical Microbiology Procedures Handbook, Second Edition, vol. 1. 2007. Section 1.10. Processing and interpretation of bacterial fecal cultures. American Society for Microbiology; ASM Press. Washington D.C.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Tipado molecular de cepas de <i>Clostridium difficile</i> mediante PCR-ribotipado	PNT-CD-4	
		Edición N° 01	Página 2 de 8

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

En este procedimiento se describe la metodología a seguir para realizar el tipado molecular de aislados de *Clostridium difficile* mediante PCR ribotipado con los iniciadores descritos por Stubbs y colaboradores en 1999. Este procedimiento es aplicable a todos los laboratorios de Microbiología que cuenten con los medios y experiencia adecuados para el manejo de este microorganismo.

2. FUNDAMENTO

La infección asociada a *C. difficile* es una enfermedad transmisible que da lugar a importantes brotes de diarrea nosocomial. Dentro de *C. difficile* se han reconocido distintas variantes que difieren en cuanto a transmisibilidad y virulencia. Las distintas cepas de *C. difficile* son prácticamente indistinguibles por métodos fenotípicos, siendo necesarios estudios moleculares para su diferenciación y para establecer relaciones epidemiológicas entre ellas.

Para llevar a cabo los estudios de epidemiología molecular de *C. difficile*, se emplean diversos métodos que en su mayoría son laboriosos y requieren personal especializado para su realización e interpretación. El ribotipado es actualmente la técnica más empleada en Europa ya que es uno de los métodos más sencillos, tiene buena capacidad de discriminación y es reproducible intralaboratorio.

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 ribosómico. 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. Los patrones obtenidos para las distintas cepas se comparan mediante programas de análisis filogenético. 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).

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Alados Arboledas JC, Gómez García de la Pedrosa E, Leiva León J, Pérez Sáenz JL, Rojo Molinero E. Seguridad en el laboratorio de Microbiología Clínica. 10a. Pérez Sáenz JL (coordinador). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2014. Disponible en <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>.
- Guerrero Gómez C, Sánchez Carrillo C. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de Microbiología. 1a. Sánchez Carrillo C (coordinador). Procedimientos en Microbiología clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2003. Disponible en <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>.
- Alcalá L, Betriu C, García Sánchez JE, Reig M. Bacterias anaerobias. 16. García Sánchez JE (coordinador). Procedimientos en Microbiología clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2004. Disponible en <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>.
- Manual del Área de Tipado Molecular (o similar).
- Manual de instrucciones del kit de extracción de ácidos nucleicos: Instagene Matrix (BioRad®).
- Manual de instrucciones del kit Qiagen Multiplex PCR (Qiagen®).
- Manual de instrucciones de los termocicladores, microcentrifugas, fuentes y cubetas de electroforesis).
- Registro de calibraciones de los termocicladores.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Tipado molecular de cepas de <i>Clostridium difficile</i> mediante PCR-ribotipado	PNT-CD-4	
		Edición N° 01	Página 3 de 8

4. MUESTRAS

4.1. MUESTRAS

Se realizará la técnica a cultivos puros de *C. difficile* toxigénico.

4.2. TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN

Los aislados se recibirán en cualquier medio de cultivo que permita el crecimiento de *C. difficile* y se mantendrán refrigerados en nevera hasta la extracción del ADN.

4.3. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO

Se aceptarán todas las placas con aislados que vengan identificadas como *C. difficile* toxigénico desde el área donde se realice el cultivo toxigénico.

Sólo se rechazarán las placas que se reciban mal identificadas, contaminadas, los cultivos sobrecrecidos o aquellos medios en los que haya un crecimiento insuficiente de *C. difficile* toxigénico.

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

5.1. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Se tomarán unas 5 colonias de un cultivo puro de *C. difficile* (procedente, a su vez, de una sola colonia) que se resuspenderán en la resina Instagene Matrix (Biorad®). El resto del procedimiento de extracción se realizará siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.2 REACCIÓN DE AMPLIFICACIÓN

Reacción de PCR (modificado de Stubbs y cols 1999)

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

Notas. Los iniciadores se preparan en solución stock de 100 pmol/μl a partir del liofilizado. Los iniciadores liofilizados, la solución stock de iniciadores y las alícuotas de trabajo se deben conservar a -20°C en el congelador del área 1 del laboratorio de biología molecular durante un periodo no superior a 3 años.

A la hora de preparar la mezcla de reacción se debe considerar que hay que emplear tantos tubos como muestras se procesen, un control negativo (H2O libre de nucleasas) y un control positivo que, por ejemplo, pueden ser cepas control de los ribotipos 001, 014, 027 y 078, que son los más frecuentes en España

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Tipado molecular de cepas de <i>Clostridium difficile</i> mediante PCR-ribotipado	PNT-CD-4	
		Edición N° 01	Página 4 de 8

Iniciadores de PCR :

Iniciador	Secuencia (5'-3')
ribst-16S-F Posición 1445-1466 de 16S ARNr	CTGGGGTGAAGTCGTAACAAGG
ribst-23S-R Posición 20-1 de 23S ARNr	GCGCCCTTTGTAGCTTGACC

5.3. DETECCIÓN DE AMPLICONES

Agarosa: Preparar un gel largo de agarosa MS-8 al 2,5% en tampón TBE 1X (100 ml de TBE 10X comercial + 900 ml de agua destilada), de tamaño adecuado a la cubeta de electroforesis que se utilice.

Agente intercalante: Real Safe (Durviz) o similar que se debe emplear según las instrucciones del fabricante. Si se utiliza bromuro de etidio hay considerar que es un reactivo muy tóxico.

Buffer de carga: Promega 6X.

Marcadores de PM (100pb).

6. APARATOS Y MATERIAL

- Micropipetas (diferentes en cada área de trabajo).
- Puntas de micropipeta de “calidad molecular” con filtro que nos se debe compartir entre las distintas áreas de trabajo.
- Gradillas para tubos Sarstedt o similares.
- Agitador tipo vórtex.
- Tubos de reacción de 1,5 ml de “calidad molecular” (tipo Sarstedt o similar).
- Rejillas, bases, tubos y tapas de PCR adaptados al termociclador.
- Bandeja con hielo o soportes de PCR refrigeradores.
- Contenedores de residuos.
- Termobloques.
- Microcentrífugas.
- Termocicladores tipo GeneAmp 9700 (Applied Biosystems o similar).
- Balanza.
- Matraces y probetas para preparar la suspensión de agarosa.
- Fuente de electroforesis, bandejas y cubetas.
- Horno de microondas.
- Sistema de visualización de geles con transiluminador UV y sistema fotográfico.
- Software de análisis filogenético tipo Bionumerics 5.0 o posterior (Applied Maths®), Gel compar®, etc.

7. PROCEDIMIENTO

7.1. PREPARACIÓN DE MUESTRAS

7.1.1. Distribución de áreas de trabajo

Área 1 (los procedimientos de esta área se realizarán en primer lugar para no tener que volver a él):

Preparación de oligonucleótidos.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Tipado molecular de cepas de <i>Clostridium difficile</i> mediante PCR-ribotipado	PNT-CD-4	
		Edición N° 01	Página 5 de 8

Preparación de la mezcla de reacción de amplificación.
Distribución de la mezcla de reacción en los tubos y placas de PCR.

Área 2:

Preparación de las muestras, extracción y purificación de ácidos nucleicos.
Incorporación del ADN extraído a los tubos que contienen los reactivos de la reacción de PCR.

Área 3

Reacción de amplificación en termociclador.
Detección de fragmentos por electroforesis en geles de agarosa.
Fotografía de los geles de agarosa tras la electroforesis.

7.1.2. Preparación de reactivos

Área 1:

Preparación de la *master mix*. Para realizar los cálculos conviene tener en cuenta el número de controles positivos y negativos que se van a utilizar y el número de muestras.
Distribución de mezcla de reacción en los tubos y placas de PCR. Se alicuotan 20 µl en cada tubo de PCR.
La preparación de las de la mezcla de reacción se debe realizar en hielo y las placas de PCR se deben conservar refrigeradas hasta su utilización (no más de 4 horas).

7.1.3. Preparación de muestras

Los cultivos de *C. difficile* toxigénico deben ser recientes y estar bien crecidos. Se deben atemperar antes de su procesamiento y se deben procesar en el área 2 del laboratorio de biología molecular. En caso de que el ADN haya sido previamente extraído y esté congelado se debe dejar descongelar completamente.

7.2. EXTRACCIÓN DE ADN

Se deben seguir las recomendaciones del fabricante para la extracción de ADN de bacterias. En resumen, 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 vórtex a máxima velocidad durante 30 segundos y se hervirán en baño de agua durante 8 minutos. Se agitará de nuevo en vórtex 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.

7.3. AMPLIFICACIÓN

Controles: en cada placa de PCR se introducirán, además del ADN de las muestras, un control negativo (agua bidestilada estéril y libre de nucleasas) y los controles positivos (ADN de cepas de los ribotipos 001, 014, 027 y 078, que son los más frecuentes en España).

Mezcla de reacción:

- Distribuir 20 µl de la master mix en cada tubo de la placa de amplificación.
- Preparar la hoja de trabajo apuntando la situación de cada muestra y cada control en la placa de PCR.
- Añadir 5 µl del ADN extraído con resina Chelex, de los controles negativos y positivos, en cada tubo de la placa de PCR que contiene 20 µl de la mezcla de reacción (en área 2 y en hielo).
- Tapar los tubos e introducir la placa en el termociclador, con el siguiente programa de PCR.

Desnaturalización inicial: 94°C durante 10 minutos.

Un total de 35 ciclos de PCR: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, anillamiento a 55°C durante 1 minuto, elongación a 72°C durante 2 minutos.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Tipado molecular de cepas de <i>Clostridium difficile</i> mediante PCR-ribotipado	PNT-CD-4	
		Edición N° 01	Página 6 de 8

Elongación final: 72°C durante 10 minutos.
Refrigeración a 4°C.

7.4. DETECCIÓN DE LOS PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN

Preparar un gel de agarosa MS-8 al 2,5 % 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.

Añadir 3 µl de buffer de carga a cada tubo de PCR que contienen los productos amplificados. Agitar la placa de PCR en vórtex.

Cargar 12 µl en el gel, incluyendo el marcador de 100 pb en una de las calles.

Correr el gel a 170V durante 4 horas.

Visualizar el gel con transiluminador UV y hacer una foto de tamaño y formato adecuado para transferir al programa de análisis filogenético.

7.5. LECTURA E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En la calle del gel correspondiente a los controles negativos no debe aparecer ninguna banda de amplificación. Los controles positivos deben presentar el mismo patrón de bandas en todos los geles que se hagan en el mismo laboratorio. El marcador de peso molecular empleado debe presentar una separación de bandas adecuada.

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

La fotografía del gel se imprimirá en papel térmico y se adjuntará a la plantilla de PCR que se archivará. También se archivará una fotografía del gel en formato digital (adecuado al programa de análisis filogenético) que se exportará al programa de análisis filogenético y se procederá según las instrucciones del fabricante para comparar los patrones obtenidos con las cepas control o con la colección de ribotipos de cada laboratorio. Es fundamental realizar una correcta normalización de los geles. El reconocimiento de las cepas de los ribotipos 001, 027, 078 y 014 puede hacerse *de visu* comparando con cepas control siempre y cuando se procesen en el mismo gel.

En general se debe considerar que dos cepas pertenecen al mismo ribotipo si presentan el mismo número y posición (tamaño) de bandas, como se establece en los artículos publicados por Stubbs y cols (1999) y Killgore y cols (2008).

La creación de dendrogramas de similitud para la comparación de un número elevado de aislados se puede realizar usando el Método UPGMA (*unweighted pair group method using arithmetic averages*) y el coeficiente de Dice. Se consideran iguales las cepas con una similitud $\geq 99\%$.

La expresión de los resultados dependerá del objetivo con el que se haya realizado el análisis: para detectar un brote, para estudiar si una cepa concreta pertenece a un ribotipo determinado, etc. De cualquier modo, debe realizarse de una forma clara, concisa y comprensible para el personal al que vaya dirigido el informe de resultados.

9. RESPONSABILIDADES

Personal técnico del área de diagnóstico molecular: realización del procesamiento de las muestras y técnicas de PCR, registro de resultados, archivo de hojas de trabajo, archivo de alícuotas de ADN o muestras e introducción de información en bases de datos.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Tipado molecular de cepas de <i>Clostridium difficile</i> mediante PCR-ribotipado	PNT-CD-4	
		Edición N° 01	Página 7 de 8

Facultativo responsable: supervisión del trabajo, análisis filogenético, interpretación de resultados, emisión de informes de resultados y resolución de dudas técnicas y de errores.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Todo el personal del laboratorio deberá conocer y seguir las normas generales de bioseguridad e higiene, así como las normas de trabajo en laboratorios de biología molecular. Todas las manipulaciones deben realizarse con guantes.

Es importante considerar que para la obtención de resultados correctos en un laboratorio de diagnóstico molecular en el que se realizan técnicas de PCR se debe distribuir el trabajo en 3 áreas perfectamente diferenciadas:

Área 1 o zona limpia: dedicada a la preparación de reactivos. En la que no se introducirán muestras ni reactivos que contengan ADN, tanto amplificado como no amplificado. En esta área se preparan las mezclas de reacción (*master mix*) de la PCR.

Área 2 o de manipulación de muestras y extracción de ADN. En esta área se procesan las muestras, se realiza la extracción y purificación del ADN y se añade el ADN a la *master mix*. En esta zona no se debe introducir ADN amplificado.

Área 3 o de amplificación. En esta área se detectan y procesan los productos de PCR (carga de geles, purificación, etc.).

En cada zona de trabajo debe existir material independiente (puntas de micropipeta, micropipetas, guantes, etc.). No se debe trasladar el material de una zona a otra, salvo lo estrictamente necesario. El flujo de trabajo debe ser el siguiente: área 1→2→3, y nunca a la inversa.

Es importante que para el manejo del material que esté en contacto con bromuro de etidio, si se utiliza, se usen siempre guantes y se extremen las precauciones de seguridad, ya que es un reactivo muy tóxico. La visualización de geles con transiluminador UV debe realizarse con caretas protectoras o en sistema cerrado.

Las fuentes de electroforesis se deben apagar siempre antes de abrir la cubeta.

Los transiluminadores UV deben apagarse al terminar la visualización del gel ya que se calientan y pueden estropearse tras mucho tiempo de uso continuado.

En el registro de calidad del laboratorio deben existir protocolos de mantenimiento mensuales de los termocicladores utilizados. Los protocolos deben estar detallados en las hojas de mantenimiento de equipos y en el plan de control y calibración de equipos del área y deben ser cumplidos rigurosamente. Es conveniente que quede un registro del mantenimiento.

Las hojas de trabajo y las fotografías de los geles de electroforesis se deben archivar para realizar las comprobaciones oportunas.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El resultado obtenido depende en gran medida de la calidad del cultivo de *C. difficile*. Los cultivos de *C. difficile* no deberán estar contaminados con otras bacterias, deberán ser recientes y contendrán un número suficiente de colonias.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Tipado molecular de cepas de <i>Clostridium difficile</i> mediante PCR-ribotipado	PNT-CD-4	
		Edición N° 01	Página 8 de 8

Los resultados obtenidos en las técnicas de PCR dependen en gran medida de la realización de las técnicas en hielo. La calidad de los patrones de tipado obtenido está influida por numerosos factores (como la experiencia del operador) y depende en gran medida de la correcta optimización de la técnica, que se debe llevar a cabo según las condiciones de cada laboratorio. Este procedimiento constituye una orientación que debe adaptarse a las condiciones concretas de cada laboratorio.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Bouza E, Marín M, Peláez T, Alcalá L, on behalf of the group for *Clostridium difficile* Infection of the Spanish Society for Chemotherapy. The situation and management of *Clostridium difficile* infection in Spain: an opinion document. Rev Esp Quimioter. 2013; 26:261-286.
2. Huber CA, Foster NF, Riley TV, Paterson DL. Challenges for standardization of *Clostridium difficile* typing methods. J Clin Microbiol. 2013; 51:2810-2814.
3. Killgore G, Thompson A, Johnson S, Brazier J, Kuijper E, Pepin J, et al. Comparison of seven techniques for typing international epidemic strains of *Clostridium difficile*: restriction endonuclease analysis, pulsed-field gel electrophoresis, PCR-ribotyping, multi-locus sequence typing, multilocus variable-number tandem-repeat analysis, amplified fragment length polymorphism, and surface layer protein A gene sequence typing. J Clin Microbiol. 2008; 46:431-437.
4. Stubbs SL, Brazier JS, O'Neill GL, Duerden BI. PCR targeted to the 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region of *Clostridium difficile* and construction of a library consisting of 116 different PCR ribotypes. J Clin Microbiol. 1999; 37:461-463.
5. Tenover FC, Akerlund T, Gerding DN, Goering RV, Bostrom T, Jonsson AM, et al. Comparison of strain typing results for *Clostridium difficile* isolates from North America. J Clin Microbiol. 2011; 49:1831-1837.