

PROTOCOLOS RED DE LABORATORIOS PARA LA VIGILANCIA DE LOS MICROORGANISMOS
RESISTENTES (RedLabRA)

Diagnóstico microbiológico de la infección por *Clostridioides difficile*

Aprobado por:	Código:	RedLabRa-I-007
Fecha: 15/02/2021	Ed.:	01
Firma:	Fecha edición:	15/02/2021

Fuente: (SEIMC, 2015) - "Diagnóstico Microbiológico de la infección por *Clostridium difficile*, 2015" - <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia53.pdf>

INTRODUCCIÓN

Hall y O'Toole describieron la existencia de *Clostridioides difficile* en 1935. Inicialmente le denominaron *Bacillus difficile* por su dificultad para ser aislado en medios de cultivo, después se renombró como *Clostridium difficile*, y finalmente, debido a su distancia filogenética con el género *Clostridium*, se reclasificó como *Clostridioides difficile* en 2016 (Lawson et al., 2016 - "Reclassification of *Clostridium difficile* as ***Clostridioides difficile*** (Hall and O'Toole 1935) Prévot 1938"). Algunas variantes de *C. difficile* producen toxinas A y B con capacidad patógena en humanos.

La infección por *C. difficile* (ICD) se manifiesta habitualmente en forma de diarrea que puede variar desde formas leves hasta cuadros graves que pueden llegar a ser mortales. *C. difficile* es capaz de producir esporas que pueden resistir a un gran número de desinfectantes y perdurar en el ambiente durante mucho tiempo. Como consecuencia es un patógeno altamente transmisible, especialmente a partir de las manos del personal sanitario.

La prevención es, claramente, el mejor instrumento que tenemos para reducir la incidencia de la ICD nosocomial. Uno de los factores determinantes para asegurar el éxito de las medidas de prevención es diagnóstico microbiológico rápido y eficaz.

OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN

La instrucción describe el método de diagnóstico microbiológico de la infección por *Clostridioides difficile* toxigénico.

RECURSOS MATERIALES

Equipos:

- Termociclador.
- Secuenciador.
- Tubos eppendorf 0.2 ml.
- Equipos indicados por el fabricante.

Reactivos:

- Agua destilada libre de nucleasas.
- Taq MIX.
- Primers específicos de la toxina A y B.
- Reactivos indicados por el fabricante.

RECOGIDA Y TRANSPORTE DE LA MUESTRA

La muestra adecuada para el diagnóstico de *C. difficile* son las **heces acuosas**, sueltas o no formes recogidas en recipientes estériles, de cierre hermético y sin medio de transporte. Cuando no sea posible obtener heces debido a un íleo, megacolon tóxico o distensión abdominal sin diarrea se aceptará una muestra rectal o perirectal.

El transporte al laboratorio de microbiología debe realizarse lo antes posible en frío (2-8°C) durante las primeras 48-72h o congelada (de -60 a -80°C) a partir de las 72h.

DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LA INFECCIÓN POR *C. difficile*

Las pruebas diagnósticas de laboratorio de *C. difficile* deben realizarse sólo en pacientes sintomáticos y no pueden diferenciar entre colonización asintomática e infección clínica, por lo que no puede existir una causa alternativa para la diarrea.

En cualquier caso, el procesamiento de la muestra debe realizarse lo antes posible para evitar la degradación de las toxinas producidas por *C. difficile*.

La capacidad de producción de esporas de *C. difficile* permite realizar un pretratamiento de la muestra con calor o alcohol (homogeneizando volúmenes iguales de muestra durante 5 minutos) para reducir el crecimiento de la microbiota habitual.

Tabla 1. Comparativa de técnicas de detección de *Clostridioides difficile*.

Técnica de detección	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN	Rapidez	Coste
IE – toxinas A y/o B	Baja 40-60%	Alta >90%			Alta	Bajo
IE – GDH	Alta	Baja	Bajo	Alto 95-100%	Alta	Bajo
IE – toxinas y GDH	Baja	Alta			Alta	Bajo
Amplificación de ácidos nucleicos	Alta >90%	Alta 94-99%	Medio 80-90%	Alto 95-99%	Media	Alto
Ensayo de citotoxicidad	Baja 50-70%	Alta 100%			Baja	Bajo
Cultivo toxigénico	Alta	Alta			Baja	Bajo

IE: Inmuno-ensayo; GDH: enzima glutamato deshidrogenasa; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo.

Adaptado de: SEIMC, 2015 - "Diagnóstico Microbiológico de la infección por *Clostridium difficile*, 2015" - <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia53.pdf>

El procedimiento de referencia para el diagnóstico de *C. difficile* es el **cultivo toxigénico**, aunque para garantizar un adecuado y accesible diagnóstico primario se recomienda llevar a cabo un **algoritmo de diagnóstico** de detección rápida (Figura 1).

REALIZACIÓN

- Algoritmo 1 (Figura 1A):
 1. **Inmunoensayo de detección de glutamato deshidrogenasa (GDH).** Si es negativo se puede descartar la presencia de *C. difficile*. Si es positivo, dado que detecta tanto cepas toxigénicas como no toxigénicas, hay que detectar la presencia de toxinas.
 2. **Inmunoensayo de detección de toxinas A y/o B.** Si es positivo se puede confirmar la presencia de *C. difficile* toxigénico. Si es negativo, dada su baja sensibilidad, hay que amplificar los genes de las toxinas A o B mediante PCR.
 3. **Amplificación de los genes de las toxinas A o B.** El resultado negativo o positivo es confirmatorio.
- Algoritmo 2 (Figura 1B):
 1. **Inmunoensayo de detección de glutamato deshidrogenasa (GDH).** Si es negativo se puede descartar la presencia de *C. difficile*. Si es positivo, dado que detecta tanto cepas toxigénicas como no toxigénicas, hay que detectar la presencia de toxinas.
 2. **Amplificación de los genes de las toxinas A o B.** El resultado negativo o positivo es confirmatorio.

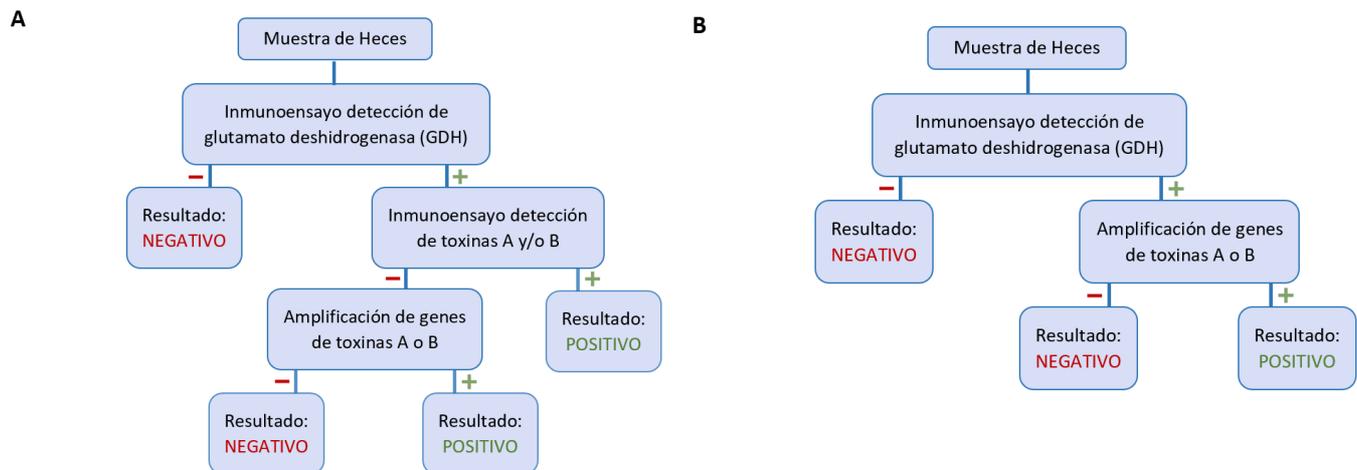


Figura 1. Algoritmos de diagnóstico microbiológico de *Clostridioides difficile*. (A) Algoritmo diagnóstico de 3 pasos. (B) Algoritmo diagnóstico de 2 pasos.

Adaptado de: SEIMC, 2015, "Diagnóstico Microbiológico de la infección por *Clostridium difficile*, 2015" - <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia53.pdf>

Inmunoensayo de detección de glutamato deshidrogenasa:

La enzima GDH o antígeno común es una proteína producida en grandes cantidades y de forma constitutiva por la mayoría de las cepas de *C. difficile*. La detección de esta enzima mediante anticuerpos monoclonales, para evitar reacciones cruzadas, muestra una elevada sensibilidad y especificidad, aunque detecta tanto las cepas productoras como las no productoras de toxinas.

Para la realización de la técnica se recomienda seguir las instrucciones del fabricante.

Inmunoensayo de detección de gen de toxinas A y/o B:

Las toxinas A y B de *C. difficile* son responsables de las manifestaciones clínicas causadas por el patógeno, por lo que su detección es clave para su diagnóstico.

Para la realización de la técnica se recomienda seguir las instrucciones del fabricante.

Amplificación de genes de las toxinas A y B:

Se trata de una técnica más sensible y específica que el inmunoensayo, aunque es más costosa.

Se recomienda realizar la prueba sólo cuando el resultado de la prueba anterior en el algoritmo diagnóstico haya sido positiva, siguiendo escrupulosamente las instrucciones del fabricante.

INFORMACIÓN DE LOS RESULTADOS

El Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) recomienda una **transmisión precoz de la información**, incluyendo fines de semanas y festivos, vía telefónica y mediante informe. Un resultado positivo temprano permite realizar un tratamiento adecuado y poner en marcha las medidas de aislamiento necesarias, mientras que un resultado negativo temprano permite evitar tratamientos innecesarios e identificar la verdadera causa de los síntomas.