

LO DIFICIL DEL *Clostridium difficile*

DIAGNOSTICO : UNA PUESTA AL DIA



Incremento
en el número
y severidad de
casos

Estrategias de
control de
infecciones:
aislamiento
preventivo y
lavado de
manos

Pruebas
diagnósticas:
rápidas,
exactas,
sensibles,
específicas,
con buen
valor
predictivo

Dra Jorgelina Smayevsky
Jefe Laboratorio Microbiología CEMIC
Profesora Asociada Microbiología IUC



No tengo conflicto de intereses

AGENDA

- Aspectos microbiológicos
- Patogenia
- Métodos de estudio
- Algoritmos
- Resultados comparativos
- Aparición de cepas hipervirulentas de *C difficile* (toxina binaria)
- Conclusiones



C. difficile : aspectos microbiológicos

- ▶ Es un bacilo gram-positivo esporulado
- ▶ Anaerobio obligado
- ▶ Forma parte de la microbiota gastrointestinal
 - 1-3% en adultos sanos
 - 70% en chicos menores de 12 meses
 - Algunas cepas producen toxinas
- ▶ Las cepas toxigénicas producen la infección por *C difficile* (EACD)
- ▶ CDI puede ser leve, moderada, severa e incluso mortal

C. difficile: patogenia

- Diarrea nosocomial asociada a antibióticos
- Por ser una bacteria formadora de esporos puede persistir en el ambiente hasta más de 5 meses y es difícil de eliminar
- La patogenicidad está debida a la producción de toxinas
- Dosis infectiva mínima: < 10 esporos

GENETICA DE *Clostridium difficile*

Rodriguez Pardo D et al, Enf Infec Microbiol Clin. 31, 254, 2013

- Cepas de *C. difficile*, que no producen toxinas NO son toxigénicas.
- Cepas de *C. difficile* que poseen los genes *tcdA* y *tcdB*, que codifican la expresión de la toxina A y B, son toxigénicas.
- Estos genes se encuentran ubicados en una región del cromosoma llamada locus de patogenicidad (PaLoc), el cual contiene también 3 genes accesorios: *tcdR*, *tcdC* y *tcdE*.
- El gen *tcdR* ha demostrado tener la capacidad de modular positivamente la expresión de los genes de las toxinas, mientras que *tcdC* modula negativamente tal expresión, al interferir con la capacidad de la ARN polimerasa de reconocer los promotores de *tcdA* y *tcdB* y el *tcdE* codifica toxina que induce formación de poros en la membrana citoplasmática



Patogenesis

Toxina binaria: afecta actina citoesqueleto, incrementa la formación de protusiones mayor adherencia de bacterias

C. difficile

Pseudomembrane

Toxins

Monocyte

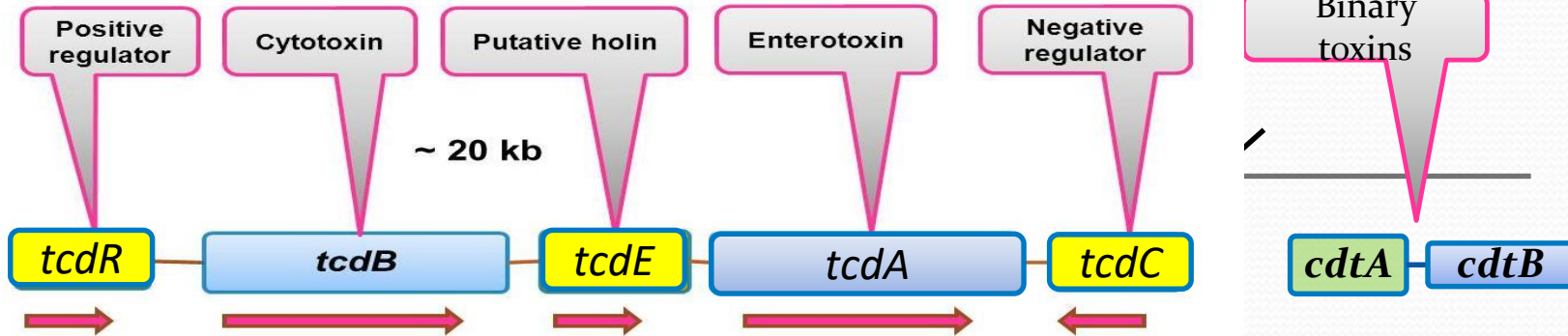
Neutrophil



Toxina A: Enterotoxina, induce RI
Toxina B: citotóxina, degrada células epiteliales: colitis, formación pseudomembrana, diarrea

PaLoc

CdtLoc

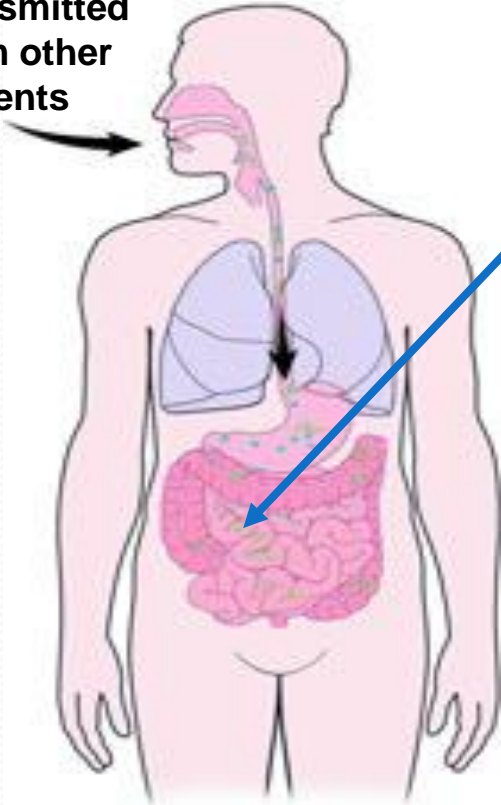


C. difficile : vías de transmisión

- Fecal – oral
 - A través de las manos del personal de salud
 - Superficies contaminadas
- Transmisión horizontal en unidades cerradas
- Reservorios:
 - Humano: personas colonizadas o infectadas
 - Ambiente contaminado

CDI: Pathogenesis

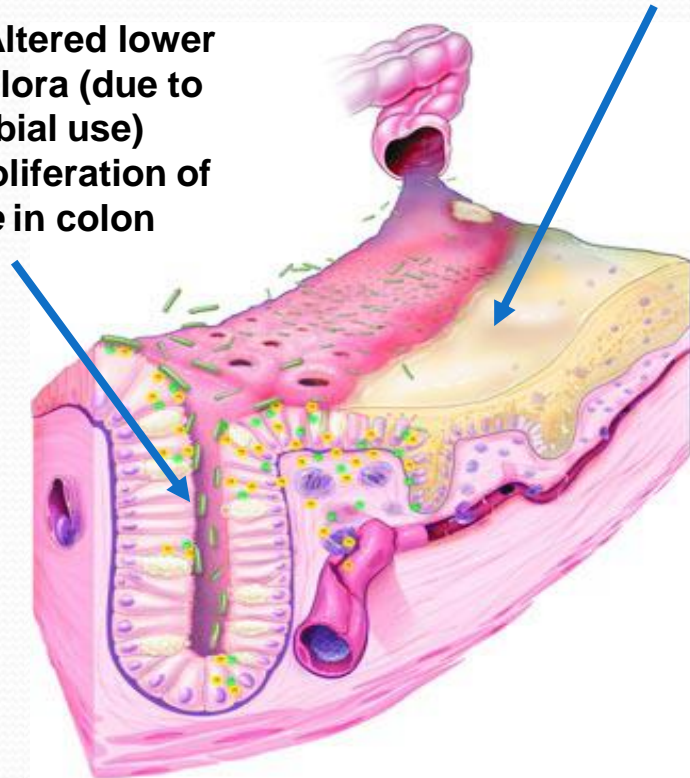
Step 1-
Ingestion
of spores
transmitted
from other
patients



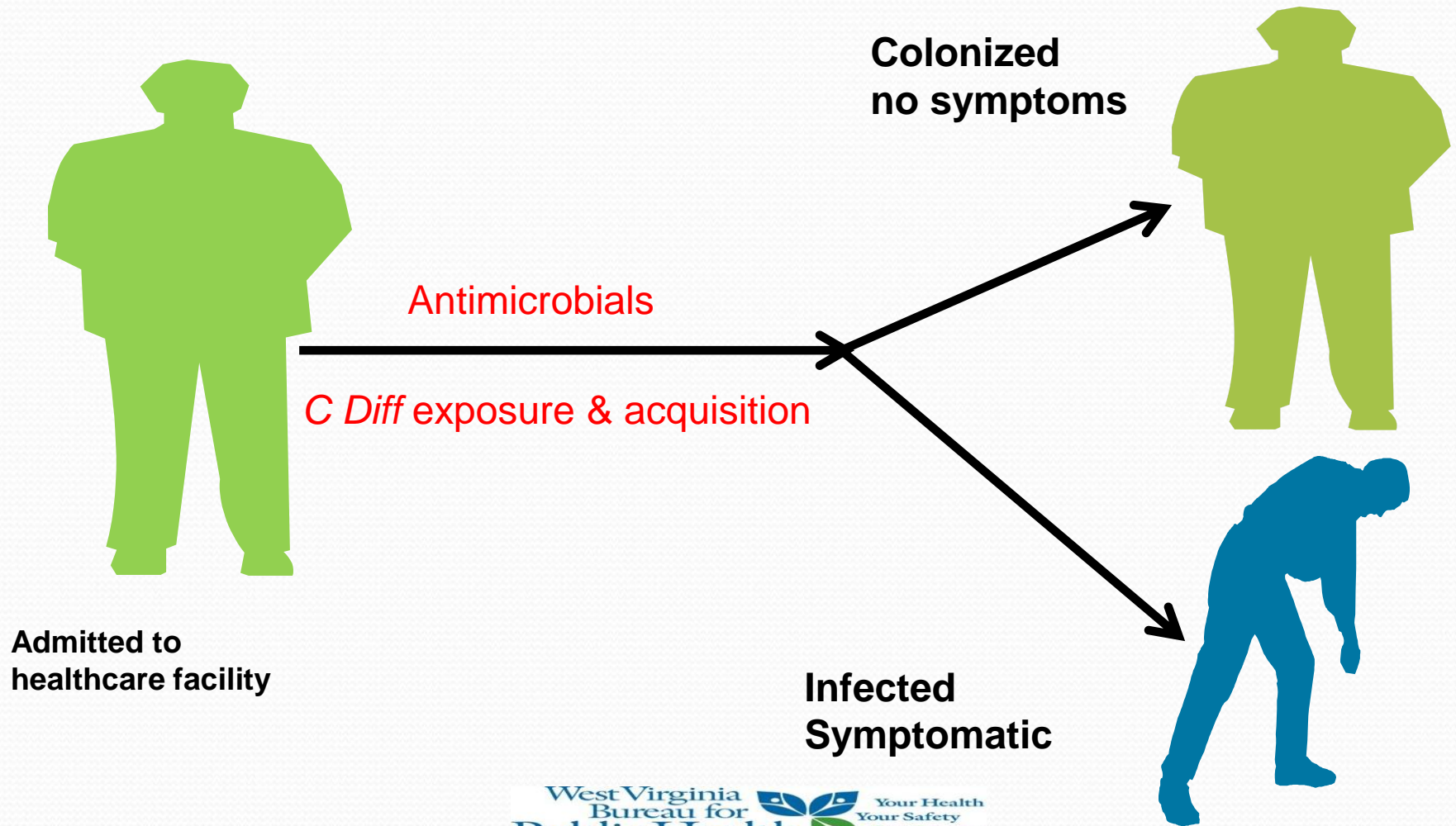
Step 2- Germination
into growing
(vegetative) form

Step 3 - Altered lower
intestine flora (due to
antimicrobial use)
allows proliferation of
C. difficile in colon

Step 4 . Toxin B & A
production leads to colon
damage +/- pseudomembrane



CDI Pathogenesis



Admitted to
healthcare facility

Antimicrobials

C Diff exposure & acquisition

Colonized
no symptoms

Infected
Symptomatic

CDI: Métodos

Test		VENTAJAS	DESVENTAJAS
TOXINAS	Enzyme immunoensayo (EIA)	<ul style="list-style-type: none"> • Detecta toxina A y/o B o ambas A y B • Rápido (horas) 	Menor sensibilidad 63-94%
	Citotoxicidad en cultivo celular	100 % específico, 60-70 % sensibilidad	<ul style="list-style-type: none"> -Detecta toxina B -Experiencia - Costoso -24-48 hours
MICROORGANISMO	Glutamate Dehidrogenasa	Rápido, sensible , buen método de screening	Baja especificidad, requiere confirmación de presencia de toxina
	PCR	Rápido, sensible, detecta presencia del gen de la toxina	Costoso Equipamiento
	Cultivo de materia fecal	Muy sensible , requiere confirmar presencia de toxina en el aislado	Puede dar falsos positivos si no se realiza detección de toxina , trabajoso, 48-96 horas

COMPARACION DE METODOS

D. Rodríguez-Pardo et al / *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013;**31**(4):254-263

257

Tabla 1
Aproximaciones metodológicas al diagnóstico de la infección por *Clostridium difficile* toxigénico

Método	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Tiempo de respuesta	Observaciones
<i>Estudio de citotoxicidad</i>	65-85	> 97	2-3 días	Se necesita personal experimentado. Resultados subjetivos
<i>Cultivo</i>	> 90	80-90	2-3 días	No implica que la cepa sea toxigénica
<i>Cultivo + estudio de citotoxicidad</i>	> 90	> 95	3-4 días	Excesivamente laborioso y lento
<i>Enzimoimmunoensayos</i>				
Detección de glutamato deshidrogenasa	60-90	85-95	Minutos	Solo indica la presencia de <i>C. difficile</i> . Alto valor predictivo negativo. Se precisa completar con estudios posteriores
Detección de toxinas (A y/o B)	50-85	90-95	Minutos	Si bien son técnicas rápidas, en general presentan baja sensibilidad. Especialmente si solo se detecta la toxina A
Detección de ácidos nucleicos	> 90	> 97	Horas	Si bien son costosas, diferentes estudios de coste-beneficio en el global del coste por infección por <i>C. difficile</i> pueden justificar su aplicación

Valores obtenidos de diferentes trabajos de revisión: Punnik et al.¹¹, Carroll y Bartlett¹², Shetty et al.³⁰ y Schmidt y Gilligan³¹.

Best Strategy for *C. difficile* Testing

- ▶ For clinical use: two-step testing uses initially EIA detection of GDH for screening followed by cytotoxicity assay or toxigenic culture for confirmation or PCR
- ▶ Gold standard is stool culture followed by toxigenic culture assay
- ▶ Toxin is very unstable, degrades at room temperature, and undetectable within 2 hours (false negative results)

SHEA, 2012

Métodos moleculares

Made in house

GEN Xpert

BD MAX

Light Cyclor *C difficile*

FILMARRAY

PCR REAL TIME (PCR-RT) IMPLEMENTADA



Procesamiento



P
A
S
O
S

P
C
R

Procesamiento MF y adición de control de extracción

Extracción de ADN de MF en MagnaPure

PCR real time

Clostridium difficile: Comparación de métodos Experiencia en CEMIC

- Se analizaron 100 muestras consecutivas de materia fecal diarreicas de pacientes internados con sospecha de EACD.
- Las muestras se procesaron de acuerdo al siguiente esquema:
- Inmunocromatografía (IA) para detección de GDH y toxinas A y B
- PCR-RT directa de la materia fecal
- Cultivo en anaerobiosis, previo shock etanólico, en el medio CHROMagar™*C.difficile*, identificación de *C difficile* por MALDI TOF y detección de toxina por IA y PCR.

Clostridium difficile: Comparación de métodos

N	IA	PCR-RT	CULTIVO	IA DEL CULTIVO	N/TOTAL	(%)
6	Ag + Tx +	Positivo	Positivo	Ag + Tx +	6/100	6%
6	Ag + Tx -	Positivo	Positivo	Ag + Tx +	6/100	6%
9	Ag + Tx -	Negativo	Positivo	Ag + Tx -	9/100	9%
78	Ag - Tx -	Negativo	Negativo	Ag - Tx -	78/100	78%
1	Ag - Tx -	Positivo	Positivo	Ag + Tx +	1/100	1%

Clostridium difficile: Comparación de métodos

- 15 muestras fueron Ag + y Tx- procesadas por IA (Ag+Tx-) de las cuales , sólo 6 dieron PCR + y cultivo toxigénico positivo y en 9 se aisló *C.difficile* no toxigénico.
- Por cultivo se aisló *C.difficile* toxigénico en un 13% coincidente en un 100 % con la PCR.
- Una muestra fue Ag - y Tx- con cultivo toxigénico + y PCR +
- Todas las muestras negativas por cultivo también lo fueron por PCR-RT y IA.

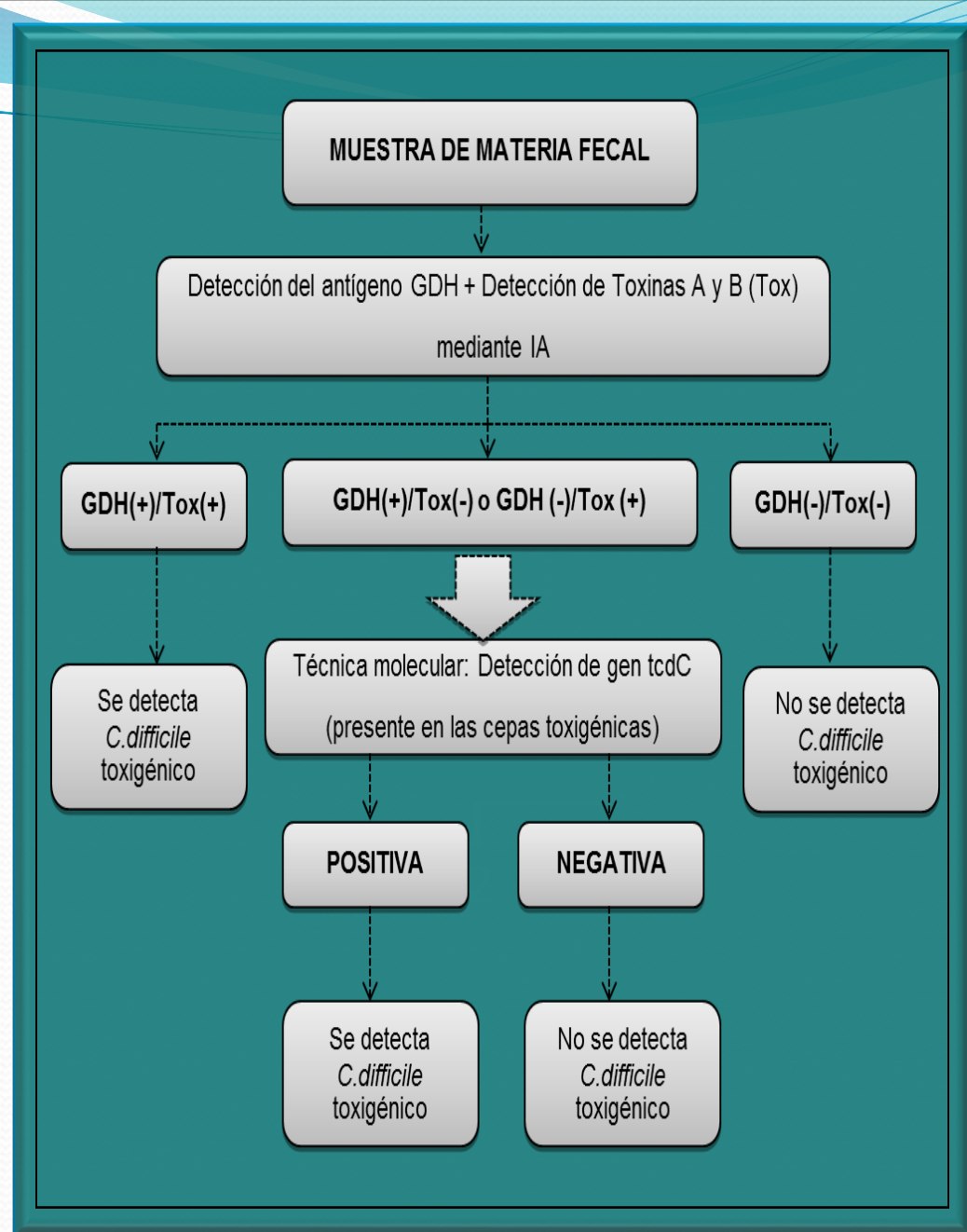
Clostridium difficile: Comparación de métodos

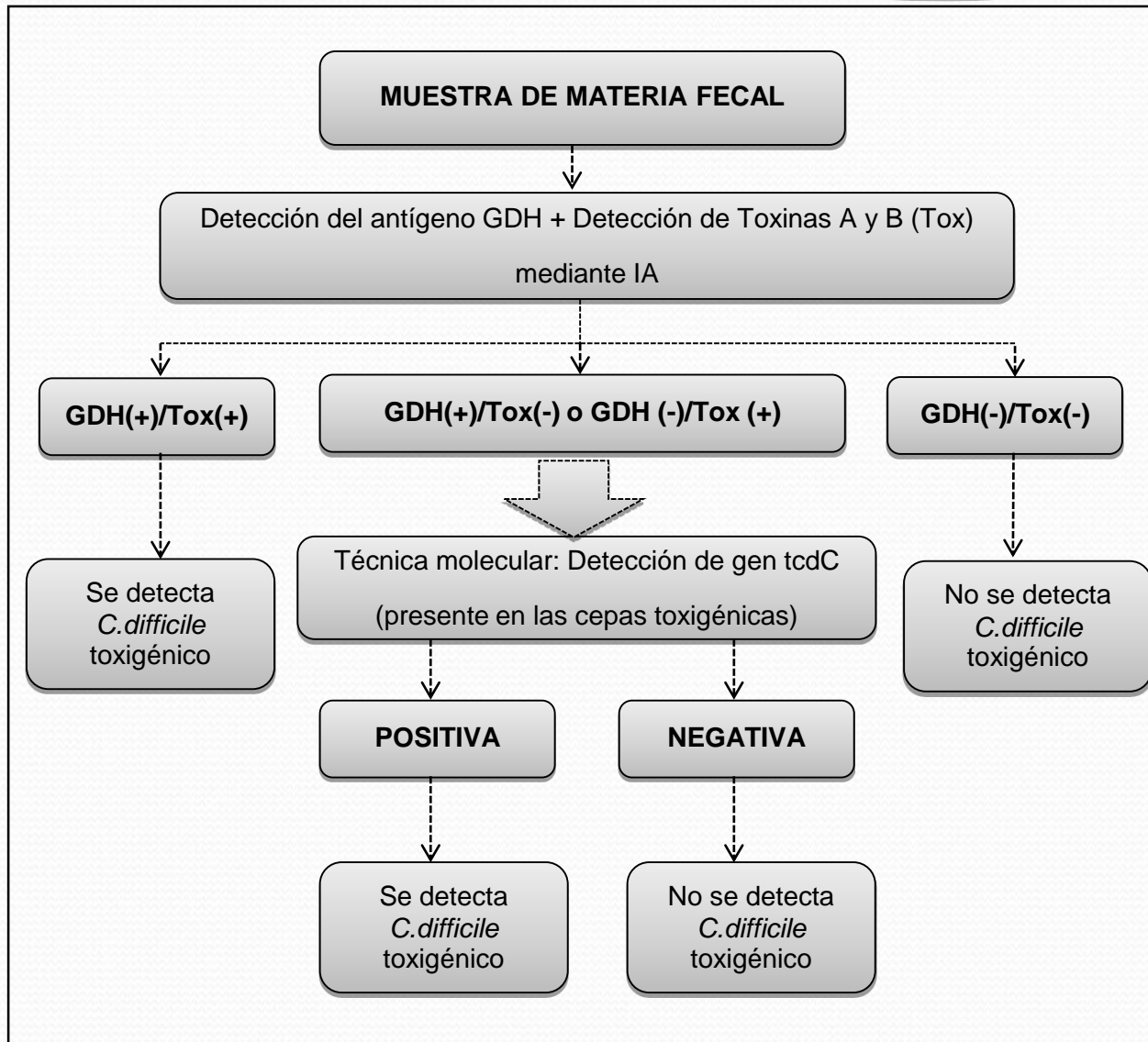
ENSAYO	SENSIBILIDAD (%)	ESPECIFICIDAD (%)	VPP (%)	VPN (%)
PCR-RT	100	100	100	100
INMUNOCROMATOGRAFÍA (AI)	95	87,5	27,3	95

Comparación de métodos

CONCLUSIONES

- La metodología molecular posee una S y E superior a la IA.
- Sin embargo, dado el elevado VPN de la IA, utilidad como método de screening es aceptable.
- Pero frente resultados inconclusos (**Ag+Tx-**) recomendamos la realización de un método molecular para llegar al diagnóstico de certeza.





Changing Epidemiology

Current epidemic strain of *C. difficile*

- BI/NAP1/027, toxinotype III
 - Historically uncommon – epidemic since 2000
- More resistant to fluoroquinolones
- Produces extra toxin called binary toxin
- More virulent Yakob L et al, 2015
 - Increased toxin A and B production
 - Change in binding domain of toxin B → increase adherence to the gut wall
 - Increased sporulation → increase survival
- Causes more cases and more severe disease even at low risk populations

Carter G et al, Gut Microbes, 1,58,2010

Review article

Clinical approach to severe *Clostridium difficile* infection: Update for the hospital practitioner^{☆,☆☆}

Chaitanya Pant^a, Thomas J. Sferra^{b,*}, Abhishek Deshpande^c, Anil Minocha^d

^a Department of Pediatrics, The University of Oklahoma Health Sciences Center, 1200 N. Phillips Avenue, Oklahoma City, OK 73104, United States

^b Department of Pediatrics, Department of Biochemistry and Molecular Biology, The University of Oklahoma Health Sciences Center, 1200 N. Phillips Avenue, Oklahoma City, OK 73104, United States

^c Neurological Institute, Cleveland Clinic, 9500 Euclid Avenue, Cleveland, OH 44195, United States

^d Department of Internal Medicine, Louisiana State University Health Sciences Center, 1501 King's Highway, Shreveport, LA 73103, United States

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 March 2011

Received in revised form 17 April 2011

Accepted 26 April 2011

Available online 31 May 2011

Keywords:

Clostridium difficile

Fulminant colitis

Metronidazole

Vancomycin

ABSTRACT

The rising incidence of *Clostridium difficile* (*C. difficile*) infection or CDI is now a problem of pandemic proportions. The NAP1 hypervirulent strain of *C. difficile* is responsible for a majority of recent epidemics and the widespread use of fluoroquinolone antibiotics may have facilitated the selective proliferation of this

The NAP1 strain also is more likely to cause severe and fulminant colitis characterized by marked leukocytosis, renal failure, hemodynamic instability, and toxic megacolon.

fulminant colitis. When applied to select patients in a judicious and timely fashion, surgery can be a life-saving intervention. In addition to these therapeutic approaches, several investigational treatments including novel antibiotics, fecal bacteriotherapy and immunotherapy have shown promise in the care of patients with severe CDI.

Predicting Recurrence of *C. difficile* Colitis Using Bacterial Virulence Factors: Binary Toxin Is the Key

David B. Stewart · Arthur Berg · John Hegarty

Received: 20 April 2012 / Accepted: 11 October 2012 / Published online: 20 October 2012
© 2012 The Society for Surgery of the Alimentary Tract

Abstract

Background Recurrent *Clostridium difficile* colitis is common, yet the ability to predict recurrence is poorly developed. **Methods** Patients ≥ 18 years of age treated at our institution for *C. difficile* of any severity were consecutively enrolled. *C. difficile* colitis was defined as symptoms of colitis with a positive PCR stool test. Each bacterial isolate was studied for

Binary toxin gene is a predictor of recurrence infection. Its presence may require longer antibiotic regimens in an effort to lower already elevated recurrence rates

outpatients. The presence of a binary toxin gene was the single virulence factor independently associated with recurrence ($p=0.02$). The combination of a *tcdC* mutation with binary toxin gene resulted in the highest odds of recurrence (OR, 5.3; 95 % CI, 3.52–6.09).

Conclusion Binary toxin gene is a predictor of recurrent infection. Its presence may require longer antibiotic regimens in an effort to lower already elevated recurrence rates.

Dos casos de aislamientos de *Clostridium difficile* productor de toxina hipervirulenta en CEMIC.

Primer caso: Paciente con leucemia internada en la Unidad de Transplante de Médula Ósea (Febrero 2017).

Segundo caso: Segundo transplante renal, donante Chagas +, reactivación de Chagas. Ambas pacientes resolvieron favorablemente de esta infección (Abril 2017).

La diseminación de este microorganismo es mayor que en las cepas productoras de toxina A y/o B.

La toxina hipervirulenta presenta una delección en el gen *tcdC* que le impide regular la expresión de los genes, lo que trae como consecuencia la hiperproducción toxigénica. La detección de la misma se realiza exclusivamente por métodos moleculares.

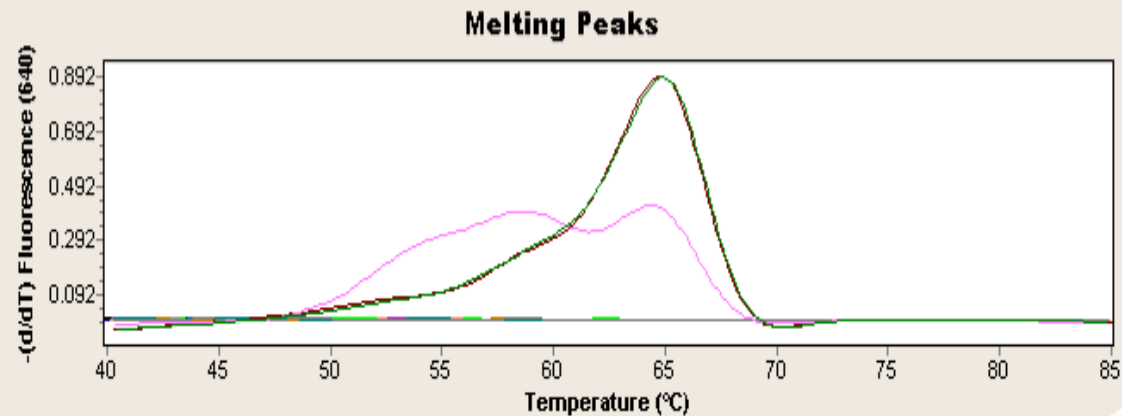
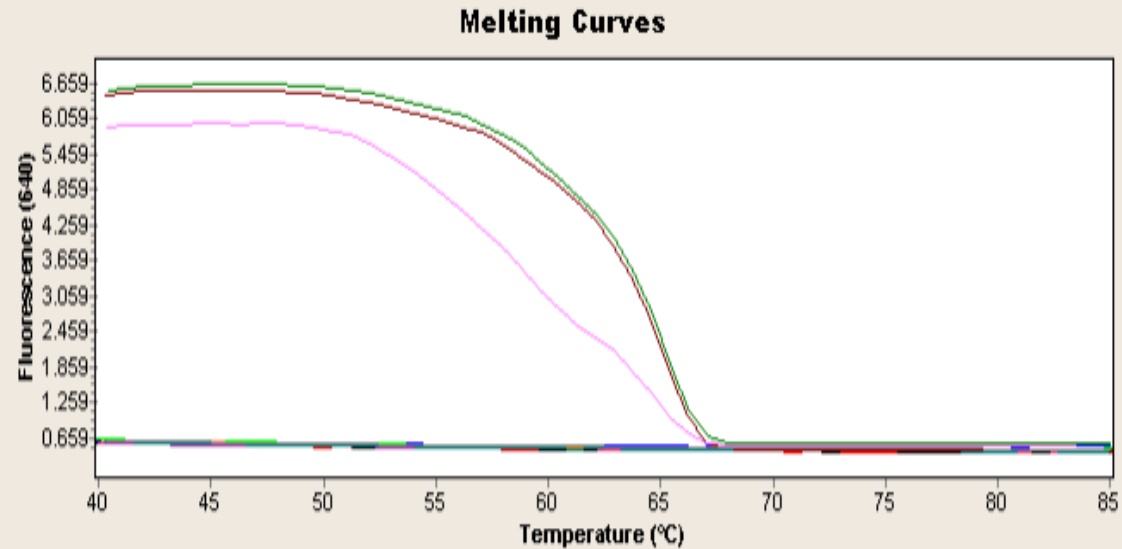
Ambos aislamientos fueron portadores del CdtLoc que contiene los genes *cdtA* y *cdtB* (toxina binaria)

Dr Diego Ruggeri, Instituto Malbrán

Clostridium difficile: Comparación de métodos

- En dos de las 13 muestras estudiadas encontramos curvas de melting compatibles con *C. difficile* hipervirulentas

Samples			
include	Color	Pos	Name
<input checked="" type="checkbox"/>	Blue	1	CN
<input checked="" type="checkbox"/>	Green	2	CD50
<input checked="" type="checkbox"/>	Red	3	CD51
<input checked="" type="checkbox"/>	Black	4	CD52
<input checked="" type="checkbox"/>	Pink	5	CD53
<input checked="" type="checkbox"/>	Dark Green	6	CD54
<input checked="" type="checkbox"/>	Dark Blue	7	CD55
<input checked="" type="checkbox"/>	Olive	8	CD56
<input checked="" type="checkbox"/>	Orange	9	CD57
<input checked="" type="checkbox"/>	Purple	10	CD65
<input checked="" type="checkbox"/>	Gold	11	CD66
<input checked="" type="checkbox"/>	Teal	12	CD67
<input checked="" type="checkbox"/>	Dark Red	13	CD68
<input checked="" type="checkbox"/>	Grey	14	CD62
<input checked="" type="checkbox"/>	Pink	15	CP
<input checked="" type="checkbox"/>	Light Green	16	CP del



Detección de toxina binaria de aislamientos de *C difficile* en Buenos Aires N Ríos Osorio et al

- 31 aislamientos de *C difficile* aislados de materia fecal de pacientes con ICD
- Todos GDH +
- 13 Cultivos Tox + A/B (tcdA/tcdB)
- 4 pacientes con toxina binaria productores de CDT, un solo paciente Tx renal recidiva y muerte por CDI.
- Un solo aislamiento ST1 B1/NAP1/027

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES DE LA SHEA

- Cumplimiento programa control de infecciones
- Tratamiento inicial de CDI de acuerdo a las guías
- Solamente procesar heces no formes
- No realizar estudios para prueba de cura

CEMIC

MUCHAS GRACIAS POR LA ATENCION



J Smayevsky

Agradecimiento al Dr Diego Ruggeri