



UNIVERSIDAD MAYOR

Estudio comparativo de medios de cultivo (Agar sangre anaerobio BBL, CHROMagar™ *C. difficile*, Clostridium difficile Selective Agar (CDSA) BBL) para el aislamiento de *C.difficile* desde muestra clínicas.

Fabiola Fernández. TM.PhD.

Sebastián Baquedano

Annette Trombert Bqca. PhD.

Victor Silva TM.PhD.

Antecedentes

Clostridium difficile (CD) es un bacilo Gram positivo, anaerobio estricto y formador de esporas, que ejerce su patogenicidad a través de la producción de toxinas¹. La colonización del intestino grueso en humanos genera una Infección Asociada a *Clostridium difficile* (IACD), la que puede manifestarse en el paciente desde una colonización asintomática a diarrea, colitis, colitis pseudomembranosa e incluso la muerte^{1,2}. Cepas productoras de toxinas como no productoras pueden colonizar humanos como otros mamíferos, pero sólo las cepas productoras de toxinas están asociadas a la enfermedad. Entre los factores predisponentes el uso de antibióticos de amplio espectro, hospitalización prolongada, edad avanzada y otras enfermedades gastrointestinales aumentan el riesgo de infección a causa de este microorganismo³.

Para el diagnóstico de IACD existe una amplia variedad de ensayos que se utilizan en forma individual o en combinación como un algoritmo de detección rápida, con elevada sensibilidad y especificidad. Sin embargo, es fundamental la combinación de criterios clínicos y de laboratorio. El estudio microbiológico debe solicitarse sólo si el paciente presenta deposiciones diarreicas².

Si bien existen diversas pruebas para el diagnóstico de CD, no todas están al alcance de los laboratorios y el tiempo de respuesta puede variar de dos a tres días. Entre ellos están el **Ensayo de Citotoxicidad Celular (Cell Cytotoxicity Neutralization Assay, CCNA)**, el cual se consideró por mucho tiempo el *gold standard* para el diagnóstico de *C. difficile*. **Cultivo Toxigénico (CT), Glutamato Deshidrogenasa (GDH), Enzimoimmunoensayos (EIAs) Inmunocromatografía, Amplificación de Ácidos Nucleicos (Nucleic Acid Amplification Tests, NAATs)**⁴.

Con respecto al cultivo microbiológico de CD, los medios de cultivo que se utilizan en la actualidad incluyen tanto a medios convencionales no selectivos, como selectivos y diferenciadores, los cuales son esenciales en el diagnóstico microbiológico de las IACD, principalmente en lo que respecta a la tipificación de cepas sospechosas de CD y posteriores estudios de susceptibilidad antibiótica³.

Muchos medios selectivos que contienen antibióticos tales como la cicloserina o cefoxitina están disponibles comercialmente. Por lo general, se derivan del medio de CCFA (base yema de huevo, fructosa con cicloserina y cefoxitina) descrito en 1979⁵. A pesar del uso de antibióticos, la sensibilidad de los medios de cultivo es relativamente pobre, y el shock con etanol y/o térmico han sido propuestos como métodos para la selección de las esporas y la optimización de la recuperación de CD tanto a partir de muestras clínicas como del ambiente⁵.

El objetivo de este estudio fue evaluar el rendimiento del agar CHROMagar™ *C. difficile*, un nuevo medio cromogénico para el aislamiento de *C. difficile* en 24 h/48h, en comparación con

otros dos medios: agar sangre anaerobio(ASA) (Anaerobe Agar + 5% Sheep Blood BD BBL™) y *Clostridium difficile* Selective Agar (CDSA, BD BBL™), a partir de muestras de deposición de pacientes con sospecha de IACD.

Metodología

El siguiente estudio fue realizado con 91 muestras de deposiciones provenientes de pacientes con sospecha de IACD, provenientes de dos centros hospitalarios chilenos. Las muestras fueron almacenadas a 4°C, hasta su envío mediante cadena de frío al Laboratorio de Investigación de la Escuela de Tecnología Médica de la Universidad Mayor, sede Huechuraba, Santiago.

Posterior a la recepción de la muestra, se evaluó su consistencia para su procesamiento. En aquellos casos en que la muestra de deposición estaba sólida, se diluyó en 2 mL de agua destilada estéril y se homogeneizó.

Las muestras fueron procesadas de dos maneras diferentes, una parte de la muestra fue sembrada directamente en los medios de cultivo y la otra parte fue pretratada con shock etanólico posterior a eso fueron sembradas en los tres medios de cultivos, uno enriquecido no selectivo **ASA**, BD BBL™ y dos selectivos-diferenciadores CDSA y CHROMagar™ (*Clostridium difficile*). El procedimiento del shock etanólico (EtOH) se basa en la incubación por 30 minutos a temperatura ambiente de una solución homogeneizada de 1 mL total, con 500 µL de la muestra de deposición más 500 µL de etanol al 100%.

Posterior a las 24 horas de incubación a 37°C en anaerobiosis al 5% CO₂ (Anaerocult®A, Merck) se efectuó la primera lectura de las placas de cultivo verificando si hubo crecimiento bacteriano sospechoso de CD o no, acorde a las instrucciones del proveedor. Si no hubo crecimiento las placas fueron reincubadas en anaerobiosis al 5% CO₂, siendo revisadas a las 48h y 72h. Las colonias sospechosas fueron repicadas en ASA para la obtención de cultivo puro y así poder realizar las pruebas confirmatorias de *C. difficile*, mediante latex (Oxoid *C.difficile*) y API 20A.

Como control de calidad se emplearon 3 cepas ATCC de *Clostridium difficile* (ATCC 9689; ATCC 700057; ATCC 43255)

Resultados

Crecimiento de colonias sospechosas de CD fue obtenido en un porcentaje mayor al 20% de las muestras no sometidas a SE, este porcentaje disminuyó considerablemente al someterlas al SE (tabla 1).

Al comparar los dos medios selectivos CDSA y CROMagar™, se determinó que el shock etanólico permite reducir la cantidad de microbiota acompañante que puede interferir en la detección de las colonias sospechosas. Sin embargo el medio CDSA, el cual permite la identificación de CD, mediante la utilización del manitol contenido en el medio otorgándole un color amarillo a CD, también seleccionó cepas de *Clostridium* no- *difficile*, lo cual redujo la selectividad desde el 36% al 9% cuando se realizó la identificación de las cepas sospechosas. CROMagar™ permitió detectar con mayor selectividad y especificidad colonias de CD. Sin embargo es importante destacar que en una primera lectura de las placas se realizó con UV a 305nm, debido a la no disponibilidad de la lámpara recomendada por el proveedor la cual emite a 365 nm. Esto provocó que la primera interpretación sea dificultosa ya que la fluorescencia emitida no permitió identificar fácilmente las colonias sospechosas de CD. Posteriormente se realizó la lectura con la lámpara recomendada por proveedor y se evidenció la factibilidad de identificar las colonias sospechosas. El CROMagar™ permitió detectar un 13% de muestras positivas con aislamiento de cepas de CD, de los cuales el 75% correspondió a cepas toxigénicas, lo cual fue detectado por el test "C. DIFF QUICK CHECK COMPLETE"® test (TechLab).

Tabla 1. Porcentaje de muestras con sospecha de *C. difficile* analizadas por medios de cultivos no selectivos y selectivos diferenciadores.

Medios de cultivo ¹	% Muestras sospechosas (s-SE) ²	% Muestras sospechosas (c-SE) ³ /	% de muestras positivas <i>C. difficile</i> ⁴	%Especificidad ⁵
ASA	53	36	9/25	25
CDSA	42	24	9/38	38
CHROMagar™	20	14	13/93	93

¹,ASA: agar sangre anaerobio; CDSA: *Clostridium difficile* Selective Agar; CHROMagar™: medio cromogénico. ² s-SE: sin shock etanólico; ³ c-SE: sin shock etanólico; ⁴, positividad mediante pruebas confirmatorias; ⁵, especificidad: (muestras positivas para CD/total de muestras sospechosas*100)

Conclusión

Diagnosticar eficientemente la presencia de CD, es de vital importancia para evitar IACD en los servicios hospitalarios. A pesar de que el diagnóstico de rutina en los laboratorios clínicos en la actualidad se realiza mediante test inmunocromatográficos existe un porcentaje de muestras que resultan falsos negativos debido a la labilidad de las toxinas detectadas por los test que se comercializan y emplean hoy en día. Aislar las cepas en medios que cuenten con una alta especificidad y sensibilidad es de gran importancia en clínica, ya que permitiría poder identificar con mayor precisión aquellos pacientes que porten y que estén cursando con el cuadro infeccioso por CD. Nuestro estudio permitió determinar que el medio CHROMagar™ *Clostridium difficile* a las 24 horas detecta con mayor sensibilidad y especificidad cepas de *Clostridium difficile*. Siendo un medio de cultivo factible de usar en rutina en los laboratorios clínicos. Sin embargo, cabe destacar que la lectura de las placas debe realizarse con luz UV a 365nm ya que leer a otra longitud de onda disminuye la especificidad y sensibilidad del medio.

Referencias

- 1.- Vedantam G, Clark A, Chu M, Mcquade R, Mallazzi M, Viswanathan VK. *Clostridium difficile* infection contributions to disease establishment and host response. *Landes bioscience*. 2012; (April): 121-134.
- 2.- Guía *Clostridium difficile*: confirmación Instituto Salud Pública de Chile, 2012.
- 3.- Ashwin N. Ananthakrishnan. *Clostridium difficile* infection: epidemiology, risk factors and management. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol*. 2011; 8(1): 17-26.
- 4.- Lübert C, John E, von Müller L. *Clostridium difficile* infection: guideline-based diagnosis and treatment. *Dtsch. Arztebl. Int*. 2014; 111(43): 723-731.
- 5.- Eckert C, Burghoffer B, Lalande V, Barbut F. Evaluation of the Chromogenic Agar chromoID *Clostridium difficile*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013; 51(3): 1002-1004.