

COMPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO CHROMagar™ C.difficile CON EL AGAR BRUCELLA SUPLEMENTADO CON LEVADURA, HEMINA, VITAMINA K, SANGRE Y CEFOXITINA Y POSTERIOR IDENTIFICACIÓN POR MALDI-TOF.

Ruggeri D¹, Legaria MC², Castelli E¹, D'Angiolo G¹, Farace MI¹

1-INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbran", Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. druggeri@anlis.gov.ar

2- Hospital General de Agudos Dr. E. Tornú .

INTRODUCCIÓN

Clostridium difficile es un bacilo gram positivo anaerobio, esporulado, principal agente causal de la diarrea asociada al uso de antimicrobianos de origen nosocomial. Sus principales factores de virulencia son la toxina A (TcdA, enterotoxina) y la toxina B (TcdB, citotoxina), codificadas por los genes *tcdA* y *tcdB*, respectivamente. Las cepas de *C. difficile* pueden ser no toxigénicas (A⁻B⁻) y no causar enfermedad o pueden ser toxigénicas y capaces de producir diferentes grados de infección: diarrea leve, moderada, grave, colitis, colitis pseudomembranosa, megacolon tóxico, sepsis y muerte. Tanto las cepas productoras de ambas toxinas (A⁺B⁺) como las productoras de la toxina B solamente (A⁻B⁺) pueden ser responsables de la infección causada por *C. difficile* (ICD) y tienen el potencial de generar cuadros recurrentes y brotes intrahospitalarios. Una tercer toxina, CDT, codificada por los genes *cdtA/cdtB*, se ha detectado también en cepas A⁻B⁻, A⁺B⁺ y A⁻B⁺ y es motivo de investigación debido a los brotes y gravedad de los casos producidos por las cepas A⁺B⁺CDT⁺ hipervirulentas NAP1/BI/027. El diagnóstico de la ICD debería ser rápido y confiable, sin embargo continúa provocando controversias. Debido a que los métodos de EIE para la detección de GDH son inespecíficos, los que detectan las toxinas A+B presentan baja sensibilidad y el cultivo toxigénico (patrón de oro) demanda mucho tiempo y es muy laborioso, decidimos evaluar este último utilizando un agar cromogénico (CHROMagar™ C.difficile), la identificación de *C. difficile* por espectrometría de masas (MALDI-TOF) y la detección del gen *tcdB* por PCR.

OBJETIVOS

- Evaluar el desempeño del medio CHROMagar™ C.difficile para la recuperación de *Clostridium difficile* de muestras de materia fecal de pacientes con sospecha de ICD.
- Evaluar la selectividad del medio CHROMagar™ C.difficile para la recuperación de cepas de *Clostridium spp.* diferentes de *Clostridium difficile*.
- Identificar los aislamientos obtenidos por MALDI-TOF.
- Detectar la presencia del gen *tcdB* por PCR en las cepas de *C. difficile*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se incluyeron 22 muestras de materia fecal de pacientes con sospecha de ICD positivas por cultivo toxigénico. Cada muestra se homogeneizó y se sometió a un shock etanólico. Luego se inocularon alícuotas iguales paralelamente en: agar Brucella suplementado con 5% de sangre de oveja, vit K (10 mg/l) y hemina (5mg/l) con (ACXT) y sin el agregado de 16 mg/l de cefoxitina (AB) y CHROMagar™ C.difficile. Todos los medios (AB, ACXT y CHROMagar™ C.difficile) se incubaron en anaerobiosis a 36-37°C. Al cabo de 16, 24 y 48 h se evaluó el desarrollo y la fluorescencia de los cultivos con lámpara de UV de 365 nm en el CHROMagar™ C.difficile, mientras que el AB y el ACXT, se examinaron a las 24 h y 48 h. Además se evaluó el desarrollo de cepas pertenecientes a especies de *Clostridium* diferentes de *C. difficile* en el AB y en el CHROMagar™ C.difficile. Todos los aislamientos se identificaron con MALDI-TOF Microflex (Bruker-Daltonics) y se realizó una PCR convencional para detección del gen *tcdB* en las cepas de *C. difficile*.

RESULTADOS

C. difficile se recuperó de las 22 muestras de MF en todos los medios. Se observó escaso o nulo desarrollo de colonias incoloras en el CHROMagar™ C.difficile a las 16h. en algunas muestras solo detectables por la fluorescencia bajo la luz UV) y a las 24 h. en todas las muestras. En el AB y en el ACXT se observó desarrollo a partir de las 48 h. Se detectó fluorescencia azul en todos los aislamientos de *C. difficile* en el CHROMagar™ C.difficile a las 24 h y 48 h. (Tabla 1)

En dos de las muestras se recuperó *Clostridium glycolicum* a partir del CHROMagar™ C.difficile, y ambas mostraron fluorescencia bajo la luz UV, pero su tamaño fue mucho mas chico que las colonias de *C.difficile* en este medio y su desarrollo fue muy escaso a las 24hs. En el AB desarrollaron también otras especies de *Clostridium*: *C. perfringens* (5) *C. clostridioforme* (2), *C. bolteae* (1), *C. hathewayi* (2), *Flavonifractor plautii* (1), pero ninguno desarrolló en el ACXT ni en el CHROMagar™ C.difficile.

Ninguna de las cepas: *C. clostridioforme* (3), *C. bolteae* (3), *C. hathewayi* (3), *C. butyricum* (1), *C. tertium* (2), *Flavonifractor plautii* (3), *C. ramosum* (1) y *C. sordelli* (1) desarrollaron en el CHROMagar™ C.difficile, pero sí en el AB.

Todas las especies fueron identificadas con el MALDI-TOF utilizando la base de datos comercial Biotyper 3.1 con un score >2.

Todas las cepas de *C. difficile* dieron positiva la PCR para la detección del gen *tcdB*.

ACXT vs CHROMagar™ C.difficile a las 24hs sin UV



Tabla 1. Tiempo de incubación vs desarrollo

| Horas | 16 | 24 | 48 |
|-------------------------|-----|----|----|
| CHROMagar™ C. difficile | +/- | + | + |
| ACXT/AB | - | - | + |

Fluorescencia de *C. difficile* en el medio CHROMagar™ C.difficile a UV



CONCLUSIONES

- ✓ El CHROMagar™ C.difficile fue un excelente medio de cultivo para la detección rápida de *C. difficile*.
- ✓ Este medio permitió disponer de colonias para la identificación de *C. difficile* por MALDI-TOF y la detección por PCR del gen *tcdB* a las 24 h. de incubación.
- ✓ La fluorescencia al UV resultó de gran utilidad para la sospecha temprana de *C. difficile*.
- ✓ *Clostridium glycolicum* fue la única especie no-*C. difficile* evaluada que arrojó un resultado falso positivo en el CHROMagar™ C.difficile pero las colonias fueron distintas a las de *C. difficile* y el desarrollo fue muy escaso a las 24hs. de incubación por lo tanto no generaría ningún problema ni confusión para la correcta identificación de *C. difficile* en este medio.