

## Introducción

La incidencia y severidad de la infección por *C. difficile* (ICD) ha aumentado en los últimos 15 años, lo cual se ha atribuido a la emergencia de cepas hipervirulentas, como la BI/NAP1/027/ST1 que se caracteriza por producir las toxinas A, B y la toxina binaria CDT, así como por presentar resistencia a fluoroquinolonas (FQ).

## Objetivos

- ✓ Evaluar la presencia de las toxinas A, B y CDT en aislamientos de *C. difficile*, recuperados de heces diarréicas de pacientes, en 2 hospitales de Buenos Aires.
- ✓ Determinar la sensibilidad a los antibióticos de *C. difficile* e identificar las mutaciones en la región QRDR de GyrA/B.
- ✓ Tipificar por MLST los aislamientos productores de toxinas y/o resistentes a FQ.

## Métodos

- **Muestras:** Se incluyeron muestras de heces diarréicas, remitidas al laboratorio con sospecha de ICD, provenientes del Hospital Austral, Bs. As. (Hospital 1) y del Hospital Alemán, CABA (Hospital 2), durante marzo a noviembre de 2015 que fueron positivas para Glutamato deshidrogenasa.
- **Detección de Glutamato Deshidrogenasa (GDH) y toxinas A y B (TOX A/B) en materia fecal:** Se investigó utilizando el equipo comercial *C. Diff Quick Check Complete*.
- **Cultivo de *C. difficile*:** Las muestras GDH positivas fueron cultivadas para recuperar *C. difficile*. Brevemente, las muestras se expusieron a alcohol 95% por 30 minutos (shock etanólico) y fueron inoculadas en medio selectivo para recuperar *C. difficile*. La identificación se realizó por MALDI-TOF MS.
- **Detección de toxinas por métodos moleculares:** Se detectaron los genes de las toxinas *tcdA*, *tcdB* y *cdtA/cdtB* codificantes de las toxinas A, B y CDT, respectivamente, por multiplex PCR según Persson et al 2008, empleando como template ADN genómico extraído con fenol-cloroformo.
- **Pruebas de sensibilidad:** La sensibilidad a levofloxacina (LEV), moxifloxacina (MXF), gatifloxacina (GAT), vancomicina (VAN) y metronidazol (MTZ) se realizó con el método de dilución en agar de acuerdo al CLSI 2015. La caracterización de las regiones QRDR de GyrA/B se realizó según Spigaglia et al.
- **Tipificación molecular:** En aquellos aislamientos resistentes a FQ y/o productores de CDT se realizó la tipificación molecular por MLST según <http://pubmlst.org/cdifficile/>.

## Resultados

**Tabla 1.** Característica de 31 aislamientos de *C. difficile* PE-042 aislados de muestras de heces con sospecha de ICD.

N° aisl. <i>C. difficile</i>	Quick Check Complete		Genes de toxinas por PCR multiplex				R a FQ/sust.	MLST
	GDH	Tox A/B	tcdA	tcdB	cdtA	cdtB		
HE782	+	-	-	-	-	-	-	
HE1036	+	-	-	-	-	-	-	
HE1046	+	-	-	-	-	-	-	
HE1064	+	-	+	+	+	+	-	ST1
HE1098	+	-	-	-	-	-	-	
HE1871	+	-	+	+	-	-	-	
HE1935	+	-	+	+	-	-	-	
HE2281	+	+	+	+	+	+	-	ST1
HE2299	+	-	+	+	-	-	-	ST42
HE2322	+	+	-	-	-	-	-	
HA1	+	+	+	+	-	-	R/Thr82	SLV 37/219
HA2	+	+	+	+	-	-	-	
HA3	+	+	-	-	-	-	R/NG	SLV 26
HA4	+	+	-	-	-	-	R/Thr82	ST15
HA5	+	+	+	+	-	-	-	ST42
HA6	+	-	-	-	-	-	-	
HA7	+	-	+	+	-	-	-	
HA8	+	+	+	+	-	-	-	
HA9	+	+	+	+	-	-	-	
HA10	+	+	+	+	-	-	-	
HA11	+	-	-	-	-	-	-	
HA12	+	-	-	-	-	-	-	
HA13	+	+	+	+	+	+	-	ST226
HA14	+	+	+	+	-	-	-	
HA15	+	-	+	+	-	-	-	
HA17	+	-	+	+	-	-	-	
HA18	+	-	+	+	+	+	R/Thr82	SLV 122
HA19	+	-	-	-	-	-	-	
HA20	+	-	+	+	-	-	-	
HA21	+	+	+	+	-	-	-	
HA24	+	-	-	-	-	-	-	
Total Positivos	31	13/31 (42%)	19/31 (61%)	4/31 (13%)				

Características de los pacientes con *C. difficile* con toxina binaria

Características	Pacientes con Tox. Binaria			
	HE1064	HE2281	HA13	HA18
Edad (años)	62	2	65	97
Sexo	M	F	F	F
Enfermedad de base	MM	SAO	TxR	IC
Servicio que interna	Hemat.	EM	Tx	CM
Días de int. previos	3	0	0	19
Admis en 3 m previos	Si	Si	Si	No
Inmunosupresores	Si	Si	Si	No
ATB en 90 d previos	Si	Si	Si	Si
Días de diarrea	5	1	13	1
Admisión por ICD	No	Si	Si	No
Rto GB/mm <sup>3</sup>	591	10900	2500	7500
Fiebre	No	Si	Si	No
Tratamiento	MTZ	Autol.	MTZ	Probiót.
Diarrea c/ sangre	No	Si	No	No
Recurrencia	No	No	Si	No
Muerte a 30 días	No	No	No*	No
Días internado p/ICD	14	0	47	0

MM: mieloma múltiple, SAO: Síndrome autoinmunitario óseo, TxR: IRC y trasplante renal  
 \* fallece a los 47 de internación con ICD.

Actividad *in vitro* de 5 antibióticos frente a 31 aislamientos de *C. difficile*

ATB	MIC (µg/ml) (n=31)			R%
	Rango	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>	
VAN	0,125-0,5	0,125	0,5	0%
MTZ	≤0,125-1	≤0,125	0,5	0%
LEV	1->32	4	4	13%
MXF	1-32	1	16	13%
GAT	0,5-32	1	32	13%

## Conclusiones

- ✓ Se identificaron 4 aislamientos de *C. difficile* productores de CDT constituyendo una de las primeras descripciones de esta toxina en nuestro país. En todos se detectaron los genes codificantes de Tox A/B. Los pacientes portadores de *C. difficile* productores de CDT no presentaron signos asociados a ICD grave con excepción de un paciente que presentó recidiva y muerte por ICD.
- ✓ Se observó resistencia a FQ solo en uno de los productores de CDT, asociada a la sustitución aminoácida más frecuente a nivel mundial.
- ✓ Los ST identificados fueron 1, 15, 42 y 226, así como SLV del ST26, ST122 y ST37/219.
- ✓ En los aislamientos CDT positivos, se identificó el ST1 asociado a la cepa hipervirulenta BI/NAP1/027, en el hospital 1, sin resistencia a FQ.