



ORIGINAL ARTICLE

Impacto de los marcadores microbiológicos en la evolución de la infección por *Clostridioides difficile*



María Dolores Rojo-Martín ^{a,*}, Juan Diego Ruiz-Mesa ^b,
Concepción Mediavilla-Gradolph ^a, Mercedes Marín-Arriaza ^c,
Alexandra Halbardier-Carretero ^a, José Serrano-Sánchez ^a,
Ignacio Márquez-Gómez ^b, Inmaculada de Toro-Peinado ^a,
Luis Francisco Caballero-Martínez ^b, Aurora García-Barrionuevo ^d
y Begoña Palop-Borrás ^a

^a Servicio de Microbiología, Hospital Regional Universitario de Málaga; Instituto Biomédico de Investigación de Málaga (IBIMA), Málaga, España

^b Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital Regional Universitario de Málaga; Instituto Biomédico de Investigación de Málaga (IBIMA), Málaga, España

^c Servicio de Microbiología y Enfermedades Infecciosas, Hospital Gregorio Marañón, Madrid, España

^d Sección de Microbiología, Hospital Virgen de la Victoria, Málaga, España

Recibido el 26 de mayo de 2024; aceptado el 6 de diciembre de 2024

Disponible en Internet el 5 de marzo de 2025

PALABRAS CLAVE

*Clostridioides
difficile*;
Toxina B;
Toxina binaria;
Ciclo umbral PCR;
Ribotipo

Resumen El principal reto actual en el diagnóstico de la infección por *Clostridioides difficile* (ICD) es detectar a los pacientes con peor pronóstico. En este estudio se ha investigado la asociación entre la presencia de toxina en heces, la amplificación del gen de la toxina B a ciclos bajos por PCR (Ct), la detección de toxina binaria o el ribotipo con la gravedad, la recurrencia y el mal pronóstico. Para ello se analizó la presencia de *C. difficile* toxigénico en heces diarreicas de adultos, independientemente de la solicitud clínica, mediante la detección de la glutamato-deshidrogenasa (GDH), las toxinas A (TcdA) y B (TcdB) por inmunoensayo y el gen que codifica la toxina B (*tcdB*) y la toxina binaria (*cdtA*) por PCR. Las cepas toxigénicas recuperadas por cultivo toxigénico se tiparon mediante PCR ribotipado y subtiparon por *multilocus variable-number tandem-repeat analysis* (MLVA). Se detectaron 82 casos de ICD a partir de 677 muestras (12,1%). Los pacientes con Ct $\leq 27,5$ presentaron con más frecuencia criterios de gravedad (59,3 frente al 40,7%; $p=0,15$); recurrencia (80 frente al 20%; $p=0,10$) y mal pronóstico (60,3 frente al 39,7%; $p=0,05$). La media del Ct fue más baja cuando hubo recurrencia (25,48; SD: 2,41; $p=0,058$). Mediante regresión logística, la variable con mayor asociación con el mal pronóstico fue un Ct $\leq 27,5$ (OR: 2,663; IC 95%: 0,983-7,636; $p=0,059$). Nuestros resultados indican que

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: md.rojo.spa@juntadeandalucia.es (M.D. Rojo-Martín).

la amplificación del gen de la toxina B a ciclos bajos es un posible marcador de gravedad, recurrencia y mal pronóstico en la ICD. Destacamos la diversidad de ribotipos observada, sin relación clonal entre aislamientos del mismo ribotipo.

© 2025 Los Autores. Publicado por Elsevier España, S.L.U. en nombre de Asociación Argentina de Microbiología. Este es un artículo Open Access bajo la CC BY-NC-ND licencia (<http://creativecommons.org/licencias/by-nc-nd/4.0/>).

KEYWORDS

Clostridioides difficile;
Toxin B;
Binary toxin;
PCR cycle threshold;
Ribotype

The role of microbiological markers in the progression of *Clostridioides difficile* infection

Abstract The main current diagnostic challenge in *Clostridioides difficile* infection (CDI) is to detect patients with the poorest prognoses. We have studied the association between the presence of toxin in the feces, the amplification of the toxin B gene at low cycles in PCR (Ct), and the detection of the binary toxin or ribotype with severity, recurrence, and poor prognosis. Toxigenic *C. difficile* has been investigated in adult diarrheal feces, regardless of the clinical request. Glutamate dehydrogenase (GDH), toxin A (TcdA) and toxin B (TcdB) have been assessed by immunoassay and the gene encoding toxin B (tcdB) and the binary toxin (cdtA) by PCR. The toxigenic strains recovered by toxigenic culture were typed by PCR-Ribotyping and subtyped by MLVA (multilocus-variable number tandem DNA repeat analysis). Eighty-two (82) cases of CDI were detected from 677 samples (12.1%). Patients with Ct ≤ 27.5 often presented criteria for severity, recurrence, and poor prognosis (59.3% versus 40.7%, $P=.15$; 80% versus 20%, $P=.10$; and 60.3% versus 39.7%, $P=.055$, respectively). The mean Ct was lower when recurrence was observed (25.48; SD = 2.41; $P=.058$). By logistic regression, the variable most likely to indicate a poor prognosis was Ct ≤ 27.5 (OR = 2.663; 95% CI = .983-7.636; $P=.059$). In summary, the cycle threshold of the PCR for toxin B is a possible marker of severity, recurrence, and poor prognosis in CDI. The diversity of ribotypes observed is remarkable, with no clonal relationship between isolates of the same ribotype.

© 2025 The Authors. Published by Elsevier España, S.L.U. on behalf of Asociación Argentina de Microbiología. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción

Clostridioides difficile es la causa más frecuente de diarrea infecciosa asociada a la asistencia sanitaria, estimándose que en Europa se producen 152.905 casos al año^{3,5} y que un 12-18% de los pacientes pueden progresar a enfermedad grave y el 20% sufrir recurrencias³⁴. La patogenicidad de *C. difficile* está mediada por la liberación de la toxina A (TcdA) y/o la toxina B (TcdB) que afectan el epitelio del colon y causan la sintomatología. Además, algunas cepas pueden producir otra toxina, denominada toxina binaria (también conocida como *C. difficile* transferasa), cuyo papel es controvertido, aunque se ha propuesto que puede aumentar la adherencia y la virulencia de las cepas que la producen³⁵.

La infección por *C. difficile* (ICD) tiene un importante impacto en la morbimortalidad de pacientes frágiles, como ancianos, inmunodeprimidos, pacientes con comorbilidades, con ingresos hospitalarios prolongados o sometidos a múltiples cursos de antibioterapia^{6,35}. En las últimas décadas se han producido cambios en la epidemiología de la ICD, aumentando su incidencia en la comunidad y en poblaciones no consideradas de riesgo hasta ahora, como embarazadas, niños y pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal. Esto se ha reflejado en las guías más recientes^{1,9,23}, que aconsejan procesar para diagnóstico de ICD las muestras procedentes de pacientes con diarrea independientemente de su edad (salvo menores de 2 años que pueden estar colo-

nizados en un alto porcentaje), su origen (hospitalizado o comunitario) o la petición del clínico.

Actualmente, y en parte debido al interés que genera la detección de pacientes que se podrían beneficiar de las mejores opciones terapéuticas disponibles, existe cierto debate sobre la posible correlación entre diferentes resultados de las pruebas microbiológicas de diagnóstico de la ICD (detección de toxina A y/o toxina B por ensayo inmunoenzimático [IE], el ciclo umbral [Ct] de la PCR, detección de toxina binaria) o el tipo de cepa adquirida con la gravedad, aparición de recurrencia y la evolución de esta infección^{4,15,20,26,29}.

En este trabajo, hemos utilizado un algoritmo diagnóstico en 3 pasos junto con el cultivo toxigénico para investigar la presencia de *C. difficile* toxigénico (CDT) en los pacientes adultos con diarrea atendidos en nuestro centro con el objetivo de conocer los marcadores microbiológicos que se asocian con peor pronóstico y recurrencia de ICD.

Material y métodos

Diseño del estudio

Se realizó un estudio longitudinal prospectivo desde el 15 de marzo al 15 de septiembre de 2021 en el Hospital Regional Universitario de Málaga (España), centro de tercer nivel del Sistema Sanitario Público de Andalucía con 1.176 camas.

Se investigó la presencia de CDT en las heces diarreicas de pacientes mayores de 18 años (ingresados o atendidos en urgencias) a los que se les había solicitado un coprocultivo y/o estudio de *C. difficile*. Se excluyeron los pacientes que presentaron una recurrencia de ICD de un episodio diagnosticado en las 8 semanas previas al periodo de estudio.

Estudios microbiológicos

Para la detección de *C. difficile* en heces se investigó la presencia de GDH por inmunocromatografía (*Clostridium difficile* antigen GDH Certest®). Cuando la prueba fue positiva se estudió la producción de toxinas A y/o B por IE (Tox A/B Quick Chek, Techlab®) y se realizó PCR en tiempo real (Xpert® *C. difficile* BT, Cepheid®) para detección del gen que codifica la toxina B (*tcdB*), de los genes de la toxina binaria (*cdtA* y *cdtB*), y de la mutación en el gen *tcdC* específica del ribotipo 027.

En todas las muestras se hizo cultivo toxigénico, previo tratamiento de la muestra con alcohol, utilizando placas selectivas de agar sangre con cicloserina, cefoxitina y fructosa con incubación durante 48 h en anaerobiosis. Las colonias con morfología sugestiva de *C. difficile* se estudiaron mediante espectrometría de masas MALDI-TOF MS (BD Biotyper®, Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) y cuando se confirmó la identificación, se investigó la producción de toxinas mediante IE. El estudio de la susceptibilidad antibiótica se realizó en medio *Brucella blood agar* (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francia) mediante tiras de gradiente (Liofilchem) de metronidazol y vancomicina; los resultados se interpretaron siguiendo las recomendaciones del European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)¹³.

El tipado molecular de las cepas caracterizadas como toxigénicas se hizo en el servicio de Microbiología del Hospital G. U. Gregorio Marañón (Madrid, España), siguiendo el método descrito por Stubbs et al.³⁹ y ribotipo capilar¹⁶. El análisis filogenético de perfiles de ribotipado se realizó con Bionumerics software v7.6 (Applied Maths). Se consideró que 2 o más aislados tenían el mismo patrón de ribotipado cuando presentaban idéntico número y tamaño de bandas según los criterios publicados por Tenover et al.⁴⁰. Para establecer la posible relación filogenética entre cepas pertenecientes al mismo ribotipo, se llevó a cabo multilocus-variable number tandem DNA repeats analysis (MLVA), estudiando por PCR el número de repeticiones de una determinada secuencia presente en 7 loci distintos del cromosoma de *C. difficile*⁴¹.

Definiciones

Se han seguido las recomendaciones y las definiciones utilizadas en la guía europea de tratamiento de la ICD (ESCMID)⁴².

- **Caso de ICD.** Cuadro clínico compatible con diarrea (3 o más deposiciones en 24 h de heces no formadas), íleo o megacolon tóxico sin otra causa identificable, o bien, colitis pseudomembranosa diagnosticada mediante endoscopia, colectomía o autopsia; además, acompañado de detección en heces de toxina de *C. difficile* A y/o

B mediante IE y/o PCR, y/o crecimiento de *C. difficile* toxigénico en cultivo.

- **ICD grave.** Caso de ICD que presenta uno o más de los siguientes criterios: fiebre > 38,5°C, recuento leucocitario $\geq 15.000 \text{ cél}/\mu\text{l}$ o incremento de la creatinina > 50% de los niveles basales.
- **ICD grave/complicada.** ICD grave que cumple además uno más de los siguientes criterios: hipotensión, *shock* séptico, elevación de lactato sérico, íleo paralítico, megacolon tóxico, perforación intestinal, ingreso en la UCI, cirugía debido a complicaciones de la ICD, muerte.
- **ICD recurrente.** Nueva aparición de síntomas con presencia de toxina A y/o B y/o PCR positiva y/o cultivo positivo, dentro de las 8 semanas posteriores al inicio de un episodio previo resuelto tras haber completado el tratamiento para ICD correctamente.
- **ICD con mal pronóstico.** Caso de ICD que presenta criterios de infección grave o grave/complicada y/o recurrencia y/o mortalidad.
- **ICD comunitaria.** ICD que ocurre en la comunidad o en las primeras 48 h de hospitalización del paciente, sin que hubiera permanecido en las últimas 12 semanas previas al comienzo de la infección en centro hospitalario o sociosanitario.
- **ICD nosocomial.** ICD que aparece entre las 48 h posteriores al ingreso y el alta o dentro de las 4 semanas tras el alta hospitalaria.

Recopilación de datos clínicos

Los datos fueron recogidos a partir de la historia clínica de los pacientes, haciendo un seguimiento de al menos 2 meses tras completar el tratamiento para el episodio de ICD, en caso de solicitud clínica y en los diagnosticados sin solicitud clínica, se hizo seguimiento hasta 2 meses tras el episodio. Se recogieron datos epidemiológicos, clínicos, analíticos, microbiológicos, de tratamiento y de pronóstico que permitieron la detección de gravedad, recurrencia, mortalidad y mal pronóstico. Se estimó el riesgo de recurrencia utilizando un score basado en los siguientes predictores: edad (< 70 años [0 puntos]; 70-79 años [1 punto]; ≥ 80 años [2 puntos]), IE positivo para toxina A/B (1 punto), episodio de ICD en el año anterior (2 puntos), persistencia de diarrea en el quinto día de tratamiento (1 punto), receptor de trasplante (1 punto), inmunosupresión grave o neoplasia activa (1 punto). Según los puntos totales se definieron 3 categorías: riesgo bajo (0-1 puntos), riesgo intermedio (2-3 puntos) y riesgo elevado (≥ 4 puntos)^{7,17}. El Comité de Ética de la Investigación provincial de Málaga (España) aprobó el protocolo del estudio, que respeta los principios fundamentales de la Declaración de Helsinki y cumple los requisitos establecidos en la Legislación española en el ámbito de la investigación biomédica, de la protección de datos de carácter personal, y de la bioética.

Análisis estadístico

Se ha analizado mediante análisis bivalente la posible asociación de factores de riesgo clínicos y microbiológicos con la gravedad de la infección (grave y grave/complicada), recurrencia, mortalidad y una variable de mal pronóstico

(construida a partir de las 3 anteriores). Para variables cualitativas como detección de toxina por IE, resultado de PCR con $Ct \leq 23,5$ o $Ct \leq 27,5$ (valores señalados en la literatura reciente)^{27,33}, detección de toxina binaria y ribotipo, se utilizó la prueba de Chi-cuadrado y la prueba exacta de Fisher. Para las variables cuantitativas como la media del Ct se utilizó la prueba U de Mann-Whitney-Wilcoxon. Además, se ha construido un modelo de regresión logística, considerando la variable dependiente Mal pronóstico.

Resultados

Diagnóstico de ICD

Durante los 6 meses del periodo de estudio se procesaron 677 muestras: 511 (75,5%) con solicitud de investigación de CDT y 166 (24,5%) sin solicitud. Se aisló CDT en 82 muestras (12,1%); además, en 5 muestras se aisló *C. difficile* en cultivo, pero no se demostró la producción de toxinas por IE o PCR. Entre las muestras con solicitud de estudio de CDT, fueron positivas 69 (13,5%) y entre las que no tenían solicitud 13 (7,8%); es decir, de las 82 muestras positivas el 84,1% tenían solicitud de estudio de CDT y el 15,9% no.

La GDH fue positiva en 120 muestras (17,7%), la toxina A/B (IE) en 40 (5,9%) y la PCR en 81 (11,9%), siendo un caso diagnosticado por cultivo toxigénico.

Todas las cepas fueron sensibles a metronidazol (CMl_{50} = 0,094 mg/l, CMl_{90} = 0,25 mg/l) y vancomicina (CMl_{50} = 0,25 mg/l, CMl_{90} = 0,38 mg/l).

Epidemiología de la infección por *C. difficile*

Los antecedentes y factores de riesgo más frecuentes se reconocen en la [tabla 1](#). De los 82 casos detectados durante el periodo estudiado, 37 eran varones (45,1%) y 45 mujeres (54,9%) y la edad media fue de 67,6 años ($\pm 18,604$). El índice de Charlson medio fue de 5,4. La presentación clínica fue grave o grave/complicada en el 65,9% de los pacientes, y en el 34,1% el riesgo de recurrencia se catalogó de elevado. La tasa de curación fue del 78%, la de recurrencia del 12,2% y la de mortalidad del 15,9% a las 12 semanas (con una mortalidad atribuible del 9,8%).

Influencia de marcadores microbiológicos en la evolución de la infección por *C. difficile*

Los resultados del análisis bivalente se muestran en la [tabla 2](#), observándose que no se ha demostrado una asociación estadísticamente significativa entre ninguno de los marcadores microbiológicos considerados y la evolución de ICD, si bien cuando se detectó la toxina en heces por IE los pacientes presentaron formas graves de la enfermedad con más frecuencia (55,6%) que los pacientes diagnosticados por PCR y/o cultivo (44,4%), $p = 0,09$; igualmente ocurrió en los pacientes con mal pronóstico (53,4 vs. 46,6%; $p = 0,19$). Del mismo modo, los pacientes con $Ct \leq 27,5$ presentaron a menudo criterios de gravedad, recurrencia y mal pronóstico (59,3 vs. 40,7%; $p = 0,15$; 80 vs. 20%; $p = 0,10$; 60,3 vs. 39,7%; $p = 0,055$, respectivamente). Cuando se analizó la media del Ct con respecto a las variables de evolución (datos no mos-

Tabla 1 Antecedentes y factores de riesgo en los pacientes con ICD

Antecedentes/factores de riesgo	n (%)
<i>Relacionados con el huésped</i>	
Sexo (varón/mujer)	37 (45,1%)/45 (54,9%)
Edad (media)	67,6 $\pm$ 18,6 años
Diabetes	31 (37,8%)
Enfermedad cardiovascular	27 (32,9%)
Neoplasia	24 (29,3%)
Enfermedad renal crónica	
Grado II-IV	17 (20,7%)
Hemodiálisis	7 (8,5%)
Enfermedad hematológica	13 (15,9%)
Infección por <i>C. difficile</i> previa ^a	13 (15,9%)
EPOC	12 (14,6%)
Cirrosis	5 (6,1%)
Diverticulitis	3 (3,7%)
Enfermedad inflamatoria intestinal	2 (2,4%)
Colitis CMV	2 (2,4%)
<i>Tratamientos/procedimientos clínicos</i>	
Inhibidores de la bomba de protones ^b	74 (90,2%)
Antibioterapia previa ^b	71 (86,6%)
Hospitalización previa ^b	45 (54,9%)
Inmunosupresión	23 (28%)
Corticoides ^b	21 (25,6%)
Quimioterapia/radioterapia ^c	17 (20,7%)
Cirugía previa ^d	16 (19,3%)
Trasplante	14 (17,1%)

CMV: citomegalovirus; ICD: infección por *Clostridioides difficile*; EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

^a ICD detectada con anterioridad a los 3 meses previos del episodio actual.

^b En los 3 meses previos al diagnóstico de ICD.

^c En el último mes.

^d Durante el ingreso o en los 3 meses previos.

trados), la mayor asociación con un valor más bajo de Ct, se ha encontrado cuando apareció recurrencia de la enfermedad (media $Ct = 25,45$; SD: 2,41) frente a los casos en que no hubo recurrencia (media $Ct = 28,17$; SD: 4,16); $p = 0,058$. Según regresión logística ([tabla 3](#)), la variable microbiológica con mayor asociación con mal pronóstico fue $Ct \leq 27,5$ (OR: 2,663; IC 95%: 0,983-7,636; $p = 0,059$).

Ribotipos: distribución e influencia en el pronóstico

Los ribotipos más frecuentes han sido el 014, 106 y 207 ([fig. 1](#)), no habiéndose detectado el ribotipo 027. La distribución por áreas hospitalarias ha sido muy heterogénea (datos no presentados). Según análisis bivalente, no se ha encontrado asociación significativa entre la presencia de los ribotipos más frecuentes con la gravedad, la aparición de recurrencia, mortalidad y mal pronóstico (datos no presentados); tampoco tras análisis por regresión logística ([tabla 3](#)). Mediante análisis MLVA, se ha comprobado que ninguno de los aislados de cada ribotipo analizado (los mayoritarios, 014, 106 y 207) pertenece al mismo complejo

Tabla 2 Influencia de la detección de toxina (IE), Ct (PCR) y detección de toxina binaria (PCR) en la evolución de la infección por *C. difficile*

Variable	Toxina (IE) (n/%)			Ct ≤ 27,5 (n/%)			Ct ≤ 23,5 (n/%)			Toxina binaria (n/%)		
	No	Sí	Valor de p	No	Sí	Valor de p	No	Sí	Valor de p	No	Sí	Valor de p
<i>Gravedad</i>												
Sí (n = 54)	24 (44,4)	30 (55,6)	0,09	22 (40,7)	32 (59,3)	0,15	46 (85,2)	8 (14,8)	0,75	47 (87)	7 (13)	1
No (n = 28)	18 (64,3)	10 (35,7)		15 (53,6)	11 (39,3)		21 (75)	5 (17,9)		23 (82,1)	4 (14,3)	
<i>Recurrencia</i>												
Sí (n = 10)	5 (50)	5 (50)	1	2 (20)	8 (80)	0,10	7 (70)	3 (30)	0,35	8 (80)	2 (20)	0,62
No (n = 72)	37 (51,4)	35 (48,6)		35 (48,6)	35 (48,6)		60 (83,3)	10 (13,9)		62 (86,1)	9 (12,5)	
<i>Mortalidad</i>												
Sí (n = 13)	7 (53,8)	6 (46,2)	0,83	5 (38,5)	8 (61,5)	0,76	12 (92,3)	1 (7,7)	0,68	13 (100)	0 (0)	0,20
No (n = 69)	35 (50,7)	34 (49,3)		32 (46,7)	35 (50,7)		55 (79,7)	12 (17,4)		57 (82,6)	11 (15,9)	
<i>Mal pronóstico</i>												
Sí (n = 58)	27 (46,6)	31 (53,4)	0,19	23 (39,7)	35 (60,3)	0,055	48 (83)	10 (17)	1	50 (86,2)	8 (13,8)	1
No (n = 24)	15 (62,5)	9 (37,5)		14 (58,3)	8 (33,3)		19 (79,2)	3 (12,5)		20 (83,3)	3 (12,5)	

IE: enzimoimmunoensayo.

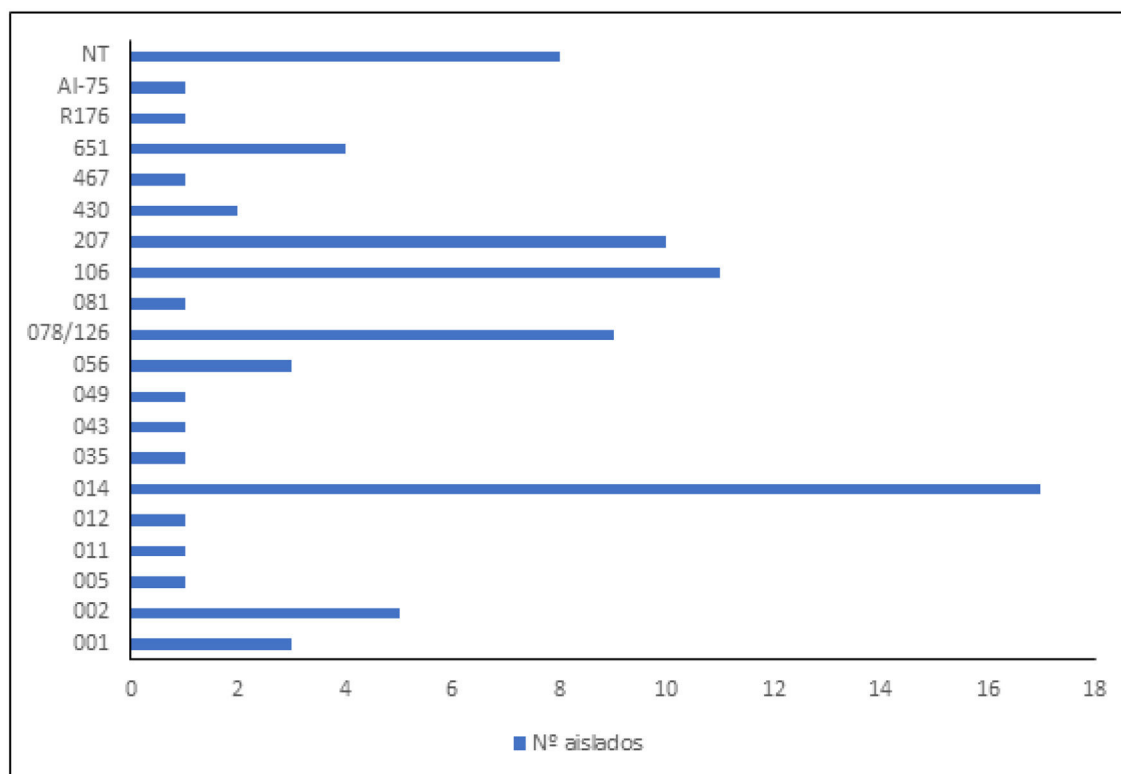
Tabla 3 Análisis de regresión logística^a: variable dependiente mal pronóstico

Variable	OR	IC 95%	Valor de p
Toxina A.B (IE)	1,786	(0,676-4,912)	0,25
Ct ≤ 23,5	1,319	(0,357-6,357)	0,7
Ct ≤ 27,5	2,663	(0,983-7,636)	0,059
Toxina binaria	1,067	(0,276-5,241)	0,923
Ribotipo 207	0,577	(0,149-2,455)	0,43
Ribotipo 106	1,12	(0,291-5,49)	0,88
Ribotipo 078/126	0,808	(0,194-4,103)	0,78
Ribotipo 014	1,17	(0,352-4,619)	0,81
Ribotipo 002	0,6	(0,093-4,788)	0,6
Hospitalización previa ^b	7,429	(2,27-27,338)	0,001
Dolor abdominal	9,444	(2,843-43,356)	0,001
Albúmina	0,112	(0,026-0,38)	0,001
Creatinina	2,296	(1,193-5,932)	0,052
Proteína C reactiva	1,022	(1,01-1,038)	0,001

IC 95%: intervalo de confianza del 95%; IE: enzoinmunoensayo; OR: *odds ratio*.

^a Resultados de la regresión logística aplicado a las variables microbiológicas; además, se muestran las variables clínicas con asociación significativa con mal pronóstico.

^b En los 3 meses previos al diagnóstico de ICD.


Figura 1 Distribución de ribotipos. NT: aislados que no pudieron ser clasificados según el esquema de ribotipado utilizado.

clonal, aunque hay algunos aislados genéticamente relacionados (fig. 2).

Discusión

La introducción de las técnicas moleculares ha supuesto un importante avance en el diagnóstico de ICD, aunque algunos estudios han cuestionado la significación clínica de los

casos que se detectan solo por PCR²⁰. En esta línea, se ha relacionado la detección de toxinas por IE con formas más severas de la enfermedad y recurrencias^{14,19,24,26}, aunque en algunas series no se ha encontrado asociación³²; además se ha comprobado que la ICD grave puede aparecer en pacientes en los que no se detectan toxinas en heces y el diagnóstico se realiza por PCR o cultivo toxigénico^{15,25}. En nuestro estudio, no hemos detectado una asociación

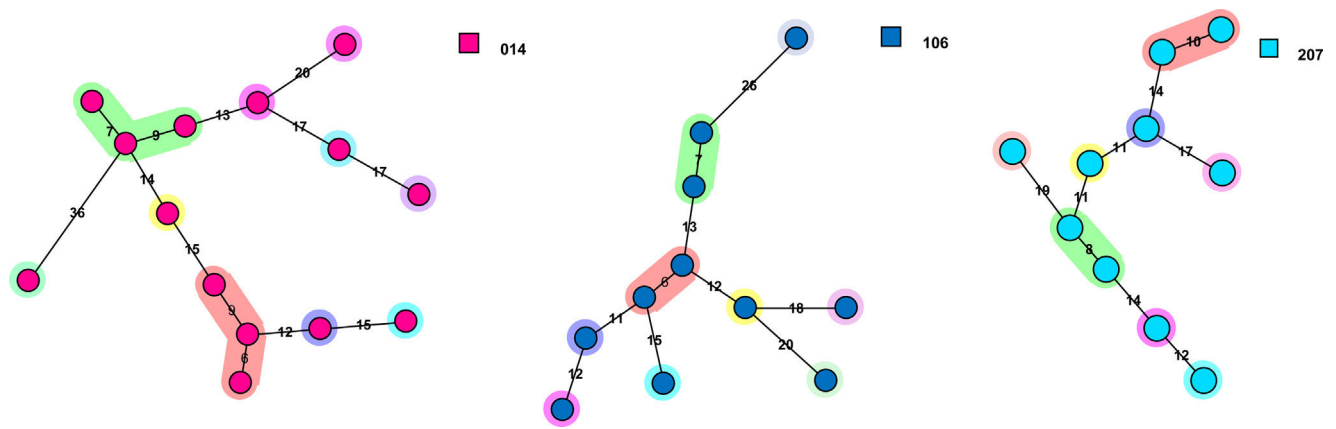


Figura 2 Relación genética (MLVA) entre cepas de los ribotipos más frecuentes.

MLVA: multilocus variable number tandem DNA repeats. Cada círculo coloreado representa un MLVA tipo y el número que figura en las líneas entre círculos son las STRD (summed tandem repeats differences). Las sombras coloreadas representan los complejos genéticamente relacionados $2 < \text{STRD} \leq 10$, es decir cepas relacionadas que compartirían un ancestro común, aunque actualmente no sean iguales. Las cepas con $\text{STRD} > 10$ serían genéticamente diferentes y no tendrían relación.

significativa entre la detección de toxina por IE en heces de pacientes con ICD con la gravedad, recurrencia o mortalidad, si bien se detectó con más frecuencia en los pacientes graves y en los pacientes con mal pronóstico que en los que no cumplían estos criterios. Resultados similares informaron López-Cárdenas et al.²¹, que comprobaron que en los pacientes con toxina en heces fueron más frecuentes las recurrencias, las formas graves de ICD y la aparición de complicaciones, aunque sin alcanzar significación estadística. Ahondando en esta posible correlación, se están desarrollando métodos cuantitativos ultrasensibles que permiten determinar la cantidad de toxina en heces, habiéndose conseguido resultados prometedores para identificar la ICD grave y predecir la gravedad clínica, así como la recurrencia^{2,38}.

Algunas cepas, como las que pertenecen a los ribotipos considerados hipervirulentos 027 y 078, producen toxina binaria. Esta toxina se ha correlacionado con la gravedad de la ICD e incluso con susceptibilidad disminuida a los antibióticos³. No obstante, la implicación de la toxina binaria en una mayor virulencia de *C. difficile* es tema de debate. Pilate et al.²⁸ no encontraron diferencias en cuanto a recurrencia de la enfermedad, morbilidad, o mortalidad en los pacientes con ICD con toxina binaria positiva, excepto una leucocitosis periférica más alta ($16,30 \times 10^9/\text{l}$ vs. $11,65 \times 10^9/\text{l}$; $p=0,02$). Según Berry et al.⁴ la presencia de los genes que codifican la toxina binaria no predice la gravedad clínica de ICD, pero se asocia significativamente con mayor riesgo de mortalidad global. Recientemente López-cárdenas et al.²¹ encontraron una mayor tasa de enfermedad grave (39,2 vs. 21,2%; $p=0,005$), complicaciones (21,6 vs. 10,9%; $p=0,037$) y recurrencia (14,9 vs. 5,8%; $p=0,029$) en pacientes en los que detectaron toxina binaria. En nuestro estudio, no hemos encontrado asociación entre la detección de toxina binaria y las variables de mala evolución, pero hay que tener en cuenta que se ha detectado toxina binaria solo en 11 pacientes (13,4%), porcentaje más bajo que en otras series^{4,8,21}, lo cual puede estar relacionado con la ausencia de ribotipo 027.

Entre los múltiples modelos predictivos que utilizan variables clínicas y/o microbiológicas para predecir el pronóstico de ICD, la mayoría incluyen la valoración del ciclo umbral (Ct) de la PCR a tiempo real²². Existen publicaciones que demuestran que valores bajos de Ct en el momento del diagnóstico se correlacionan con mal pronóstico (recurrencia, fallo del tratamiento, progresión de la enfermedad o mortalidad relacionada)^{11,34}, lo que podría indicar una mayor cantidad de *C. difficile* replicándose y toxina libre en las heces del paciente³⁷; sin embargo, en otros estudios no se observa una clara correlación^{22,36}. Estos diferentes resultados podrían deberse a las distintas definiciones utilizadas, distinta prevalencia local de la infección y metodología empleada en los estudios y protocolos de tratamiento aplicados. Recientemente, se ha realizado en nuestro país un estudio multicéntrico en el que se ha encontrado una asociación significativa del Ct con el pronóstico cuando se utiliza un *cut-off* de $<23,5$ ³³. Nuestros resultados, aunque no alcanzan significación estadística, sí reflejan una cierta tendencia a detectarse un Ct más bajo en los pacientes con peor evolución y pronóstico, especialmente utilizando el *cut-off* $\leq 27,5$. Por otra parte, la media del valor de Ct ha sido más baja en los pacientes más graves, sobre todo en los que apareció recurrencia (25,48; DS=2,41 vs. 28,17; DS=4,16; $p=0,058$). Origüen et al.²⁷ también observaron un valor medio de Ct más bajo en episodios con recurrencia ($24,00 \pm 3,28$ vs. $26,02 \pm 4,54$; $p=0,002$) y mala evolución ($24,9 \pm 4,24$ vs. $26,05 \pm 4,47$; $p=0,07$), estableciendo 25,65 como *cut-off* óptimo para predecir la recurrencia y 27,55 para el mal pronóstico.

Igualmente se ha valorado la hipótesis de que la infección con determinados ribotipos se asocia con ICD más grave^{10,18,30}, aunque solo se ha demostrado con el ribotipo 027, considerado de alto riesgo y mal pronóstico^{31,32,34}. No obstante, en el reciente estudio de Menon et al.²⁴ se cuestiona la hipervirulencia de este ribotipo y su asociación con enfermedad grave y pronóstico adverso en enfermedad no epidémica. En nuestro estudio, no se ha producido ningún caso de ICD con ribotipo 027; por otra parte, no hemos detectado asociación con la gravedad, la aparición

de recurrencia, mortalidad y mal pronóstico de los ribotipos más frecuentemente detectados (014, 106, 207). No obstante, hemos tenido un importante número de infecciones con mal pronóstico, lo cual puede estar relacionado con la presencia de otros ribotipos o con factores de riesgo del paciente. La importante heterogeneidad de ribotipos observada y la ausencia de relación clonal entre aislamientos del mismo ribotipo confirmada por MLVA, refleja la ausencia de brotes en nuestro centro y que la transmisión podría estar produciéndose, en parte por otras vías no asociadas a los cuidados sanitarios, a partir de pacientes colonizados con *C. difficile* toxigénico o pacientes asintomáticos, niños colonizados asintomáticamente, animales domésticos y de producción, y la cadena alimentaria¹².

En nuestra serie la investigación de CDT en todas las heces diarreicas en adultos independientemente de la solicitud clínica ha permitido detectar un 15,9% adicional de casos; sería interesante hacer un estudio más amplio para conocer la trascendencia clínica y epidemiológica de este incremento de casos diagnosticados. El algoritmo de 3 pasos ha permitido diagnosticar la mayoría de los casos de ICD (98,8%). El cultivo toxigénico no ha aportado una mejora significativa en el diagnóstico, pero podría plantearse como opción cuando no se requiera un diagnóstico urgente, en casos no graves o no sospechados.

Nuestro estudio tiene algunas limitaciones: la principal es el bajo número de muestras, motivado principalmente por el periodo en el que se hizo, en plena pandemia por SARS-CoV-2, donde los estudios microbiológicos de ICD podrían haber disminuido significativamente; por otra parte, no se han excluido pacientes con cáncer hematológico, donde el efecto de la enfermedad base y de la quimioterapia mielosupresora puede influir en el recuento de leucocitos y la creatinina en sangre; por último, la definición de recurrencia utilizada incluye criterios microbiológicos (presencia de toxina A y/o B o PCR positiva o cultivo positivo), por lo que se podrían haber perdido casos en los que no se haya enviado muestra para estudio.

Conclusiones

Los resultados de nuestro estudio indican que, entre los marcadores evaluados, la amplificación del gen de la toxina B a ciclos bajos por PCR (Ct), podría ser el más útil para predecir la gravedad, recurrencia y mal pronóstico de ICD; no obstante, sería necesario realizar estudios más amplios, que abarcaran otros tipos de pacientes, incluida la población pediátrica y pacientes de la comunidad para comprobar esta asociación. La investigación de ICD en todos los pacientes diarreicos mejora el diagnóstico, aunque sería interesante explorar la significación clínica de estos hallazgos. Por último, la diversidad de ribotipos detectados y la ausencia de relación clonal entre aislamientos del mismo ribotipo, sugiere la existencia de vías de transmisión no relacionadas con la asistencia sanitaria, lo que puede requerir cambios en el abordaje y control de esta infección.

Financiación

Los autores declaran haber recibido financiación para la realización de este estudio del Plan propio del Ins-

tituto Biomédico de Investigación de Málaga, España (IBIMA). Área4.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Alcalá-Hernández L, Marín-Arriaza M, Mena-Ribas A, Niubó-Bosh J. Diagnóstico microbiológico de la infección por *Clostridium difficile*. 53. Alcalá Hernández L (coordinador). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado-Mansilla E, Cantón-Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2015.
- Alonso CD, Kelly CP, Garey KW, Gonzales-Luna AJ, Williams D, Daugherty K, et al. Ultrasensitive and Quantitative Toxin Measurement Correlates With Baseline Severity, Severe Outcomes, and Recurrence Among Hospitalized Patients With *Clostridioides difficile* Infection. Clin Infect Dis. 2022;74:2142–9, <http://dx.doi.org/10.1093/cid/ciab826>.
- Asensio A, Vallejo-Plaza A, Parra LM, Ortí-Lucas R, Salcedo I, Ramos A, et al., Grupo de trabajo EPINE. Epidemiology of *Clostridioides difficile* infection in hospitalized patients in Spain: An eight-year review (2012–2019). Enferm Infecc Microbiol Clin. 2022;40:125–30, <https://doi.org/10.1016/j.eimce.2021.04.008>.
- Berry CE, Davies KA, Owens DW, Wilcox MH. Is there a relationship between the presence of the binary toxin genes in *Clostridium difficile* strains and the severity of *C. difficile* infection (CDI)? Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2017;36:2405–15, <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-017-3075-8>.
- Cassini A, Plachouras D, Eckmanns T, Abu Sin HM, Blank P, Ducomble T, et al. Burden of Six Healthcare-Associated Infections on European Population Health: Estimating Incidence-Based Disability-Adjusted Life Years through a Population Prevalence-Based Modelling Study. PLoS Med. 2016;13:e1002150, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.1002150>.
- Chopra T, Goldstein EJC. *Clostridium difficile* Infection in Long-term Care Facilities: A Call to Action for Antimicrobial Stewardship. Clin Infect Dis. 2015;60 Suppl 2:S72–6, <https://doi.org/10.1093/cid/civ053>.
- Cobo J, Merino E, Martínez C, Cózar-Llistó A, Shaw E, Marrodán T, et al., for the Nosocomial Infection Study Group. Prediction of recurrent *Clostridium difficile* infection at the bedside: The GEIH-CDI score. Int J Antimicrob Agents. 2018;51:393–8, <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.09.010>.
- Costa DVS, Pham NVS, Hays RA, Bolick DT, Goldbeck SM, Poulter MD, et al. Influence of Binary Toxin Gene Detection and Decreased Susceptibility to Antibiotics among *Clostridioides difficile* Strains on Disease Severity: A Single-Center Study. Antimicrob Agents Chemother. 2022;66:e0048922. doi: 10.1128/aac.00489-22.
- Crobach MTJ, Planché T, Eckert E, Barbut F, Terveer EM, Dekkers OM, et al., European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Update of the diagnostic guidance document for *Clostridium difficile* infection. Clin Microbiol Infect. 2016;22 Suppl 4, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2016.03.010>. S63eS81.
- Dauby N, Libois A, van Broeck J, Delmeé M, Vandenberg O, Martiny D. Fatal community-acquired ribotype 002 *Clostridium difficile* bacteremia. Anaerobe. 2017;44:1–2, <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.12.013>.
- Davies KA, Planché T, Wilcox MH. The predictive value of quantitative nucleic acid amplification detection of *Clos-*

- tridium difficile* toxin gene for faecal sample toxin status and patient outcome. PLoS One. 2018;13, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0205941>, e0205941.
12. Eyre DW, Davies KA, Davis G, Fawley WN, Dingle KE, De Maio N, et al., on behalf of the EUCLID Study Group. Two Distinct Patterns of *Clostridium difficile* Diversity Across Europe Indicating Contrasting Routes of Spread. Clin Infect Dis. 2018;67:1035–44, <http://dx.doi.org/10.1093/cid/ciy252>.
 13. EUCAST. EUCAST Clinical Breakpoint Tables v. 11.0, valid from 2021-01-01. Available from: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_11.0.Breakpoint.Tables.pdf.
 14. Guh AY, Hatfield KM, Winston LG, Martin B, Johnston H, Brousseau G, et al. Toxin Enzyme Immunoassays Detect *Clostridioides difficile* Infection with Greater Severity and Higher Recurrence Rates. Clin Infect Dis. 2019;69:1667–74, <http://dx.doi.org/10.1093/cid/ciz009>.
 15. Humphries RM, Uslan DZ, Rubin Z. Performance of *Clostridium difficile* toxin enzyme immunoassay and nucleic acid amplification tests stratified by patient disease severity. J Clin Microbiol. 2013;51:869–73, <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02970-12>.
 16. Indra A, Huhulescu S, Schneeweis M, Hasenberger P, Kernbichler S, Fiedler A, et al. Characterization of *Clostridium difficile* isolates using capillary gel electrophoresis-based PCR ribotyping. J Med Microbiol. 2008;57:1377–82, <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47714-0>.
 17. Kelly CP. Can we identify patients at high risk of recurrent *Clostridium difficile* infection? Clin Microbiol Infect. 2012;18 Suppl 6:21–7, <http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12046>.
 18. Kim J, Kim Y, Pai H. Clinical Characteristics and Treatment Outcomes of *Clostridium difficile* Infections by PCR Ribotype 017 and 018 Strains. PLoS One. 2016;11:e0168849, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0168849>.
 19. Kraft CS, Parrott JS, Cornish NE, Rubinstein ML, Weissfeld AS, McNult P, et al. A laboratory medicine best practices systematic review and meta-analysis of nucleic acid amplification tests (NAATs) and algorithms including NAATs for the diagnosis of *Clostridioides Clostridium difficile* in adults. Clin Microbiol Rev. 2019;32:e00032–18, <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00032-18>. Erratum in: Clin Microbiol Rev. 2019;32:31142497.
 20. Longtin Y, Trottier S, Brochu G, Paquet-Bolduc B, Garenc C, Loungnarath V, et al. Impact of the type of diagnostic assay on *Clostridium difficile* infection and complication rates in a mandatory reporting program. Clin Infect Dis. 2013;56:67–73, <http://dx.doi.org/10.1093/cid/cis840>.
 21. López-Cárdenas S, Torres-Martos E, Mora-Delgado J, Sánchez-Calvo JM, Santos-Peña M, Zapata-López A, et al. The prognostic value of toxin B and binary toxin in *Clostridioides difficile* infection. Gut Microbes. 2021;13:e1884516, <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1884516>.
 22. Madden GR, Petri WA Jr, Costa DVS, Warren CA, Ma JZ, Sifri CD. Validation of Clinical Risk Models for *Clostridioides difficile*-Attributable Outcomes. Antimicrob Agents Chemother. 2022;66:e0067622, <http://dx.doi.org/10.1128/aac.00676-22>.
 23. McDonald LC, Gerding DN, Johnson S, Bakken JS, Carroll KC, Coffin SE, et al. Clinical Practice Guidelines for *Clostridium difficile* Infection in Adults and Children: 2017 Update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA). Clin Infect Dis. 2018;66:e1–48, <http://dx.doi.org/10.1093/cid/cix1085>.
 24. Menon A, Perry DA, Motyka J, Weiner S, Standke A, Penkevich A, et al. Changes in the Association Between Diagnostic Testing Method, Polymerase Chain Reaction Ribotype, and Clinical Outcomes from *Clostridioides difficile* Infection: One Institution's Experience. Clin Infect Dis. 2021;73:e2883–9, <http://dx.doi.org/10.1093/cid/ciaa1395>.
 25. Miller R, Morillas JA, Brizendine KD, Fraser TG. Predictors of *Clostridioides difficile* infection-related complications and treatment patterns among nucleic acid amplification test-positive/toxin enzyme immunoassay-negative patients. J Clin Microbiol. 2020;58:e01764–19, <https://doi.org/10.1128/JCM.01764-19>.
 26. Origüen J, Corbella L, Orellana MA, Fernández-Ruiz M, López-Medrano F, San Juan R, et al. Comparison of the clinical course of *Clostridium difficile* infection in glutamate dehydrogenase-positive toxin-negative patients diagnosed by PCR to those with a positive toxin test. Clin Microbiol Infect. 2018;24:414–21, <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.07.033>.
 27. Origüen J, Orellana MÁ, Fernández-Ruiz M, Corbella L, San Juan R, Ruiz-Ruigómez M, et al. Toxin B PCR amplification cycle threshold adds little to clinical variables for predicting outcomes in *Clostridium difficile* infection: A retrospective cohort study. J Clin Microbiol. 2019;57:e01125–18, <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01125-18>.
 28. Pilate T, Verhaegen J, Van Ranst M, Saegeman V. Binary toxin and its clinical importance in *Clostridium difficile* infection, Belgium. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2016;35:1741–7, <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-016-2719-4>.
 29. Polage CR, Gyorke CE, Kennedy MA, Leslie JL, Chin DL, Wang S, et al. Overdiagnosis of *Clostridium difficile* Infection in the Molecular Test Era. JAMA Intern Med. 2015;175:1792–801, <http://dx.doi.org/10.1001/jamainternmed.2015.4114>.
 30. Polivkova S, Krutova M, Petrlova K, Benes J, Nyc O. *Clostridium difficile* ribotype 176. A predictor for high mortality and risk of nosocomial spread? Anaerobe. 2016;40:35–40, <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.05.002>.
 31. Rao K, Higgins PDR, Young VB. An Observational Cohort Study of *Clostridium difficile* Ribotype 027 and Recurrent Infection. mSphere. 2018;3:e00033–18, <http://dx.doi.org/10.1128/mSphere.00033-18>.
 32. Rao K, Micic D, Natarajan M, Winters S, Kiel MJ, Walk ST, et al. *Clostridium difficile* ribotype 027: Relationship to age, detectability of toxins A or B in stool with rapid testing, severe infection, and mortality. Clin Infect Dis. 2015;61:233–41, <http://dx.doi.org/10.1093/cid/civ254>.
 33. Reigadas E, Alcalá L, Marín M, Martín A, Muñoz P, Bouza E, et al., *difficile* Toxin Cycle Study Group. Prediction of poor outcome in *Clostridioides difficile* infection: A multicentre external validation of the toxin B amplification cycle. Anaerobe. 2020;61:102079, <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2019.102079>.
 34. Reigadas E, Alcalá L, Valerio M, Marín M, Martín A, Bouza E. Toxin B PCR cycle threshold as a predictor of poor outcome of *Clostridium difficile* infection: A derivation and validation cohort study. J Antimicrob Chemother. 2016;71:1380–5, <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkv497>.
 35. Rodríguez-Pardo D, Mirelis B, Navarro F. Infecciones producidas por *Clostridium difficile*. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2013;31:254–63, <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2012.12.010>.
 36. Sante L, Pedroso Y, Castro B, Lecuona M. ¿Existe relación entre el ciclo umbral de la reacción en cadena de la polimerasa y el riesgo de infección grave por *Clostridium difficile*? Enferm Infecc Microbiol Clin. 2018;36:600–1, <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2017.11.015>.
 37. Senchyna F, Gaur RL, Gombar S, Truong CY, Schroeder LF, Banaei N. *Clostridium difficile* PCR cycle threshold predicts free toxin. J Clin Microbiol. 2017;55:2651–60, <https://doi.org/10.1128/JCM.00563-17>.
 38. Shah MD, Balada-Llasat JM, Coe K, Reed E, Sandlund J, Pancholi P. Evaluation of cycle threshold, toxin concentration, and clinical characteristics of *Clostridioides difficile* infection in patients with discordant diagnostic test results. J Clin Microbiol. 2020;58:e01681–19, <https://doi.org/10.1128/JCM.01681-19>.

39. Stubbs SL, Brazier JS, O'Neill GL, Duerden BI. PCR targeted to the 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region of *Clostridium difficile* and construction of a library consisting of 116 different PCR ribotypes. J Clin Microbiol. 1999;37:461–3, <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.37.2.461-463.1999>.
40. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol. 1995;33:2233–9, <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.33.9.2233-2239.1995>.
41. Van den Berg RJ, Schaap I, Templeton KE, Klaassen CH, Kuijper EJ. Typing and subtyping of *Clostridium difficile* isolates by using multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis. J Clin Microbiol. 2007;45:1024–8, <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02023-06>.
42. Van Prehn J, Reigadas E, Vogelzang EH, Bouza E, Hristea A, Guery B, et al. Guideline Committee of the European Study Group on Clostridioides difficile. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: 2021 update on the treatment guidance document for Clostridioides difficile infection in adults. Clin Microbiol Infect. 2021;27 Suppl 2:S1–21, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2021.09.038>.