

Umbral del ciclo de amplificación del gen de la toxina B de *Clostridioides difficile* como predictor de gravedad

Clostridioides difficile toxin B gen amplification cycle threshold as a predictor of severity

Laura Sante¹, Rocío Kohan¹, A. Blanco-Hortas², Zaida Díaz¹ y María Lecuona¹

¹Servicio de Microbiología y Parasitología y Control de la Infección, Hospital Universitario de Canarias. Tenerife, España.

²FIDIS. Fundación Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela.

No se ha recibido financiación para este estudio.

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Recibido: 10 de julio de 2021 / Aceptado: 23 de diciembre de 2021

Resumen

Introducción: La infección por *Clostridioides difficile* (ICD) es la principal causa de diarrea nosocomial, generalmente asociada al consumo de antimicrobianos. Esta infección puede causar desde diarrea no complicada hasta colitis pseudomembranosa o megacolon tóxico. Estudios recientes han intentado relacionar el valor el ciclo umbral (Ct) de la RT-PCR con la mortalidad, como un método rápido, sencillo, objetivo y eficaz. **Objetivo:** Evaluar el Ct como predictor de mala evolución en pacientes con y sin criterio clínico de dicha gravedad. **Pacientes y Métodos:** Realizamos un estudio retrospectivo entre enero 2015 y diciembre 2018, incluyendo todos los pacientes del área de referencia del Hospital Universitario de Canarias en Tenerife (396.483 habitantes) en pacientes con criterios clínicos de gravedad (de acuerdo a la Guía para la Práctica Clínica de la enfermedad por *C. difficile* de la Sociedad de Epidemiología del Cuidado de la Salud de América (SHEA) y la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de Norteamérica (IDSA) y pacientes sin criterios clínicos de gravedad evaluando el Ct como predictor de mala evolución. **Resultados:** Se diagnosticó un total de 202 episodios de ICD. El 77,7% (n = 157) presentó criterios clínicos de gravedad. La presencia de colitis ulcerosa (p ≤ 0,001), fiebre (p ≤ 0,001), leucocitosis (p ≤ 0,001), neutrofilia (p ≤ 0,001), creatininemia (p = 0,005) se presentaron como factores de riesgo para el desarrollo de ICD grave. El sexo femenino, la institucionalización, el ingreso previo y el *exitus* se describieron con mayor frecuencia en el grupo con ICD-G, no encontrando diferencias significativas. No encontramos diferencias respecto a los días de estancia previa, o de

Abstract

Background: *Clostridioides difficile* infection (CDI) is the main cause of nosocomial diarrhea, generally associated with the use of antibiotics. This infection can cause uncomplicated diarrhea or pseudomembranous colitis or toxic megacolon. Recent studies have attempted to relate the threshold cycle (Ct) value of RT-PCR with mortality, as a fast, simple, objective and efficient method. **Aim:** To evaluate Ct as a predictor of poor outcome in patients with *C. difficile* disease with/without clinical signs of severity. **Methods:** We carried out a retrospective study between January 2015 and December 2018, including all patients in the reference area of the Hospital Universitario de Canarias in Tenerife (396,483 inhabitants) in patients with clinical criteria of severity and patients without clinical severity criteria (according to the guide for the clinical practice of CDI of the Society of Healthcare Epidemiology of America (SHEA) and the Infectious Diseases Society of North America (IDSA). **Results:** A total of 202 CDI episodes were diagnosed. 77.7% (n = 157) presented clinical severity criteria. The presence of ulcerative colitis (p ≤ 0.001), fever (p ≤ 0.001), leukocytosis (p ≤ 0.001), neutrophilia (p ≤ 0.001), creatininemia (p = 0.005) were presented as risk factors for the development of severe CDI (S-CDI). Female sex, institutionalization, previous admission and death were described more frequently in the group with S-CDI, not finding significant differences. We found no differences with respect to the days of previous stay, or of post-CDI stay, although in the latter, the mean was higher in the case of S-CDI patients. No significant differences were found in terms of Ct in both groups; being

Correspondencia a:

Laura Sante Fernández
laurasante@hotmail.com

estancia post-ICD, aunque en este último, la media fue mayor en el caso de los pacientes con ICD-G. No se encontraron diferencias significativas en cuanto al Ct en ambos grupos; siendo sólo un punto menor en pacientes con criterio de gravedad (Ct = 26,1) que sin criterios de gravedad (Ct = 27,4) ($p = 0,326$). **Conclusión:** Basándonos en los resultados de nuestro estudio, no ha sido posible la implementación sistemática del valor Ct como predictor de gravedad al informe clínico, no siendo posible extrapolar esta variable predictora de enfermedad por *C. difficile*-G y estandarizar el valor Ct como factor predictor de gravedad.

Palabras clave: *Clostridioides difficile*; score de gravedad; ciclo umbral; amplificación; gen de toxina B; predicción de gravedad.

only one point lower in patients with severity criteria (Ct = 26.1) than without severity criteria (Ct = 27.4) ($p = 0.326$). **Conclusion:** Based on the results of our study, it has not been possible to systematically implement the Ct value as a predictor of severity to the clinical report, and it is not possible to extrapolate this predictive variable from S-CDI and standardize the Ct value as a predictor of severity.

Keywords: *Clostridioides difficile*; severity score; threshold cycle; amplification; toxin B gen; severity prediction.

Introducción

La infección por *Clostridioides difficile* (ICD) es la principal causa de diarrea nosocomial en adultos, generalmente asociada al consumo de antimicrobianos. Esta infección puede causar desde diarrea no complicada hasta colitis pseudomembranosa o megacolon tóxico. La ICD se asocia a un aumento de morbi-mortalidad, estancia media hospitalaria y gasto sanitario¹.

Se ha observado que 12 a 18% de los pacientes pueden progresar a gravedad y 20% tener recurrencias². Por ello, es necesario esclarecer qué pacientes son susceptibles de mala evolución por ICD, para elegir un tratamiento adecuado y prevenir un desenlace fatal. Aunque se han propuesto diferentes factores de riesgo para predecir la gravedad de la infección³, no ha habido consenso. Se han estudiado criterios clínicos que puedan predecir ICD grave (ICD-G), mortalidad y/o recurrencias, pero estos no han sido aceptados universalmente⁴. Por otro lado, parámetros microbiológicos, como citotoxicidad, esporulación/germinación y sensibilidad antimicrobiana, no han demostrado utilidad para predecir una mala evolución de ICD⁵.

Estudios recientes han intentado relacionar el valor el ciclo umbral (Ct) de la RT-PCR (sigla en inglés para reacción de polimerasa en cadena-transcriptasa reversa) con la mortalidad, como un método rápido, sencillo, objetivo y eficaz⁶. Reigadas y cols.², describieron que los valores bajos de Ct de amplificación de la toxina B por reacción de polimerasa en cadena (RPC) de las muestras recogidas en el momento inicial del diagnóstico se asociaban a un mal pronóstico de marcador de ICD. Jazmati y cols.⁶, concluyen que en su estudio hubo una tendencia hacia valores más altos de Ct en los pacientes colonizados que aquellos diagnosticados de ICD.

En un estudio previo, nuestro grupo analizó los factores de riesgo en 62 pacientes con ICD, así como el Ct como medida de carga bacteriana de *C. difficile*, y su asociación con mal pronóstico de ICD⁷. Observamos que en pacientes con criterios clínicos de gravedad (según la Guía para la práctica clínica de ICD de la Sociedad de Epidemiología del Cuidado de la Salud de América (SHEA) y la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América [IDSA]⁸) el Ct era menor que en el grupo de pacientes sin criterios clínicos.

Nuestro objetivo es evaluar la hipótesis del papel del Ct como mar-

cador predictor de mala evolución en un tamaño muestral más amplio, en aras de que los pacientes puedan beneficiarse de una adecuada opción terapéutica de una forma precoz.

Pacientes y Métodos

Población y diseño del estudio

Estudio retrospectivo entre enero de 2015 y diciembre de 2018, incluyendo todos los pacientes del área de referencia del Hospital Universitario de Canarias en Tenerife (396.483 habitantes), con solicitud de diagnóstico de ICD. Se recogieron datos demográficos, comorbilidades, signos y síntomas de infección, marcadores analíticos (recuento leucocitario, neutrofilia, creatininemia), fecha de ingreso, diagnóstico, alta, *exitus* en el episodio y a los 30 días, ingreso en los tres meses previos al episodio, institucionalización. Los valores Ct fueron recogidos de la base de datos del GeneXpert® System (Cepheid). Los pacientes se agruparon en ICD grave o no grave, según los criterios SHEA/IDSA⁸

Métodos microbiológicos

Las muestras se analizaron según algoritmo de tres pasos hasta marzo 2017 y posteriormente se actualizó al algoritmo de dos pasos hasta el final del estudio.

El primer algoritmo consistió en la detección inmunocromatográfica de glutamato-deshidrogenasa (GDH) (Wampole® C.DIFF-QUIK-CHEK®, Alere), detección de toxina (Wampole® TOX-A/B-QUIK-CHEK®, Alere) y RT-PCR (Xpert™ *C. difficile*).

El segundo algoritmo consistió en detección de GDH, seguida de RT-PCR.

Definiciones

Caso ICD: Presencia de diarrea con prueba microbiológica positiva. Se consideraron independientes aquellos episodios separados por más de ocho semanas.

ICD grave (ICD-G): Según criterios SHEA-IDSA⁸: La presencia de dos o más de los siguientes factores: síntomas y signos de colitis grave, ingreso en unidad de cuidados intensivos, edad ≥ 65 años, leucocitosis > 10.000 céls/mL, neutrofilia > 7.500 céls/mL, creatininemia $\geq 1,5$ mg/

dL, temperatura > 38,5 °C, > 10 deposiciones diarreas/día, íleo paralítico o peritonitis.

Mal pronóstico: Aparición de primer episodio de ICD-G, grave-complicado y/o muerte por todas las causas dentro de las primeras ocho semanas post-tratamiento⁹

Análisis estadístico

Las características de la muestra y sus factores de riesgo a ICD-G se describen resumiendo las variables nominales con n (%), las de escala con distribución normal con media ± DE y se comparan mediante la prueba χ^2 de Pearson y las que no lo hagan con mediana (P_{10} - P_{90}) comparadas con el test t de Student (significación estadística $p \leq 0,05$).

Resultados

En el periodo de estudio se diagnosticó un total de 202 episodios de ICD, incluyéndose de cada paciente la primera muestra positiva del episodio. El 54,5% (n = 110) de los pacientes fueron mujeres con edad media de 67 ± 15 años, de los cuales 57,6% (n = 117) tenía ≥ 65 años. En cuanto a los servicios de origen: 40,6% procedía de servicios médicos, 26,2% del servicio de urgencias y 20,8% de servicios quirúrgicos. Se produjo *exitus* en el episodio en 11,4% de casos y 6,9% a los 60 días. Según la clasificación de ICD: 47% fue nosocomial, 17,8% recurrente, 7,3% asociada a cuidados sanitarios (ACS) y 15,3% comunitaria. La estancia media pre-ICD fue 5 días (1-42) y post-ICD de 11 días (2-49). El 7,5% de los casos fueron diagnosticados al ingreso y 5,5% fueron dados de alta el mismo día del diagnóstico. El 54% de los pacientes ingresó en los tres meses previos y 3% eran pacientes institucionalizados (Tabla 1).

El 77,7% (n = 157) presentó criterios clínicos de gravedad. La presencia de colitis ulcerativa ($p \leq 0,001$), fiebre ($p \leq 0,001$), leucocitosis ($p \leq 0,001$), neutrofilia ($p \leq 0,001$) y creatininemia elevada ($p = 0,005$) se presentaron como factores de riesgo para el desarrollo de ICD grave (Tabla 2).

El sexo femenino, la institucionalización, el ingreso previo y el *exitus letalis* se describieron con mayor frecuencia en el grupo con ICD-G, no encontrando diferencias significativas. No encontramos diferencias respecto a los días de estancia previa, o de estancia post-ICD, aunque en este último, la media fue mayor en el caso de los pacientes con ICD-G (Tabla 2).

La mayoría de los diagnósticos se realizó en servicios médicos, seguido de servicios quirúrgicos y urgencias, en ambos grupos. Las ICD fueron mayoritariamente clasificadas como nosocomiales, ACS y recurrentes en pacientes de ambos grupos. En las ICD comunitarias, el porcentaje fue mayor en el caso de ICD-G (17,2%) frente al no grave (6,7%) (Tabla 2).

Tabla 1. Características clínico-epidemiológicas de los pacientes con infección por *Clostridioides difficile* (ICD)

Características	Resultados
Total de pacientes/episodios	202
Sexo (femenino) n (%)	110 (54,5)
Edad (media ± DE)	67 ± 15
Servicio (n (%))	
Médicos	82 (40,6)
Urgencias	56 (26,2)
Quirúrgicos	42 (20,8)
Oncohematológicos	19 (9,4)
Intensivos	6 (3)
Clasificación (n (%))	
Nosocomial	95 (47)
Recurrente	36 (17,8)
Asociada a cuidados sanitarios	35 (17,3)
Comunitaria	31 (15,3)
Indeterminado	5 (2,5)
<i>Exitus letalis</i> (n (%))	
Episodio	23 (11,4)
60 días	14 (6,9)
Estancia pre-ICD, días mediana (P_{10} - P_{90})	5 (1-42)
Estancia post-ICD, días mediana (P_{10} - P_{90})	11 (2-49)
Ingreso previo (3 meses anteriores) n (%)	109 (54)
Institucionalizado (n (%))	6 (3)

No se encontraron diferencias significativas en cuanto al Ct en ambos grupos; siendo sólo un punto menor en pacientes con criterio de gravedad (Ct = 26,1) que sin criterios de gravedad (Ct = 27,4) ($p = 0,326$) (Figura 1).

Discusión y conclusiones

Los factores clínicos que se relacionaron con gravedad como colitis grave, fiebre (> 38,5°C), y alteraciones de laboratorio: neutrofilia (> 7.500 céls/mL) y/o leucocitosis (> 10.000 céls/mL), ya han sido descritos en las guías y señalados por otros estudios¹⁰.

Los sujetos de nuestro estudio fueron mayormente mujeres, sin diferencias significativas para el desarrollo de la enfermedad, dato publicado por otros autores^{11,12}. Sin embargo, Reigadas y cols.¹⁰, observaron que la mayoría de sus pacientes eran hombres, aunque las mujeres desarrollaban ICD-G más frecuentemente. Este grupo describe también un porcentaje ligeramente mayor en pacientes con ICD-G que ingresaron en los tres meses previos, pero sin

Tabla 2. Diferencia de la presencia de parámetros clínicos de infección por *Clostridioides difficile* (ICD) grave entre los grupos con y sin ICD grave

Parámetro	ICD grave n = 157	ICD no grave n (%) n = 45	Valor de p
≥ 65 años n (%)	94 (59,8)	23 (51,4)	0,293
Colitis grave n (%)	40 (36,4)	3 (6,6)	≤ 0,001
Colitis TAC n (%)	10 (6,3)	0 (0,0)	0,082
Fiebre > 38,5 °C n (%)	34 (21,6)	0 (0,0)	≤ 0,001
> 10 diarreas/día n (%)	33 (21,0)	0 (0,0)	≤ 0,001
Ileo paralítico n (%)	6 (3,8)	0 (0,0)	0,183
Peritonitis n (%)	6 (3,8)	0 (0,0)	0,183
Leucocitosis > 10.000 céls/mL n (%)	87 (55,4)	0 (0,0)	≤ 0,001
Neutrofilia > 7.500 céls/mL n (%)	105 (66,9)	3 (6,6)	≤ 0,001
Creatinina 1,5 veces valor basal n (%)	46 (29,3)	4 (8,8)	0,005
Sexo (femenino) n (%)	87 (55,4)	23 (51,1)	0,609
Ingreso previo (≤ 3 meses) n (%)	85 (54,1)	23 (51,1)	0,719
Institucionalizado n (%)	5 (3,1)	1 (2,2)	0,737
Estancia pre-ICD días	4 (1 – 16)	7 (2 – 27)	0,180
Estancia post-ICD días	11 (6 – 24)	8 (4 – 18)	0,210
<i>Exitus letalis</i> en el episodio n (%)	18 (11,5)	5 (11,1)	0,947
<i>Exitus letalis</i> a los 30 días n (%)	11 (7,7)	3 (6,6)	0,937
Ct valor	27,4 (23,7 – 32,3)	26,1 (23,7 – 30,3)	0,326
Servicios n ((%)			
Intensivos	1 (2,2)	5 (3,1)	
Quirúrgicos	10 (22,2)	32 (20,4)	
Médicos	19 (42,2)	63 (40,1)	0,391
Oncohematológicos	7 (15,6)	12 (7,6)	
Urgencias	8 (17,8)	45 (28,8)	
Clasificación n (%)			
Nosocomial	28 (62,2)	70 (44,6)	
Asociado a cuidado sanitario	7 (15,5)	28 (17,8)	
Comunitario	3 (6,7)	27 (17,2)	0,168
Indeterminado	0 (0,0)	5 (3,2)	
Recurrente	7 (15,6)	27 (17,2)	

obtener significación estadística; otro estudio realizado en Israel¹³ observó que 75,3% de los pacientes que habían tenido un ingreso en los últimos seis meses eran portadores de *C. difficile* frente a 54,7% que no había ingresado previamente. Estos datos concuerdan con los reflejados en nuestro estudio, los pacientes con un ingreso anterior eran diagnosticados con mayor frecuencia de ICD.

La mortalidad en el episodio y a los 30 días fue ligeramente superior en pacientes con ICD-G. Estos porcentajes fueron levemente superiores a los descritos en otros estudios¹⁰.

Al igual que otros trabajos^{10,12}, hemos encontrado mayoritariamente ICD nosocomiales en ambos grupos.

Publicaciones recientes han observado que en los pacientes que tenían peor pronóstico se obtuvo un valor menor de Ct en su RT-PCR^{2,6}. Basándonos en los resultados de nuestro estudio, no ha sido posible la implementación sistemática del valor Ct como predictor de gravedad al informe clínico, al igual que el estudio realizado por Origüen y cols., en el Hospital 12 de Octubre¹¹.

Además, el valor óptimo de Ct varía entre los estudios según el criterio de valoración pronosticado, por ejemplo: 23,5 para correlacionarse con alto riesgo de mal pronóstico según Reigadas y cols.²; 26,35 como predictor de toxina libre mediante EIA de membrana rápida según Senchyna y cols.¹⁴, y 28 para el uso de una placa EIA de toxina A/B como método de referencia para pacientes con cáncer según Kamboj y cols.¹⁵. Por lo que no se puede deducir en qué rango de valores de Ct se encuentra el factor de mal pronóstico, debido a la variabilidad entre estudios.

Por lo tanto, creemos que no es posible extrapolar esta

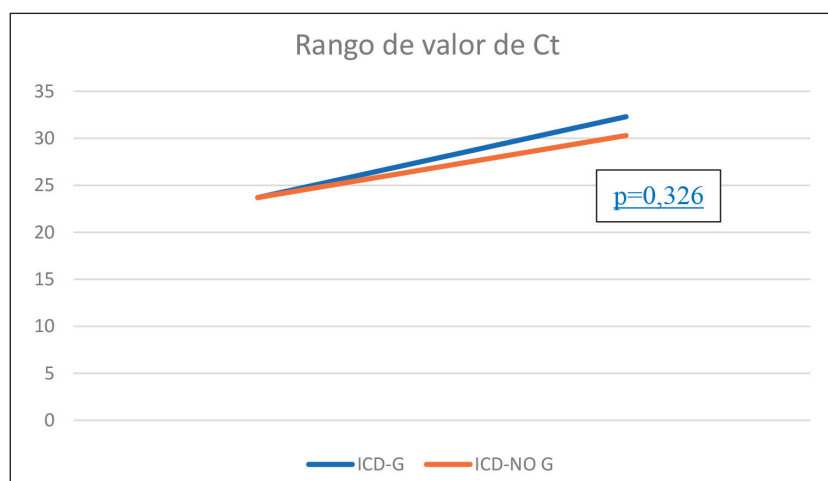


Figura 1. Rango de valores de Ct en la ICD-grave (ICD-G) e ICD- no grave (ICD-No G).

variable predictiva de ICD-G y estandarizar el valor Ct como factor predictor de gravedad.

Nuestro estudio presenta limitaciones inherentes al carácter retrospectivo: los resultados relacionados con algunas variables deben tomarse con cautela, ya que se basan en la evaluación retrospectiva de los registros médicos. Además, los criterios utilizados por los médicos para solicitar una prueba de ICD pueden ser diferentes a los utilizados en otros centros. Otra limitación es el carácter unicéntrico del trabajo, siendo necesario realizar estudios multicéntricos para poder establecer una correlación.

Referencias bibliográficas

- Asensio A, Bouza E, Grau S, Rubio-Rodríguez D, Rubio Terrés C. Cost of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in Spain. Rev Esp Salud Publica. 2013; 87: 25-33. https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1135-57272013000100004.
- Reigadas E, Alcalá L, Valerio M, Marín M, Martín A, Bouza E, et al. 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. doi: 10.1093/jac/dkv497.
- Rodríguez-Pardo D, Almirante B, Bartolomé RM, Pomar V, Mirelis B, Navarro F, et al. Epidemiology of *Clostridium difficile* infection and risk factors for unfavorable clinical outcomes: results of a hospital-based study in Barcelona, Spain. J Clin Microbiol. 2013; 51(5): 1465-73. doi: 10.1128/jcm.03352-12.
- Crook D W, Walker AS, Kean Y, Weiss K, Cornely O A, Miller M A, et al. Fidaxomicin versus vancomycin for *Clostridium difficile* infection: Meta-analysis of pivotal randomized controlled trials. Clin Infect Dis. 2012; 55 Suppl 2: S93-103. doi: 10.1093/cid/cis499.
- Oka K, Osaki T, Hanawa T, Kurata S, Okazaki M, Manzoku T, et al. Molecular and microbiological characterization of *Clostridium difficile* isolates from single, relapse, and reinfection cases. J Clin Microbiol 2012; 50: 915-21. doi: 10.1128/JCM.05588-11.
- Jazmati N, Hellmich M, Licanin B, Plum G, Kaasch A J. PCR cycle threshold value predicts the course of *Clostridium difficile* infection. Clin Microbiol Infect. 2016; 22 (2): e7-8. doi: 10.1016/j.cmi.2015.09.012.
- Sante L, Y, Pedrosa Y, Castro B, Lecuona M. Is there a relationship between the polymerase chain reaction cycle threshold and the risk of severe *Clostridium difficile* infection? Enferm Infecc Microbiol Clin. 2018; 36(9): 600-1. doi: 10.1016/j.eimc.2017.11.015.
- Cohen S H, Gerding D N, Johnson S, Kelly C P, Loo V G, McDonald L C, et al. Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults: 2010 update by the Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA) and the Infectious Diseases Society of America (IDSA). Infect Control Hosp Epidemiol. 2010; 31(5): 431-55. doi: 10.1086/651706.
- Origüen J, Corbella L, Orellana M A, 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. doi: 10.1016/j.cmi.2017.07.033.
- Reigadas E, Alcalá L, Marín M, Martín A, Bouza E. Clinical, immunological and microbiological predictors of poor outcome in *Clostridium difficile* infection. Diagn Microbiol Infect Dis. 2017; 88(4): 330-4. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2017.05.005.
- Origüen J, Orellana M Á, Fernández-Ruiz M, Corbella L, San Juan R, 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 Jan 30;57(2):e01125-18. doi: 10.1128/JCM.01125-18.
- 12.- De Francesco M A, Lorenzin G, Piccinelli G, Corbellini S, Bonfanti C, Caruso A. Correlation between *tcdB* gene PCR cycle threshold and severe *Clostridium difficile* disease. *Anaerobe*. 2019; 59: 141-4. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2019.06.017>.
- 13.- Meltzer E, Smollan G, Huppert A, Fluss R, Tal I, Gilboa M, et al; SHIC research group. Universal screening for *Clostridioides difficile* in a tertiary hospital: risk factors for carriage and clinical disease. *Clin Microbiol Infect*. 2019; 25(9): 1127-32. doi: 10.1016/j.cmi.2019.02.002.
- 14.- Senchyna F, Gaur R L, Gombar S, Truong C Y, Schroeder L F, Banaci N. 2017. *Clostridium difficile* PCR cycle threshold predicts free toxin. *J Clin Microbiol* 55: 2651-60. doi: 10.1128/JCM.00563-17.
- 15.- Kamboj M, Brite J, McMillen T, Robilotti E, Herrera A, Sepkowitz K, Potential of real-time PCR threshold cycle (CT) to predict presence of free toxin and clinically relevant *C. difficile* infection (CDI) in patients with cancer. *J Infect* 2018; 76: 369-75. doi: 10.1016/j.jinf.2017.12.001.