

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



ANÁLISIS DE FACTORES DE VIRULENCIA EN AISLAMIENTOS  
DE *Clostridium difficile* DE DOS HOSPITALES  
DE TERCER NIVEL DE MÉXICO

Por

M. C. JULIO ADRIÁN MARTÍNEZ MELÉNDEZ

Como requisito parcial para obtener el grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

Diciembre, 2018

**ANÁLISIS DE FACTORES DE VIRULENCIA EN AISLAMIENTOS  
DE *Clostridium difficile* DE DOS HOSPITALES  
DE TERCER NIVEL DE MÉXICO**

**Comité de Tesis:**

---

Dra. Licet Villarreal Treviño  
Presidente

---

Dra. Elvira Garza González  
Secretario

---

Dra. María del Rayo Morfin Otero  
Vocal

---

Dr. Juan Francisco Contreras Cordero  
Vocal

---

Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna  
Vocal

**ANÁLISIS DE FACTORES DE VIRULENCIA EN AISLAMIENTOS  
DE *Clostridium difficile* DE DOS HOSPITALES  
DE TERCER NIVEL DE MÉXICO**

**Dirección de Tesis:**

---

Dra. Licet Villarreal Treviño  
Director

---

Dra. Elvira Garza González  
Director externo

ANÁLISIS DE FACTORES DE VIRULENCIA EN AISLAMIENTOS  
DE *Clostridium difficile* DE DOS HOSPITALES  
DE TERCER NIVEL DE MÉXICO

Presentado por: M. C. Julio Adrián Martínez Meléndez

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología General de la Facultad de Ciencias Biológicas, bajo la dirección de la Dra. Licet Villarreal Treviño y en el Laboratorio de Diagnóstico Microbiológico de Alta Especialidad del Servicio de Gastroenterología en el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, bajo la dirección de la Dra. Elvira Garza González, ambos de la Universidad Autónoma de Nuevo León; así como en el Instituto de Patología Infecciosa y Experimental, del Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde”, bajo la supervisión de la Dra. Rayo Morfin Otero y el Laboratorio de Ciencias Biológicas y Ambientales de la Universidad de Hertfordshire en Hatfield, Reino Unido, bajo la asesoría del Dr. Simon Baines.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios de posgrado.

A la Facultad de Ciencias Biológicas, al Laboratorio de Diagnóstico Microbiológico de Alta Especialidad (LADIME) del Servicio de Gastroenterología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, al Instituto de Patología Infecciosa y Experimental, del Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde”, y el Laboratorio de Ciencias Biológicas y Ambientales de la Universidad de Hertfordshire en Hatfield, Reino Unido por las facilidades brindadas para la realización de este proyecto.

A la Dra. Licet Villarreal Treviño por su gran apoyo de principio a fin, por los consejos y la invaluable confianza que me ha brindado desde el inicio; así como la paciencia y el compromiso que siempre ha mostrado.

A la Dra. Elvira Garza González, por la extraordinaria guía en el camino de la investigación; gracias por su esfuerzo, dedicación, conocimientos, experiencia, y motivación; así como el apoyo profesional y personal brindado durante todo este tiempo.

A la Dra. Rayo Morfín Otero; agradezco de corazón por todas las oportunidades brindadas, así como su motivación, comprensión y ayuda. Agradezco también al Dr. Eduardo Rodríguez Noriega por su ayuda y los excelentes momentos compartidos.

Al comité de tesis integrado por el Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna y el Dr. Juan Francisco Contreras Cordero por sus acertadas y oportunas observaciones.

A Flora Cruz López, una invaluable persona, excelente consejera, cómplice y apoyo en todo momento. Nunca terminaré de agradecerte por todo tu ayuda. Faltan las palabras para poder plasmar lo que ha significado contar contigo en todo este tiempo.

A Jessica Gutiérrez por tu amistad desde que llegamos al laboratorio, por los grandes momentos que nos ha tocado vivir juntos, tanto buenos como malos. A todos los que han estado y estamos recorriendo el mismo camino: Abril, Herrera, Verónica Villarreal, Aurora Luna y Laura Tijerina, a quien agradezco su paciencia y compañerismo.

A todos en el laboratorio por la ayuda prestada, el apoyo y las enseñanzas: Paola Bocanegra, Samantha Flores y Soraya Mendoza, Lucy Acevedo y Gregorio Bustos. Agradezco a Daniel López, quien me introdujo en el mundo de *C. difficile*.

A los más pequeños del laboratorio: Jesús Galván, Oscar Alonso y Martin Loera; así como a Jaime García y Juan José Bernal, quienes son inspiración para seguir avanzando.

A mis padres y familia, quienes siguen creyendo en mí y han tenido paciencia infinita.

## **DEDICATORIA**

*A mi padre, Julio Martínez Hernández, gran ejemplo a seguir.*

*Siempre estás en mis pensamientos y espero el día en que nos volvamos a ver.*

# ÍNDICE

<b>SECCIÓN</b>	<b>Página</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	IV
<b>DEDICATORIA</b>	V
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	X
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	XI
<b>LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS</b>	XII
<b>RESUMEN</b>	XIII
<b>ABSTRACT</b>	XIV
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>2. ANTECEDENTES</b>	3
2.1. Características microbiológicas y hábitat.	3
2.2. Infección por <i>C. difficile</i> .	4
2.3. Factores de virulencia y patogénesis.	6
3.3.1 Producción de toxinas.	7
3.3.2 Esporulación	10
3.3.3 Producción de biopelícula.	11
2.4. Antibióticos asociados a la ICD.	12
2.5. Epidemiología molecular.	13
2.6. Diagnóstico de la ICD.	16

2.7. Tratamiento y farmacorresistencia.	18
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	21
<b>4. HIPÓTESIS</b>	22
<b>5. OBJETIVOS</b>	23
5.1. Objetivo general.	23
5.2. Objetivos específicos.	23
<b>6. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	24
6.1. Obtención de muestras y aislamientos.	24
6.2. Identificación de aislamientos.	25
6.2.1. Extracción de ADN.	25
6.2.2. Identificación por PCR.	26
6.2.3. Identificación por MALDI-TOF.	27
6.3. Tipificación de aislamientos.	28
6.3.1. Toxinas A y B y toxina binaria.	28
6.3.2. Deleciones en <i>tcdC</i> .	29
6.4. Determinación de ribotipos.	30
6.5. Determinación del perfil de susceptibilidad.	32
6.6. Evaluación de la producción de biopelícula.	34
6.7. Determinación del desprendimiento de biopelícula.	36
6.8. Evaluación de la expresión de genes asociados a adherencia.	38
6.8.1 Ensayos de expresión.	38

6.8.2 Extracción de RNA.	38
6.8.3 Estandarización de PCR en tiempo real.	39
6.8.4 Determinación de la expresión de <i>cwp84</i> y <i>slpA</i> .	40
6.9. Análisis estadístico.	41
<b>7. RESULTADOS</b>	<b>43</b>
7.1. Aislamientos.	43
7.2. Tipificación y ribotipos.	43
7.3. Susceptibilidad de aislamientos.	45
7.4. Producción de biopelícula y ensayos de desprendimiento.	47
7.5. Expresión de <i>cwp84</i> y <i>slpA</i> .	49
<b>8. DISCUSIÓN</b>	<b>51</b>
<b>9. CONCLUSIONES</b>	<b>61</b>
<b>10. PERSPECTIVAS</b>	<b>62</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>63</b>
<b>RESUMEN BIOGRÁFICO</b>	<b>73</b>
<b>ANEXOS Y APÉNDICES</b>	<b>74</b>
I. Preparación de reactivos y soluciones.	74
II. Procedencia y resultados de tipificación molecular por aislamiento.	78
III. Concentraciones mínimas inhibitorias por aislamiento.	82
IV. Producción de biopelícula y ensayos de desprendimiento.	86

V. Resultados de ensayos de expresión.	88
VI. Artículos	90

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
1. Oligonucleótidos utilizados para la identificación de <i>C. difficile</i> .	27
2. Oligonucleótidos utilizados para la tipificación de aislamientos.	29
3. Oligonucleótidos utilizados para la detección de deleciones en <i>tcdC</i> .	30
4. Determinación de deleciones en <i>tcdC</i> .	30
5. Oligonucleótidos utilizados para la ribotipificación de los aislamientos.	31
6. Puntos de corte para los antimicrobianos utilizados.	34
7. Oligonucleótidos utilizados para la PCR en tiempo real.	39
8. Correlación de ribotipos con genotipo.	44
9. Susceptibilidad global de aislamientos.	45
10. Susceptibilidad de los ribotipos 027 y 001.	46
11. Producción de biopelícula y ribotipos.	47
12. Rangos y medias de desprendimiento por tratamiento y ribotipo.	48
13. Expresión relativa media de los aislamientos.	50

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Etapas clave en el desarrollo de la ICD.	6
2. Locus de patogenicidad (PaLoc).	8
3. Proporciones de desprendimiento por tratamiento en ribotipo 027.	49
4. Proporciones de desprendimiento por tratamiento en ribotipo 001.	49

## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

<b>CLSI</b>	Clinical and Laboratory Standards Institute
<b>CMI</b>	Concentración mínima inhibitoria
<b>g</b>	Gramos
<b>h</b>	Horas
<b>kb</b>	Kilobases
<b>L</b>	Litros
<b>M</b>	Concentración molar
<b>mg</b>	Miligramos
<b>min</b>	Minutos
<b>mL</b>	Mililitros
<b>mM</b>	Concentración milimolar
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PM</b>	Peso molecular
<b>μMol</b>	Concentración en micromoles
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>s</b>	Segundos
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colonias
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>V</b>	Voltios
<b>μg</b>	Microgramos
<b>μL</b>	Microlitros

## RESUMEN

*Clostridium difficile* es una bacteria Gram positiva, anaerobia estricta y productora de esporas y es la causa infecciosa más común de diarrea asociada a la atención de la salud. La infección por *C. difficile* (ICD) se asocia al uso de terapia antimicrobiana ya que alteran la microbiota intestinal y *C. difficile* puede colonizar el intestino si la microbiota normal intestinal está disminuida o ausente. El objetivo de este trabajo fue analizar factores de virulencia que contribuyen a la patogénesis, tales como producción de toxinas, formación de biopelícula y expresión de proteínas involucradas en la adhesión en aislamientos clínicos de *C. difficile*. Se aisló *C. difficile* a partir de pacientes con ICD y detectaron los genes de las toxinas A, B y toxina binaria por medio de PCR; además, se determinaron los ribotipos por PCR y electroforesis convencional y capilar. Se evaluó la susceptibilidad a antimicrobianos por dilución en agar. Se determinó la producción de biopelícula mediante tinción con cristal violeta y se determinó su composición mediante ensayos de desprendimiento con proteinasa K, NaIO<sub>4</sub> y DNasa I. Finalmente, se evaluó la expresión de *cwp84* y *slpA* mediante PCR en tiempo real. Se recuperaron 132 aislamientos a partir de 332 muestras (39.8 %); todos los aislamientos fueron *tcdA+* y *tcdB+*; además 89 (67.4%) presentaron la delección de 18 pb en *tcdC*. La ribotipificación clasificó a 81 (61.4%) aislamientos como ribotipo 027 y a 18 (13.6%) aislamientos como ribotipo 001. Se encontró susceptibilidad reducida (SR) a ciprofloxacino, moxifloxacino, eritromicina, clindamicina y rifampicina en más del 70% de los aislamientos; no hubo SR a fidaxomicina o tetraciclina; sin embargo hubo SR a vancomicina (31%) y metronidazol (17.4%). Más del 70% (98/132) fueron productores fuertes de biopelícula. Los ensayos mostraron el mayor desprendimiento de la biopelícula con el tratamiento de proteinasa K (>90%). En los aislamientos de ribotipo 001 se encontró sobreexpresión de *cwp84* en 40% de ellos y *slpA* fue sobreexpresado en el 100%; en el ribotipo 027 hubo sobreexpresión de *cwp84* en un aislamiento solamente; mientras que *slpA* fue sobreexpresado en 5/13 (38.5%) aislamientos. Los ribotipos más frecuentes en México son el 027 y 001 y son poseen farmacorresistencia, además de producir biopelícula; las proteínas contribuyen principalmente a la formación de la matriz de la biopelícula. SlpA se sobre expresa en las cepas ribotipo 001.

## ABSTRACT

*Clostridium difficile* is a Gram positive, spore-producing, strict anaerobic bacterium and is the most common infectious cause of health-care associated diarrhea. *C. difficile* infection (CDI) is associated with substantial morbidity and mortality; in addition, it is associated with antimicrobial therapy since they alter the intestinal microbiota and *C. difficile* can colonize the intestine if the normal intestinal microbiota is diminished or absent. The objective of this work was to analyze virulence factors that contribute to pathogenesis, such as toxin production, biofilm formation and expression of proteins involved in adhesion in clinical isolates of *C. difficile*. *C. difficile* was isolated from patients with CDI and the genes of toxins A, B and binary toxin were detected by PCR; In addition, ribotypes were determined by PCR and conventional and capillary electrophoresis. Antimicrobial susceptibility was evaluated by agar dilution. The production of biofilm was determined by violet crystal staining and its composition was determined by detachment assays with proteinase K, NaIO<sub>4</sub> and DNase I. Finally, the expression of *cwp84* and *slpA* was evaluated by real-time PCR. One hundred thirty two isolates were recovered from 332 samples (39.8%); all isolates were *tcdA*<sup>+</sup> and *tcdB*<sup>+</sup>; in addition, 89 isolates (67.4%) presented the 18 bp deletion in *tcdC*. Ribotyping classified 81 (61.4%) isolates as ribotype 027 and 18 (13.6%) isolates as ribotype 001. Reduced susceptibility (RS) to ciprofloxacin, moxifloxacin, erythromycin, clindamycin and rifampicin was found in more than 70% of the isolates; there was no RS to fidaxomicin or tetracycline; however there was RS to vancomycin (31%) and metronidazole (17.4%). More than 70% of isolates (98/132) were strong biofilm producers. The highest detachment of biofilm was achieved with the proteinase K treatment (> 90%). Overexpression of *cwp84* was found in 40% of isolates of ribotype 001, and *slpA* was overexpressed in 100%; in ribotype 027 there was overexpression of *cwp84* in one isolation only; while *slpA* was overexpressed in 5/13 (38.5%) isolates. The most frequent ribotypes in Mexico are 027 and 001 and they present drug resistance and are biofilm producers; the proteins contribute mainly to the formation of the biofilm matrix. *slpA* is over expressed in strains ribotype 001.

# 1. INTRODUCCIÓN

*Clostridium difficile* es una bacteria Gram positiva, anaerobia estricta y productora de esporas y es la causa infecciosa más común de diarrea asociada a la atención de la salud. La infección por *C. difficile* (ICD) tiene un impacto sustancial en la morbilidad y la mortalidad; además, aumenta el costo de los sistemas de atención de salud. La ICD se asocia a la terapia antimicrobiana con antibióticos de amplio espectro, ya que alteran la microbiota intestinal y *C. difficile* puede colonizar el intestino solo si la microbiota normal intestinal está disminuida o ausente. La ICD es una enfermedad intestinal mediada por toxinas, las cuales dañan la mucosa intestinal y son potentes enzimas citotóxicas.

La colonización se ve favorecida por las proteínas presentes en la superficie celular de *C. difficile*; algunas de las proteínas involucradas son: SlpA (proteína A de la capa S), Cwp84 (cistein proteasa que interviene en la maduración de la capa S), Cwp66 (proteína de la pared celular) y Fbp68 (proteína de unión a fibronectina). La colonización del intestino por *C. difficile*, así como los mecanismos implicados en este proceso, son poco conocidos, pero es probable que la formación de grandes microcolonias o comunidades microbianas tengan un papel clave en la colonización del intestino y la supervivencia bacteriana. Es también posible que la formación de microcolonias preceda a la producción de toxinas. Además, la capacidad de formar comunidades microbianas o "biopelículas" se ha asociado con infecciones recurrentes. Las bacterias dentro de biopelículas están protegidas y son más resistentes a diferentes tensiones ambientales, como el estrés producido por antibióticos u oxígeno.

En las últimas dos décadas, la incidencia y la mortalidad de la ICD se ha incrementado considerablemente, tanto en el ámbito hospitalario como en el ámbito comunitario, debido a la propagación de cepas hipervirulentas y a la administración inadecuada de antibióticos. Actualmente se estima que hay aproximadamente 500,000 casos de infección por *C. difficile* al año, en hospitales de los Estados Unidos; de los cuales mueren de 15,000 a 20,000 pacientes. Además, se estima que uno de cada cinco pacientes con infección por *C. difficile* experimenta recurrencia de la infección y uno de cada nueve pacientes mayores de 65 muere en los 30 días posteriores al diagnóstico.

En América Latina, específicamente en México, el interés por esta infección se ha generado de manera más lenta y solo algunos centros han iniciado investigación para conocer las características de los pacientes con infección por *C. difficile*. Por ello, es importante investigar las características genéticas de las cepas que circulan en los hospitales de México. Además, el estudio de diversos factores de virulencia que contribuyen a la patogenicidad y que están presentes en las cepas de *C. difficile* presentes en hospitales ayudará a conocer la importancia de dichos factores en la infección por *C. difficile*.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Características microbiológicas y hábitat

*Clostridium difficile* es una bacteria Gram positiva, anaerobia estricta y productora de esporas subterminales que genera una serie de cuadros clínicos que van desde diarrea leve, diarrea autolimitada, diarrea grave, colitis pseudomembranosa y colitis fulminante que puede resultar en la muerte (Khan y Elzouki 2014). Este microorganismo existe comúnmente en forma vegetativa, la cual es muy sensible al oxígeno; o en forma de esporas, las cuales son estables al calor y capaces de resistir una variedad de condiciones adversas.

Fue aislado por primera vez en 1935 a partir de heces de neonatos sanos, y originalmente se le llamó *Bacillus difficilis* debido a su morfología y a las dificultades en cultivarlo (Hall y O'Toole 1935). En la década de 1960 se observó que los pacientes en tratamiento con antibióticos desarrollaban diarrea; la enfermedad fue llamada "colitis estafilocócica", ya que se pensaba que era causada por *Staphylococcus aureus* y se trataba con bacitracina oral. Debido a su asociación frecuente con la exposición a un antibiótico específico (clindamicina), la condición se conoció como "colitis por clindamicina" (Gorbach 1999). Sin embargo, a finales de la década de 1970, *C. difficile* fue reconocido como el agente etiológico de la colitis pseudomembranosa; Bartlett *et al* demostraron citotoxicidad en cultivo de tejidos y enterocolitis en hámsters sirios por aislamientos de *C. difficile* obtenidos de pacientes con colitis pseudomembranosa (Bartlett y Chang *et al.* 1978).

Ahora se sabe que es la causa infecciosa más común de diarrea asociada a la atención de la salud (Dickinson y Surawicz 2014). La infección por *C. difficile* (ICD) se asocia con una morbilidad y mortalidad sustancial; además, aumenta el costo de los sistemas de atención de salud (Khan y Elzouki 2014). *C. difficile* está presente en las heces de alrededor del 5 % de los adultos sanos y en aproximadamente 30 a 70 % de los lactantes (Huang y Wu *et al.* 2009). La mayoría de los pacientes hospitalizados con infección por *C. difficile* son portadores, y sirven como reservorios que perpetúan la diseminación de *C. difficile* en el ambiente hospitalario (Kachrimanidou y Malisiovas 2011).

## **2.2. Infección por *C. difficile*.**

La ICD es una enfermedad intestinal mediada por toxinas, las cuales dañan la mucosa intestinal y son potentes enzimas citotóxicas. La ICD se asocia a la terapia antimicrobiana, ya que los antibióticos alteran la microbiota intestinal y *C. difficile* puede colonizar el intestino solo si la microbiota normal intestinal está disminuida o ausente (Rupnik y Wilcox *et al.* 2009).

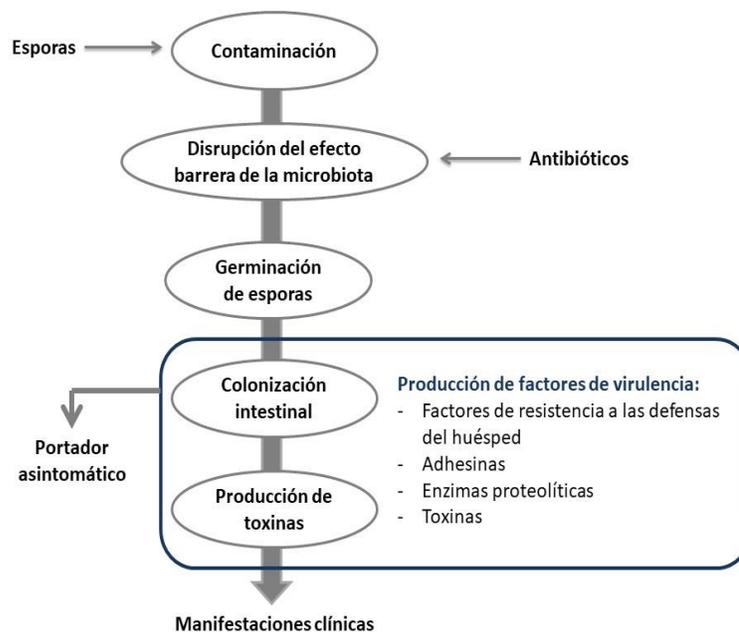
*C. difficile* es la causa de aproximadamente el 25 a 30% de todos los casos de diarrea asociada al tratamiento con antibióticos (Weiss y Bergeron *et al.* 2007). La diarrea asociada a antibióticos por *C. difficile* se define como diarrea que ocurre entre 2 horas a 2 meses después del uso de antibióticos y a menudo acompañada de dolor abdominal. La diarrea se define como la presencia de tres o más deposiciones no formadas por al menos dos días consecutivos (Walk y Young 2008).

La infección por *C. difficile* se considera como adquirida en el hospital cuando los síntomas aparecen posteriores a 48 horas después del ingreso al nosocomio, o cuando se producen en menos de 4 semanas después de haber sido dado de alta. Sin embargo, un buen número de casos se produce en individuos que no recibieron tratamiento con antibióticos ni fueron hospitalizados; tales casos son considerados como adquiridos en la comunidad (Marwick y Yu *et al.* 2013). Son considerados de igual manera los casos ocurridos en las primeras 48 horas después del ingreso al hospital, siempre y cuando no existan antecedentes de hospitalización en las últimas 12 semanas.

Los portadores asintomáticos son individuos que eliminan esporas de *C. difficile* en las heces, pero no presentan síntomas y pueden funcionar como reservorios de *C. difficile*. Según varios estudios, la frecuencia de estado de portador en adultos sanos, pacientes hospitalizados y pacientes con largas estancias hospitalarias es de aproximadamente 3%, 20-30%, y 50%, respectivamente (Rupnik y Wilcox *et al.* 2009). La colitis sin formación de pseudomembranas es la manifestación clínica más frecuente de la ICD. Lo anterior genera costos significativos de salud, hospitalizaciones prolongadas, y aumento de la morbilidad. Los síntomas incluyen dolor abdominal, náuseas, malestar general, anorexia, diarrea acuosa, y la posible presencia de sangre en las heces. Sin embargo, los casos más severos presentan la formación de pseudomembranas (colitis pseudomembranosa). Las manifestaciones clínicas de la colitis pseudomembranosa incluyen distensión abdominal, deshidratación, hipoalbuminemia, diarrea acuosa y un aumento en el número de células inflamatorias, proteínas séricas y moco. Por otra parte, se observan placas amarillentas de 2 a 10 mm en la mucosa colorrectal y a veces en el íleon terminal (Dickinson y Surawicz 2014).

### 2.3. Factores de virulencia y patogénesis.

La ICD se transmite por vía fecal-oral. El microorganismo se ingiere en la forma de esporas, las cuales pueden sobrevivir durante largos periodos en el medio ambiente y pueden atravesar el pH ácido del estómago. En el intestino delgado, las esporas germinan a la forma vegetativa. En el intestino grueso, la infección asociada a *C. difficile* puede surgir solo si la microbiota normal ha sido alterada por terapia con antibióticos (Figura 1) (Kachrimanidou y Malisiovas 2011; Goudarzi y Seyedjavadi *et al.* 2014).



**Figura 1.** Etapas clave en el desarrollo de la ICD. Adaptado de Janoir, 2016 (Janoir 2016).

La colonización se ve favorecida por las proteínas presentes en la superficie celular de *C. difficile*; algunas de las proteínas involucradas son: SlpA (proteína A de la capa S), Cwp84 (cisteín proteasa que interviene en la maduración de la capa S), Cwp66 (proteína de la pared celular) y Fbp68 (proteína de unión a fibronectina), GroEL (proteína de choque térmico) y las proteínas flagelares FliC (flagelina) y FliD (cap flagelar) (Tasteyre y Barc *et*

*al.* 2001; Waligora y Hennequin *et al.* 2001; Reynolds y Emerson *et al.* 2011; Spigaglia y Barketi-Klai *et al.* 2013; Le Monnier y Zahar *et al.* 2014).

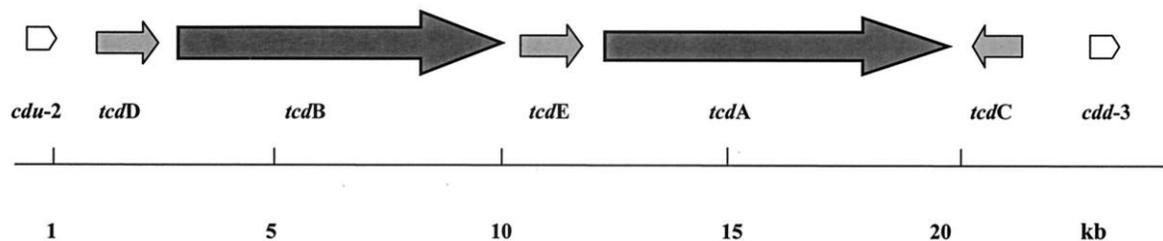
### **2.3.1. Producción de toxinas.**

La patogenicidad de *C. difficile* está mediada principalmente por la liberación de dos toxinas: la toxina A (TcdA) y la toxina B (TcdB) (Rupnik y Dupuy *et al.* 2005). Estas toxinas mayores (TcdA, 308 kDa; TcdB, 270 kDa) funcionan como glucosiltransferasas que inactivan GTPasas de las células diana eucariotas, lo que conduce a la polimerización de actina, la apertura de las uniones estrechas y finalmente, la muerte celular (Ghose 2013). Tras la unión al receptor y la endocitosis, las toxinas se translocan a través de los compartimientos endosomales en el citosol. Las toxinas se procesan mediante la escisión autocatalítica en los compartimientos endosomales, de tal manera que sólo el dominio enzimático amino terminal se libera en el citosol (Egerer y Giesemann *et al.* 2007). Una vez ahí, las GTPasas son glucosiladas, lo que resulta en el bloqueo de las vías de transducción de señales (Ghose 2013).

TcdA y TcdB pertenecen a un grupo de toxinas mayores (LCTs por sus siglas en inglés), las cuales son proteínas de cadena sencilla con tres dominios funcionales: un dominio de unión amino terminal con repeticiones características, un dominio catalítico carboxi terminal y un dominio de translocación (Rupnik 2005). Los signos y síntomas principales de la ICD pueden ser explicados en gran medida por la acción de las toxinas TcdA y TcdB (Figura 1). Ambas toxinas son citotóxicas y causan la alteración del esqueleto de actina y de las uniones estrechas, resultando en una disminución en la resistencia trans-epitelial, acumulación de fluidos y destrucción del epitelio intestinal. Las toxinas de *C. difficile* también causan la liberación de varios mediadores de la inflamación

de las células epiteliales intestinales, mastocitos y macrófagos (Rupnik y Wilcox *et al.* 2009).

Las toxinas TcdA y TcdB están codificadas por los genes *tcdA* (8133 pb) y *tcdB* (7098 pb) respectivamente, los cuales se ubican en un *locus* de patogenicidad de 19,6 kb (PaLoc) (Figura 2). El elemento PaLoc contiene tres genes adicionales: *tcdR*, que codifica a un factor sigma alternativo que actúa como un regulador positivo; *tcdC* que codifica un regulador negativo (factor anti-sigma), y *tcdE* que codifica a la proteína TcdE, que es estructuralmente similar a las holinas de bacteriófagos y que por lo tanto podría utilizarse para la secreción de toxinas en el medio extracelular (Le Monnier y Zahar *et al.* 2014).



**Figura 2.** Locus de patogenicidad (PaLoc) (Khan y Elzouki 2014).

El PaLoc está presente en el mismo sitio de integración cromosómica en todas las cepas toxigénicas de *C. difficile*. En las cepas no toxigénicas (TcdA- y TcdB-) el *locus* se encuentra sustituido por una secuencia corta de 115 pb (Kachrimanidou y Malisiovas 2011). El polimorfismo genético de PaLoc suele evaluarse por toxinotipificación, una técnica de PCR-RFLP que puede discriminar entre 31 toxinotipos diferentes (Rupnik 2010).

Además de las dos toxinas mayores, algunas cepas expresan la toxina binaria (CDT): una toxina que ribosila actina (Stubbs y Rupnik *et al.* 2000). La toxina está relacionada a las toxinas *iota*, como la toxina C2 de *C. botulinum* y la toxina E de *C. perfringens* (Gerding y Johnson *et al.* 2014). La toxina binaria de *C. difficile* está formada por dos componentes codificados por dos genes, *cdtA* (dominio enzimático, CdtA) y *cdtB* (dominio de unión, CdtB) (Ghose 2013). Los genes que codifican a CdtA y CdtB están localizados en el *locus* de la toxina binaria (CdtLoc) junto con otro gen, el gen regulador *cdtR* (Rupnik y Wilcox *et al.* 2009).

En contraste con el PaLoc, del que son conocidas varias versiones truncadas, el CdtLoc está presente completo o como una versión truncada. Las cepas que no tienen el locus completo o la versión truncada, tienen una única secuencia de 68 pb en esta localización cromosómica (Rupnik y Grabnar *et al.* 2003). Los genes para CDTa y CDTb podrían presentar variación debido a mutaciones puntuales, pero esta variabilidad no se ha estudiado tan extensivamente como para TcdA y TcdB (Stare y Delmee *et al.* 2007).

Esta toxina puede potenciar la toxicidad de TcdA y TcdB y conducir a una enfermedad más grave y podría, por tanto, ser considerada como un factor de virulencia adicional (Kachrimanidou y Malisiovas 2011). La toxina binaria se produce en un 20% de las cepas de *C. difficile* (Le Monnier y Zahar *et al.* 2014). Después de la translocación en el citosol, CDTa ribosila la actina, lo que afecta a la estructura de los microtúbulos y la adherencia bacteriana. Cuando células epiteliales del colon son tratadas con la CDT, esta causa importantes cambios en la organización de los microtúbulos. Los datos sugieren que la destrucción del citoesqueleto de actina induce un aumento de la adherencia y la colonización de *C. difficile* (Gerding y Johnson *et al.* 2014).

*C. difficile* puede producir tres toxinas diferentes y en base a la combinación de estas toxinas se pueden diferenciar cinco tipos de producción de toxina. El grupo de cepas de *C. difficile* que producen sólo CDT y no TcdA y TcdB (cepas CDT + A-B-) es adecuado para el estudio del papel de la toxina binaria en la patogénesis. La prevalencia de tales cepas se estima en 1.9% (Gerding y Johnson *et al.* 2014). Las cepas de *C. difficile* que solamente son productoras de toxina binaria son un subgrupo recientemente reconocido de cepas toxigénicas. Recientemente, la investigación se ha centrado principalmente en la caracterización molecular de estas cepas y de su prevalencia (Stare y Delmee *et al.* 2007).

### **2.3.2. Esporulación**

Las células vegetativas de *C. difficile* son extremadamente sensibles al oxígeno; para sobrevivir fuera del ambiente anaerobio del intestino grueso, la bacteria tiene que estar en la forma de esporas (Camacho-Ortiz y Ponce-de-Leon *et al.* 2009). *C. difficile* produce esporas altamente resistentes a la desecación, agentes químicos y temperaturas extremas. Las esporas frecuentemente se encuentran en el ambiente cercano a los pacientes con ICD, persistiendo por meses e incluso años (Rupnik y Wilcox *et al.* 2009). En general, es aceptado que la forma de espora de *C. difficile* inicia la enfermedad. Dado que las toxinas son producidas por células, las esporas germinan, presumiblemente en el tracto gastrointestinal, crecen como células vegetativas y producen toxinas (Camacho-Ortiz y Ponce-de-Leon *et al.* 2009; Semenyuk y Laning *et al.* 2014). La exposición a antibióticos pudiera estimular directamente la proliferación de *C. difficile* (la germinación de esporas) y la producción de toxinas, que ocurre en la fase logarítmica tardía (Semenyuk y Laning *et al.* 2014).

### 2.3.3. Producción de biopelícula

Mientras que las esporas de *C. difficile* son importantes para la transmisión y la persistencia de la ICD, otros factores como la colonización intestinal y la formación de comunidades bacterianas en el intestino también pueden contribuir a la patogénesis y la persistencia de la enfermedad, pero no han sido investigadas ampliamente. La proteína A de unión a fibronectina ha demostrado desempeñar un papel en la colonización por *C. difficile*. Además, se cree que las proteínas de la capa S de alto y de bajo peso molecular (SLP) participan en la adherencia de *C. difficile* a las células huésped durante la infección (Spigaglia y Barketi-Klai *et al.* 2013). Para varios patógenos, la capacidad de formar comunidades microbianas o "biopelículas" se ha asociado con infecciones recurrentes. Las bacterias dentro de biopelículas están protegidas y son más resistentes a diferentes tensiones ambientales, como el estrés producido por antibióticos u oxígeno. La resistencia a los antimicrobianos dentro de las biopelículas hace que el tratamiento de la enfermedad sea difícil. Además de la formación de esporas es probable que *C. difficile* forme microcolonias *in vivo* para sobrevivir en el ambiente desfavorable del intestino humano (Lipovsek y Leitinger *et al.* 2013). La matriz de la biopelícula protege a las bacterias, proporcionando un ambiente cerrado. La matriz generalmente se compone de una sustancia polimérica extracelular (EPS), que comprende principalmente de proteínas, ADN y polisacáridos. La matriz de la biopelícula, puede actuar como una barrera física inicial que afecta a la penetración de los agentes antimicrobianos (Deneve y Bouttier *et al.* 2009). Otros atributos tales como el estado fisiológico de la bacteria también pueden contribuir a la resistencia (Dapa y Unnikrishnan 2013).

La mayoría de los estudios sobre la microbiota del colon se han realizado sobre las células planctónicas que se encuentran en las heces (Donelli y Vuotto *et al.* 2012); sin embargo, es probable que las bacterias sésiles que forman biopelículas en la capa mucosa del intestino desempeñen un papel fundamental en la salud intestinal.

La colonización del intestino por *C. difficile*, así como los mecanismos implicados en este proceso, son poco conocidos, pero es probable que la formación de grandes microcolonias o comunidades microbianas tengan un papel clave en la colonización del intestino y la supervivencia bacteriana. Es también posible que la formación de microcolonias preceda a la producción de toxinas (Semenyuk y Laning *et al.* 2014). Además de las esporas, que se han ligado a la persistencia de la enfermedad, la formación de biopelícula *in vivo* podría ser otro factor que contribuye a la recurrencia de la ICD (Ethapa y Leuzzi *et al.* 2013).

#### **2.4. Antibióticos asociados a la ICD**

El riesgo relativo de desarrollar ICD depende del agente antimicrobiano; la clindamicina, las cefalosporinas y los  $\beta$ -lactámicos son los agentes más frecuentemente asociados con el desarrollo de ICD. La clindamicina fue el agente con mayor riesgo durante la década de 1970, pero una disminución en el uso de este fármaco también disminuyó su riesgo atribuible (Gerding 2004). A finales de la década de 1980 y durante la década de 1990, las cefalosporinas de tercera generación se convirtieron en los agentes con mayor riesgo (Gerding 2004).

Recientemente las quinolonas han surgido como antimicrobianos de riesgo. Un estudio de casos y controles en Canadá, identificó una asociación entre la ICD y exposición previa a quinolonas (OR, 5.5; 95% IC, 1.2 – 24.8) (Yip y Loeb *et al.* 2001); lo

anterior pudo ser el comienzo de la epidemia Canadiense, a pesar de que el ciprofloxacino se había considerado de bajo riesgo (Golledge y Carson *et al.* 1992). Otros estudios han identificado a las fluoroquinolonas como un factor de riesgo; un brote de ICD en un nosocomio fue asociado a un cambio en las prescripciones de levofloxacino a gatifloxacino (Gaynes y Rimland *et al.* 2004).

## **2.5. Epidemiología molecular**

En las últimas dos décadas, la incidencia y la mortalidad de la ICD se ha incrementado considerablemente tanto en el ámbito hospitalario como en el ámbito comunitario debido a la propagación de cepas hipervirulentas y a la administración inadecuada de antibióticos. Actualmente se estima que hay aproximadamente 500,000 casos de infección por *C. difficile* al año, en hospitales de los Estados Unidos; de los cuales se estima que de 15 000 a 20 000 pacientes mueren (Rupnik y Widmer *et al.* 2008).

El aumento en la tasa de incidencia, gravedad, mortalidad y recurrencia de la ICD se ha atribuido en gran medida a la propagación de una nueva cepa de *C. difficile*, designada cepa norteamericana pulsotipo 1 (NAP1, por sus siglas en inglés), PCR-ribotipo 027, toxinotipo III, y REA (restriction endonuclease analysis) tipo BI; es decir, NAP1/BI/027. (Shah y Dang *et al.* 2010; Stevens y Dumyati *et al.* 2011). Sin embargo, la aparición de casos no se limita a la diseminación de esta cepa; otras cepas han sido asociadas con brotes y casos graves. Recientemente, se observó un aumento en la prevalencia de la ICD causada por el ribotipo 078, toxinotipo V (Pelaez y Alonso *et al.* 2002; Rupnik y Widmer *et al.* 2008). La infección con esta cepa se ha asociado a casos adquiridos en la comunidad (Neely y Lambert *et al.* 2017), y algunos autores sugieren una asociación entre infecciones en humanos y las infecciones en diversos animales, tales

como cerdos y el ganado vacuno (Goorhuis y Debast *et al.* 2008; Patterson y Wilcox *et al.* 2012; Kim y Cho *et al.* 2018; Krutova y Zouharova *et al.* 2018). Sin embargo el ribotipo 078 no es la única cepa que se ha asociado a infecciones en humanos y animales, sino también los ribotipos 014, 002 y 001 (Janezic y Ocepek *et al.* 2012).

Para propósitos epidemiológicos, las cepas de *C. difficile* se pueden caracterizar mediante ribotipado por PCR, electroforesis en gel por campos pulsados (PFGE) o por análisis de restricción por endonucleasa (REA) (Manzo y Merrigan *et al.* 2014). Las cepas pueden ser también clasificadas en toxinotipos (designados por números romanos) en base a cambios en los genes de la toxina A y la toxina B (Rupnik y Brazier *et al.* 2001).

Kuijper *et al.* (Killgore y Thompson *et al.* 2008) realizaron el análisis del ADN cromosómico de *C. difficile* con la endonucleasa de restricción HindIII. El análisis de restricción es un método altamente discriminatorio y reproducible; sin embargo, un procedimiento técnicamente exigente y laborioso, especialmente para un gran número de aislamientos. Por otra parte, la electroforesis en gel por campos pulsados (PFGE) permite el análisis de todo el genoma después de la digestión con endonucleasas de restricción con sitios de corte poco frecuentes, como SmaI, KspI, SacII o NruI, las cuales producen hasta 10 fragmentos por cepa (Rohde y Bartolini *et al.* 2009).

La ribotipificación por PCR fue desarrollada en la década de 1990 como respuesta a la necesidad en el laboratorio de microbiología clínica para la discriminación epidemiológica entre los microorganismos patógenos. Este método se basa en la presencia de varios alelos del operon del RNAr que difieren en la longitud de la región intergénica localizada entre los genes del RNAr 16S y el 23S (Kolli y Mallipedhi *et al.* 2009; Janezic y Indra *et al.* 2014). Por lo que la PCR amplifica usando un oligonucleótido en el gen 16S

y otro en el 23S generando fragmentos de distintos tamaños según los diferentes alelos presentes en el cromosoma bacteriano.

El método de toxinotipificación desarrollado por Rupnik *et al* (Rupnik y Braun *et al.* 1997) clasifica a las cepas de *C. difficile* en 31 toxinotipos y ha sido comparado con la ribotipificación por PCR (Rupnik y Brazier *et al.* 2001). Se ha observado una buena correlación entre los métodos. La toxinotipificación es un método que emplea PCR para amplificar dos fragmentos de los genes de las toxinas A y B, los cuales se someten a corte con enzimas de restricción y se analizan los polimorfismos. En base al patrón de bandas generado las cepas se clasifican en 31 toxinotipos diferentes (Rupnik y Avesani *et al.* 1998). Todas las cepas de un mismo toxinotipo tienen variaciones idénticas en el PaLoc. Los genes con variaciones codifican toxinas con propiedades distintas o incluso pueden resultar en la ausencia de una o ambas toxinas (Rupnik 2010).

La cepa NAP1/027/BI se asocia con la producción de altas concentraciones de toxinas A y B, alta transmisibilidad, alta esporulación, producción de toxina binaria, alto nivel de resistencia a fluoroquinolonas debido a mutaciones en *gyrA*, y la variación en el gen represor *tcdC* que podría resultar en un aumento de la toxina A y la toxina B (Stevens y Dumyati *et al.* 2011). La epidemiología de la ICD en América del Norte, Europa y algunas partes de Asia está bien documentada (Barbut y Mastrantonio *et al.* 2007; Cheknis y Sambol *et al.* 2009; Bauer y Notermans *et al.* 2011). La cepa NAP1/027/BI se considera epidémica y ampliamente distribuida en todo el mundo. Además de Canadá y los Estados Unidos, la presencia de esta cepa ha sido ampliamente documentada en Europa, incluyendo el Reino Unido, Francia, Alemania, Italia, Dinamarca, Irlanda, Holanda, Austria, Polonia, Suiza, Noruega, Bélgica, Finlandia y España; así como en Asia,

incluyendo Japón, Corea y Hong Kong; y en Australia, donde se han reportado algunos casos (Balassiano y Yates *et al.* 2012). Sin embargo, en América Latina el interés por esta infección se ha generado de manera más lenta y algunos centros han iniciado investigación para conocer las características de los pacientes con infección por *C. difficile* (Spigaglia y Barbanti *et al.* 2011). Particularmente en México, reportes de casos clínicos (Balassiano y Yates *et al.* 2012; Remes-Troche 2012; Morfin-Otero y Garza-Gonzalez *et al.* 2016) y escasos reportes de caracterización microbiológica y molecular de aislamientos clínicos (Camacho-Ortiz y Lopez-Barrera *et al.* 2015).

## **2.6. Diagnóstico de la ICD**

Las características clínicas de la ICD y su sintomatología variable hacen difícil el diagnóstico diferencial de otras enfermedades intestinales tales como la colitis ulcerativa, enfermedad inflamatoria crónica y enfermedad de Crohn (Knoop y Owens *et al.* 1993). Debido a la falta de consistencia en la presentación clínica, el diagnóstico debe ser realizado por endoscopia o por pruebas de laboratorio específicas. La endoscopia puede revelar la presencia de pseudomembranas; sin embargo, un hallazgo negativo en la endoscopia, no excluye la posibilidad de ICD (Mylonakis y Ryan *et al.* 2001).

El diagnóstico de laboratorio de la infección por *C. difficile* ha evolucionado significativamente en los últimos años, y existen muchos métodos que pueden ser utilizados para la detección de la infección por *C. difficile* (Huang y Weintraub *et al.* 2010). Estos métodos incluyen ensayos inmunoenzimáticos para la detección de las toxinas, ensayos de PCR en tiempo real, pruebas de neutralización de citotoxicidad y cultivo toxigénico. El uso de PCR para el diagnóstico de esta enfermedad ha demostrado ser muy específico y sensible; sin embargo los costos pueden ser muy elevados para llevar

a cabo de manera rutinaria. Se dispone de varios kits comerciales para la detección de toxinas, pero algunos kits solo detectan la producción de la toxina A y no se recomiendan para el uso rutinario para el diagnóstico de la ICD ya que cepas que no producen la toxina A no son detectadas.

Un cultivo de heces es esencial para obtener aislamientos para su tipificación molecular, que se requiere para los estudios epidemiológicos. El cultivo toxigénico (TC) se considera como el estándar de oro con el que se deben comparar otros métodos. El primer paso es recuperar las esporas de *C. difficile*. Las muestras de heces se calientan a 80°C o se mezclan con un volumen igual de etanol absoluto y se incuban a temperatura ambiente. De esta manera, las células vegetativas y la microbiota acompañante se eliminan mientras se recuperan las esporas (Lister y Stevenson *et al.* 2014). A continuación, la muestra se inocula en un medio diferencial y selectivo que permite que las esporas germinen. Un medio bien conocido para recuperar *C. difficile* de muestras de heces es el agar cicloserina-cefoxitina-fructosa (CCFA) (George y Sutter *et al.* 1979).

Una de las primeras estrategias para el diagnóstico de la ICD fue la detección de toxinas con un inmunoensayo específico. Varios kits están disponibles comercialmente en diferentes formatos, tales como: inmunoensayo de flujo lateral, también conocido como inmunocromatografía o pruebas de tira; y ensayos en fase sólida, por ejemplo, micropocillos (Burnham y Carroll 2013). La confirmación de ICD basada en inmunoensayos es práctica, rápida y económica, pero también es uno de los métodos menos consistentes (rango de sensibilidad: 63% a 94%, rango de especificidad: 75% a 100%) (Cohen y Gerding *et al.* 2010).

La nueva generación de pruebas de amplificación de ácidos nucleicos (NAAT, por sus siglas en inglés) amplifica y detecta secuencias de ADN o ARN específicas de patógenos. Las ventajas de las NAAT incluyen alta sensibilidad, alta especificidad y velocidad. El papel de las NAAT en el proceso de diagnóstico para la ICD puede ser de apoyo, o como parte de un algoritmo de dos o tres pasos (Eckert y Jones *et al.* 2013).

## **2.7. Tratamiento y farmacorresistencia**

El tratamiento de primera línea se basa en la administración oral de metronidazol o vancomicina, con pocas opciones terapéuticas secundarias. La vancomicina oral ha sido altamente efectiva desde 1981. Unos años después, se demostró que el metronidazol era tan efectivo como la clindamicina (Aslam y Hamill *et al.* 2005). El metronidazol se prefiere a la vancomicina como tratamiento de primera línea para personas leves a moderadamente enfermas debido a su menor costo en comparación con la vancomicina, una eficacia clínica comparable y para prevenir la propagación de enterococos resistentes a la vancomicina (Al-Nassir y Sethi *et al.* 2008). La dosis recomendada de metronidazol es de 500 mg tres veces al día o 250 mg cuatro veces al día durante 10 a 14 días. La vancomicina oral se recomienda en una dosis de 125 mg cuatro veces al día y es el tratamiento preferido para los casos más graves (Cohen y Gerding *et al.* 2010; Surawicz y Brandt *et al.* 2013; Debast y Bauer *et al.* 2014). La vancomicina intravenosa no tiene efecto sobre la colitis por *C. difficile* ya que el antibiótico no se excreta de manera significativa en el colon.

El riesgo relativo de desarrollar ICD con un antimicrobiano en particular se incrementa si *C. difficile* es resistente a este (Gerding 2004). Lo anterior fue demostrado en un brote debido a una cepa resistente a clindamicina que se propagó en diversos

hospitales de los Estados Unidos, en donde la clindamicina misma fue un factor de riesgo importante para el desarrollo de la ICD (Johnson y Samore *et al.* 1999). Recientemente, se piensa que la resistencia a fármacos tiene un rol importante en la propagación de la cepa ribotipo 027 (Gerding 2004). Es posible que el uso de fluoroquinolonas funcione como presión selectiva que promueve la emergencia de esta cepa. Además, la resistencia a otros fármacos en *C. difficile* parece incrementarse (Spigaglia y Mastrantonio 2004). La resistencia a metronidazol posee cierta controversia, ya que ha sido solo observada en bacterias derivadas del cultivo primario y se pierde en el subcultivo y/o crio preservación (Pelaez y Alcalá *et al.* 2002; Pelaez y Cercenado *et al.* 2008). El mecanismo involucrado es desconocido, pero en otros organismos es frecuentemente asociado con una activación ineficiente del fármaco (Land y Johnson 1999). La relevancia clínica de la resistencia a metronidazol es desconocida.

La resistencia a clindamicina se encuentra en 40-70% de los aislamientos humanos; la resistencia a tetraciclina es menos común; se ha encontrado en menos del 9.2% de los aislamientos (Barbut y Mastrantonio *et al.* 2007; Mutlu y Wroe *et al.* 2007). Aunque la resistencia a fluoroquinolonas se ha asociado al ribotipo 027, también se encuentra en otros ribotipos; además, la resistencia a moxifloxacino se ha reportado en los ribotipos 001, 002, 012, 017, 018, 020, 048, 055, 068, 071, 078, 106, 126 y 168 (Drudy y Harnedy *et al.* 2007; Mutlu y Wroe *et al.* 2007; Brazier y Raybould *et al.* 2008; Spigaglia y Barbanti *et al.* 2010; Spigaglia y Barbanti *et al.* 2011).

Los pacientes con recurrencias múltiples de ICD generalmente responden al tratamiento con vancomicina o metronidazol; sin embargo, los síntomas diarreicos regresan dentro de pocos días o semanas después de detener el tratamiento. Entre 20 y 50% de las recurrencias son causadas por nuevas cepas de *C. difficile*, indicando

reinfección y no una recurrencia de la infección original (Tschudin-Sutter 2014). El tratamiento más efectivo para estos pacientes ha sido el reemplazamiento de la microbiota intestinal por medio de trasplante fecal suministrado por sonda nasogástrica o enema (Tickler y Goering *et al.* 2014). No se ha encontrado un tratamiento efectivo para la ICD severa; solo la remoción quirúrgica del colon puede ser la única medida.

### 3. JUSTIFICACIÓN

En las últimas dos décadas, la incidencia y la mortalidad de la ICD se ha incrementado considerablemente tanto en el ámbito hospitalario como en el ámbito comunitario debido a la propagación de cepas hipervirulentas y a la administración inadecuada de antibióticos.

Múltiples factores contribuyen a la virulencia de *C. difficile*, sin embargo solo se ha descrito el papel de algunos en aislamientos clínicos. Por ello, es de suma importancia analizar y caracterizar aislamientos clínicos de *C. difficile* fin de describir los factores involucrados en la patogénesis.

## 4. HIPÓTESIS

Los aislamientos clínicos de *C. difficile* poseen y expresan distintos factores de virulencia que contribuyen a la patogénesis, tales como producción de toxinas, formación de biopelícula y expresión de genes asociados a la adherencia.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. General

Analizar factores de virulencia que contribuyen a la patogénesis, tales como producción de toxinas, formación de biopelícula y expresión de genes asociados a la adherencia en aislamientos clínicos de *C. difficile*.

### 5.2. Específicos

1. Aislar e identificar *Clostridium difficile* a partir de heces de pacientes con ICD.
2. Determinar la presencia de los genes de la toxina A, toxina B, toxina binaria así como las deleciones en *tcdC*.
3. Determinar la diversidad genética de los aislamientos.
4. Determinar el perfil de susceptibilidad de los aislamientos.
5. Evaluar la producción de biopelícula de los aislamientos.
6. Determinar la composición de la biopelícula de *C. difficile*.
7. Evaluar la expresión de genes asociados a la adherencia.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1. Obtención de muestras y aislamientos.

Se colectaron muestras de heces de pacientes del Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde” y del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”; las muestras incluidas provenían de pacientes diagnosticados con ICD.

El diagnóstico clínico de ICD se llevó a cabo en pacientes hospitalizados que cumplieran por lo menos uno de los siguientes criterios: diarrea aguda (evacuaciones líquidas por más de 12 horas) después de las 24 h posteriores a su ingreso, con o sin vómito o fiebre; diarrea aguda y antecedente de haber recibido antimicrobianos. En ausencia de diarrea con dos o más de los siguientes signos o síntomas: náusea, vómito, dolor abdominal y/o fiebre.

En el Hospital Civil de Guadalajara, la sospecha de ICD se confirmó mediante PCR en tiempo real utilizando el sistema Xpert® *C. difficile*/Epi (Cepheid, Sunny Vale, CA, EE. UU.); en el Hospital Universitario, el diagnóstico fue confirmado por Xpert® Ensayo de *C. difficile*/Epi o mediante el uso de Meridian ImmunoCard® Toxins A&B (Meridian Bioscience, Inc., Memphis, TN, EE. UU.). Las muestras obtenidas fueron congeladas a -70°C hasta su uso.

Para el cultivo, las muestras fueron descongeladas a temperatura ambiente y tratadas con etanol absoluto en proporción 1:1 a fin de eliminar la microbiota acompañante y seleccionar las esporas de *C. difficile*. En un microtubo de 2 ml con 1 ml de etanol absoluto se añadió 1 ml de muestra de heces y se dejó incubar a temperatura ambiente.

Posterior a la incubación, las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 3,500 rpm y se sembraron en agar para *C. difficile* (CDA) (Neogen, MI, EE. UU.) con cefoxitina a 16 µg/ml (Sigma Aldrich, MO, EE. UU.) y se incubaron en anaerobiosis hasta por 72 horas en una cámara de anaerobiosis BJPX-G (Biobase Meihua Trading Co. Ltd, un China). Posterior a la incubación, las colonias sospechosas de *C. difficile* (colonias irregulares, cerosas, blanco-grisáceas de 2-3 mm de diámetro) fueron teñidas al Gram a fin de observar la morfología microscópica (bacilos Gram positivos con espora oval subterminal). Para su conservación en forma de esporas, los aislamientos fueron sembrados por estría en una placa de CDA e incubados en anaerobiosis a 37° C por 7 días; posteriormente, las esporas fueron colectadas con un hisopo estéril y conservados en caldo *Brucella* con glicerol al 15% en crioviales de 2 ml.

## **6.2. Identificación de aislamientos.**

Para la identificación se obtuvo el ADN genómico de los aislamientos por medio de lisis enzimática, utilizando el método de fenol-cloroformo. Posteriormente, se realizó la amplificación de un fragmento del gen *tpi* (triosa fosfato isomerasa) por medio de PCR, utilizando los oligonucleótidos y condiciones descritas (Lemee y Dhalluin *et al.* 2004). Además, se realizó la confirmación de la identificación por medio de espectroscopia de masas acoplada a un analizador de tiempo de vuelo (MALDI-TOF).

### **6.2.1. Extracción de ADN.**

Los aislamientos se sembraron en placas de CDA y se incubaron a 37°C por 18-20 h. Posterior a la incubación, se realizó una suspensión bacteriana en un microtubo con 200 µl de Tris-HCl 500 mM y se agregaron 150 µg de lisozima (Biotech, Bio Basic, Inc., Ontario, Canadá). La suspensión se incubó en baño de agua a 37°C durante al menos 16 h; posteriormente se añadieron 6 µl de proteinasa K (10 mg/ml) (Bioline, Londres, UK) y se

llevó a incubación a 55°C por 3 h. Para la extracción de ADN se añadieron 250 µl de fenol saturado, 250 µl de SEVAG y 100 µl de TE 1X; se realizó agitación vigorosa por 5 min. La fase acuosa y la fase orgánica fueron separadas mediante centrifugación durante 8 min a 14000 rpm; una vez separadas, la fase acuosa fue transferida a un nuevo vial y se realizó una segunda extracción. La fase acuosa de la segunda extracción se transfirió a otro vial, midiendo el volumen recuperado y se añadieron 2.33 volúmenes de etanol absoluto a 4°C a fin de precipitar el ADN; se dejó precipitando a -20°C por una hora. Posterior a la precipitación, se centrifugó a 14000 rpm por 5 min y se decantó el sobrenadante cuidando de no desprender la pastilla de ADN. Se realizaron dos lavados de la pastilla con etanol al 70 %; finalmente, se dejó secando a temperatura ambiente durante 12 horas. Una vez seco, se disolvió en 100 µl de TE 1X y se calentó a 65°C por 15 min en baño de agua antes de utilizarse.

### **6.2.2. Identificación por PCR.**

Se realizó una PCR de identificación utilizando los oligonucleótidos y las condiciones descritas (Tabla 1) (Hirota y Sasaki *et al.* 2011). La PCR amplificó regiones específicas del gen de la termoneucleasa *nuc*. La reacción de PCR utilizó 0.5 µl del ADN obtenido por lisis enzimática en 24.5 µl de mezcla de reacción compuesta por: 200 µM de cada desoxinucleótido trifosfato, buffer 1X (NH<sub>4</sub> 1X pH 8.8), 3 µM de MgCl<sub>2</sub>, 0.1 µM de cada oligonucleótido (Tabla 3) y 1 U de Taq polimerasa (Bioline, USA Inc., Boston, MA, E.U.A.).

**Tabla 1.** Oligonucleótidos utilizados para la identificación de *C. difficile*.

<b>Oligonucleótido</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Producto (pb)</b>
tpi-F	TTGTAAACCATTCTGGACCG	230
tpi-R	ATGCGTGAGATACTTCTTCG	

Para la amplificación se llevó a cabo un paso inicial de desnaturalización (95°C, 3 min); 40 ciclos de: desnaturalización (95°C, 30 s), alineamiento (55° C, 30 s), y extensión (72°C, 30 s); y un paso final de elongación a 72°C por 5 min. Los productos obtenidos fueron visualizados por electroforesis en un gel de agarosa al 2 % con TBE 0.5X, previa tinción con bromuro de etidio (1 mg/ml). Se empleó un marcador de 100-1,000 pb (HyperLadder™ IV, Bioline, USA Inc., Boston MA, E.U.A.). El gel se reveló en un transiluminador con luz UV a 254 nm. Como controles de la amplificación se utilizaron las cepas ATCC 9689 y ATCC BAA-1805.

### **6.2.3. Identificación por MALDI-TOF.**

A partir de un cultivo con 20 h de incubación en placa de CDA se tomó una colonia aislada y se colocó con un aplicador de madera en un pocillo de una placa de acero inoxidable del equipo. Posteriormente se añadió 1 µl de ácido fórmico al 70% (v/v) a cada pocillo y se dejó secar completamente a temperatura ambiente; una vez seco, se adicionó 1 µl de la matriz HCCA (ácido 4-bromo- $\alpha$ -cianocinámico), y se dejó secar a temperatura ambiente. La placa se introdujo en el equipo, se controló mediante el software flexControl 3.4 y se analizó mediante el software MALDI biotyper 4.0 comparando los espectros de proteínas de los aislamientos con la base de datos del equipo.

### **6.3. Tipificación de aislamientos.**

Se realizó la detección de los genes que codifican a la toxina A (*tcdA*), toxina B (*tcdB*) y toxina binaria (*cdtA*, *cdtB*), así como deleciones en el gen *tcdC*, mediante la amplificación por PCR.

#### **6.3.1. Toxinas A y B y toxina binaria.**

Se realizaron dos PCR individuales para la amplificación de *tcdA* y de *tcdB* y una PCR dúplex para la amplificación de los componentes de la toxina binaria, utilizando los oligonucleótidos enlistados en la tabla 2 (Persson y Torpdahl *et al.* 2008). Para todas las reacciones de PCR se utilizaron 0.5 µl del ADN obtenido por lisis enzimática en 24.5 µl de mezcla de reacción compuesta por: 200 µM de cada desoxinucleótido trifosfato, buffer 1X (NH<sub>4</sub> 1X pH 8.8), 3 µM de MgCl<sub>2</sub>, y 1 U de Taq polimerasa (Bioline, USA Inc., Boston, MA, E.U.A.); los oligonucleótidos se añadieron a las concentraciones mostradas en la tabla 2. La amplificación se llevó a cabo con un paso inicial de desnaturalización (94°C, 3 min); 35 ciclos de: desnaturalización (94°C, 50 s), alineamiento (54° C, 40 s), y extensión (72°C, 50 s); y un paso final de elongación a 72°C por 3 min para todas las PCR.

Los productos obtenidos fueron visualizados por electroforesis en un gel de agarosa al 2 % con TBE 0.5X, previa tinción con bromuro de etidio (1 mg/ml). Se empleó un marcador de 100-1,000 pb (HyperLadder™ IV, Bioline, USA Inc., Boston MA, E.U.A.). El gel se reveló en un transiluminador con luz UV a 254 nm. Como controles de la amplificación se utilizaron las cepas ATCC 9689 y ATCC BAA-1805.

**Tabla 2.** Oligonucleótidos utilizados para la tipificación de aislamientos.

	<b>Secuencia (5' → 3')</b>	<b>Gen</b>	<b>Concentración (μM)</b>
tcdA-F3345	GCATGATAAGGCAACTTCAGTGGTA	<i>tcdA</i>	0.3
tcdA-R3969	AGTTCCTCCTGCTCCATCAAATG		0.3
tcdB-F5670	CCAAATGGAGTGTTACAAACAGGTG	<i>tcdB</i>	0.4
tcdB-R6079A	GCATTTCTCCATTCTCAGCAAAGTA		0.2
tcdB-R6079B	GCATTTCTCCGTTTTTCAGCAAAGTA		0.2
cdtA-F739A	GGGAAGCACTATATTAAGCAGAAGC	<i>cdtA</i>	0.05
cdtA-F739B	GGGAAACATTATATTAAGCAGAAGC		0.05
cdtA-R958	CTGGGTTAGGATTATTTACTGGACCA		0.1
cdtB-F617	TTGACCCAAAGTTGATGTCTGATTG	<i>cdtB</i>	0.1
cdtB-R878	CGGATCTCTTGCTTCAGTCTTTATAG		0.1

### 6.3.2. Deleciones en *tcdC*.

Las deleciones en el gen *tcdC* fueron detectadas en base a las diferencias en el tamaño de la banda obtenida por medio de PCR punto final, utilizando los oligonucleótidos enlistados en la tabla 3 (Persson y Jensen *et al.* 2011).

La reacción de PCR utilizó 0.5 μl del ADN obtenido por lisis enzimática en 24.5 μl de mezcla de reacción compuesta por: 200 μM de cada desoxinucleótido trifosfato, buffer 1X (NH<sub>4</sub> 1X pH 8.8), 3 μM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 μM de cada oligonucleótido (Tabla 3) y 1 U de Taq polimerasa (Bioline, USA Inc., Boston, MA, E.U.A.). Para amplificación del fragmento se utilizaron las mismas condiciones que para la amplificación de las toxinas.

**Tabla 3.** Oligonucleótidos utilizados para la detección de deleciones en *tcdC*.

	<b>Secuencia (5' → 3')</b>
tcdC-F252	CATGGTTCAAAATGAAAGACGAC
tcdC-R415	GGTCATAAGTAATACCAGTATCATATCCTT

Los productos obtenidos fueron visualizados por electroforesis en un gel de agarosa al 2 % con TBE 0.5X, previa tinción con bromuro de etidio (1 mg/ml). Se empleó un marcador de 100-1,000 pb (HyperLadder™ IV, Bioline, USA Inc., Boston MA, E.U.A.) y el gel se reveló en un transiluminador con luz UV a 254 nm. Para determinar el tamaño de la deleción se tomó en cuenta el peso de la banda obtenida de acuerdo a la tabla 4. Como controles de las deleciones de 0 y 18 bp se utilizaron las cepas ATCC 9689 y ATCC BAA-1805, respectivamente.

**Tabla 4.** Determinación de deleciones en *tcdC*.

<b>Peso de la banda (bp)</b>	<b>Deleción (bp)</b>
108	54
126	39
144	18
162	0

#### **6.4. Determinación de ribotipos.**

A partir del DNA genómico obtenido por lisis enzimática, se realizó la amplificación del espacio intergénico entre los genes 23S y 16S del RNAr por medio de PCR. Se utilizaron los iniciadores diseñados por Bidet *et al* (Bidet y Barbut *et al.* 1999), enlistados en la tabla 5.

La reacción de PCR utilizó 0.5 µl del ADN obtenido por lisis enzimática en 24.5 µl de mezcla de reacción compuesta por: 200 µM de cada desoxinucleótido trifosfato, buffer 1X (NH<sub>4</sub> 1X pH 8.8), 3 µM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 µM de cada oligonucleótido (Tabla 3) y 1 U de Taq polimerasa (Bioline, USA Inc., Boston, MA, E.U.A.). Para la amplificación se llevó a cabo un paso inicial de desnaturalización (94°C, 6 min); 35 ciclos de: desnaturalización (94°C, 1 min), alineamiento (57° C, 1 min), y extensión (72°C, 1 min); y un paso final de elongación a 72°C por 7 min.

Los productos de PCR fueron visualizados por medio de electroforesis convencional, durante 6 horas a 85 V, en un gel de agarosa al 3% previa tinción con bromuro de etidio. El patrón de bandas fue analizado de manera visual y comparado con las cepas control ATCC 9689 (ribotipo 001) y BAA-1805 (ribotipo 027), de esta manera se determinó el ribotipo para los aislamientos que coincidieran con el patrón de bandas de los ribotipos de las cepas control.

**Tabla 5.** Oligonucleótidos utilizados para la ribotipificación de los aislamientos.

<b>Oligonucleótido</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Producto (pb)</b>
16S-F	GTGCGGCTGGATCACCTCCT	260 a 585
23S-R	CCCTGCACCCTTAATAACTTGACC	

Los aislamientos que no pertenecieran a los ribotipos 001 y 027 fueron enviados para su ribotipificación al laboratorio de referencia de *C. difficile*: Ribotyping Network Reference Laboratory (CDRN) en Leeds, Reino Unido. Además, una selección de

aislamientos de ribotipos 001 y 027 también fueron enviados para la confirmación del ribotipo.

### **6.5. Determinación del perfil de susceptibilidad.**

La determinación del perfil de susceptibilidad se realizó mediante el método de dilución en agar utilizando agar Wilkins-Chalgren (Oxoid Limited, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) y caldo anaerobio Schaedler (Oxoid Limited). Se probaron agentes antimicrobianos clasificados en 3 grupos con respecto a la ICD: antibióticos utilizados contra otras infecciones que pueden facilitar el desarrollo de la ICD (ciprofloxacino, moxifloxacino, eritromicina, clindamicina y tetraciclina); opciones de tratamiento para la ICD (vancomicina, metronidazol, fidaxomicina y rifampicina) y antibióticos con potencial terapéutico (linezolid).

Se prepararon diluciones seriadas 1:2 de los antibióticos a utilizar partiendo de un stock a concentración 2560 mg/L; los antibióticos fueron diluidos con el solvente indicado por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). La solución stock de fidaxomicina (800 mg/L) se preparó en DMSO, luego se diluyó 1 ml de solución stock en 5 ml de DMSO y 4 ml de DMSO al 10% (concentraciones finales 80 mg/L); se hicieron diluciones adicionales en DMSO al 10%.

Las diluciones seriadas fueron preparadas de tal manera que la concentración fuera 10 veces la concentración a utilizar (10X). Después fue vertida una parte de la dilución a nueve partes de agar Wilkins-Chalgren fundido y estéril (mantenido a 50°C aproximadamente). El medio con antimicrobiano fue vertido en placas Petri estériles, evitando la formación de burbujas que dificultaran la posterior inoculación de las placas y se dejaron solidificar. Además, se prepararon placas sin antimicrobiano para usarse como

control. Para vancomicina, metronidazol, ciprofloxacino, moxifloxacino, eritromicina, clindamicina y linezolid, el rango de concentración utilizado fue de 0.03 mg/L a 128 mg/L. Para tetraciclina el rango de fue de 0.008 mg/L a 128 mg/L; el rango de rifampicina fue de 0,0001 mg/L a 128 mg/L; y para fidaxomicina fue el rango de de 0.002 a 8 mg/L.

Para la preparación del inóculo, los aislamientos fueron sembrados por estría en agar Brazier's (Lab M Limited, Lancashire, UK) e incubados durante 24 h en anaerobiosis; a partir del cultivo en placa se inocularon caldos tubos con 5 ml de caldo Schaedler pre reducido y se incubaron durante 18 h en atmósfera anaerobia. Los cultivos en caldo Schaedler se inocularon en placas de agar Wilkins-Chalgren con las diferentes concentraciones de antibióticos, usando un inoculador multipunto (marca) que dispensó  $10^4$  unidades formadoras de colonias por punto. Se incluyó una placa de agar sin agente antimicrobiano como control de crecimiento en atmósfera tanto aeróbica como anaeróbica y las placas se leyeron después de 48 h de incubación a 37 ° C en un ambiente anaeróbico. La cepa de *C. difficile* ATCC 700057 se utilizó como control de calidad. La concentración mínima inhibitoria se tomó como la concentración en la cual hubo una reducción del crecimiento comparado con el control sin antimicrobiano.

Los resultados de las pruebas de sensibilidad de moxifloxacino, vancomicina, metronidazol y rifampicina se interpretaron de acuerdo con las tablas de puntos de corte (tabla 6) del European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) para la interpretación de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y los diámetros de zona para *C. difficile* (versión 7.1, 2017, <http://www.eucast.org>). Los resultados de clindamicina y tetraciclina se interpretaron utilizando el documento M100-S27 del CLSI, utilizando los puntos de corte para anaerobios. Para la eritromicina, se usó el punto de

corte epidemiológico reportado por EUCAST para *C. difficile* (<https://mic.eucast.org/Eucast2/>). Finalmente, se usaron los puntos de corte recomendados para ciprofloxacino (Rashid y Dalhoff *et al.* 2014), linezolid (Pelaez y Alonso *et al.* 2002) y fidaxomicina (Freeman y Vernon *et al.* 2015).

**Tabla 6.** Puntos de corte para los antimicrobianos utilizados.

<b>Antimicrobiano</b>	<b>Corte (mg/L)</b>
Ciprofloxacino	$\geq 8$
Moxifloxacino	$\geq 8$
Eritromicina	$\geq 4$
Clindamicina	$\geq 8$
Vancomicina	$\geq 4$
Metronidazol	$\geq 4$
Linezolid	$\geq 8$
Fidaxomicina	$\geq 1$
Rifampicina	$\geq 0.008$
Tetraciclina	$\geq 16$

### **6.6. Evaluación de la producción de biopelícula.**

La evaluación de la producción de biopelícula se determinó mediante la tinción con cristal violeta. Los aislamientos fueron inoculados por estría en CDA y se incubaron a 37°C por 24 horas; después, se inocularon caldos infusión cerebro corazón (BHI) suplementados con cisteína al 0.1% y extracto de levadura al 0.5% (caldo BHIS) y se incubaron en las mismas condiciones.

Posteriormente se realizó una dilución 1:10 de los caldos con crecimiento en caldo BHIS fresco. Con la dilución se inocularon 4 pocillos de una placa de microtitulación (Corning and Falcon, MA, EUA) con 200  $\mu$ L cada uno; además, se inocularon 4 pocillos con caldo BHIS estéril como blanco. Las placas fueron selladas con parafilm y se incubaron durante 48 horas a 37°C en atmósfera de anaerobiosis. Después de la incubación se tomaron 100  $\mu$ L del caldo de uno de los cuatro pocillos de cada aislamiento y se transfirió a una placa nueva para medir la absorbancia a 595 nm. Esta lectura se tomó como absorbancia de células planctónicas. Después, se descartó el caldo de todos los pocillos con pipeta, cuidando de no desprender la biopelícula; una vez eliminado el caldo, la biopelícula fue fijada con la adición de 200  $\mu$ l de metanol. Se incubó durante 15 min a temperatura ambiente y después el metanol se retiró con pipeta multicanal; después, se realizaron tres lavados con 200  $\mu$ l de agua destilada estéril. Finalmente, se realizó un paso adicional de fijación/secado durante una hora a 60°C en un horno.

La biopelícula se tiñó con 100  $\mu$ l de cristal violeta de Hucker al 0.1% durante 15 minutos a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo, se eliminó el cristal violeta y se realizaron 5 lavados con 200  $\mu$ l de agua destilada estéril y se dejó secar a temperatura ambiente, durante toda la noche. Para la lectura de la absorbancia, el cristal violeta fue disuelto con ácido acético al 30 % durante 30 min. Finalmente, se determinó la densidad óptica (DO) a 595 nm en un lector de microplacas (iMark™, Bio-Rad Laboratories Inc, CA, USA).

Para clasificar a los aislamientos en cuanto a producción de biopelícula, se realizó un cálculo dividiendo la absorbancia de la biopelícula teñida entre la absorbancia de las células planctónicas. El resultado obtenido se denominó índice de biopelícula (IBP) y se utilizó como criterio para la clasificación de los aislamientos:

No productor: < 0.9

Débil productor: 0.9 - 1.2

Fuerte productor: > 1.2

### **6.7. Determinación del desprendimiento de biopelícula.**

Se realizaron ensayos de desprendimiento a los aislamientos que se clasificaron como productores fuertes; se utilizaron utilizando distintos tratamientos que degradan específicamente moléculas que pueden formar parte de la biopelícula (carbohidratos, proteínas y DNA).

La evaluación de la producción de biopelícula se determinó mediante la tinción con cristal violeta. Los aislamientos fueron inoculados por estría en CDA y se incubaron a 37°C por 24 horas; después, se inocularon caldos infusión cerebro corazón (BHI) suplementados con cisteína al 0.1% y extracto de levadura al 0.5% (caldo BHIS) y se incubaron en las mismas condiciones.

Posteriormente se realizó una dilución 1:10 de los caldos con crecimiento en caldo BHIS fresco. Con la dilución se inocularon 4 pocillos de una placa de microtitulación (Corning and Falcon, MA, EUA) con 200 µL cada uno; además, se inocularon 4 pocillos con caldo BHIS estéril como blanco. Para un mismo grupo de aislamientos, el proceso se realizó en cuatro microplacas distintas, a fin de utilizar una placa como control de absorbancia, y tres placas para evaluar la presencia de proteínas, carbohidratos y ADN (una placa por molécula). Las placas fueron selladas con parafilm y se incubaron durante 48 horas a 37°C en atmósfera de anaerobiosis.

Después, se descartó el caldo de todos los pocillos con pipeta, cuidando de no desprender la biopelícula; una vez eliminado el caldo, la biopelícula fue fijada con la adición de 200 µl de metanol. Se incubó durante 15 min a temperatura ambiente y después

el metanol se retiró con pipeta multicanal; después, se realizaron tres lavados con 200 µl de agua destilada estéril. Finalmente, se realizó un paso adicional de fijación/secado durante una hora a 60°C en un horno.

Posteriormente, en una de las placas se le añadió en cada pocillo 200 µl de proteinasa K a 0.1 mg/ml (Bioline, Londres, UK) en Tris-HCl 20 mM y 100 mM NaCl a pH: 7.5. De manera similar, en otra de las microplacas en cada pocillo se añadieron 200 µl de NaIO<sub>4</sub> a 40 mM de (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) disuelta en agua bidestilada; y finalmente, una microplaca fue tratada con 200 µl de DNasa I a 0.5 mg/ml (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) en disuelta en MgCl<sub>2</sub> al 5 mM. Además, se dejó una placa control sin tratamiento. Las microplacas con tratamiento se incubaron a 35°C durante 24 h.

Después de la incubación, se eliminaron los reactivos de cada placa y se realizaron 3 lavados con agua destilada estéril; las placas se dejaron secar a temperatura ambiente durante toda la noche. La biopelícula fue teñida con 100 µl de cristal violeta de Hucker al 0.1% durante 15 minutos a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo, se eliminó el cristal violeta y se realizaron 5 lavados con 200 µl de agua destilada estéril y se dejó secar a temperatura ambiente, durante toda la noche. Para la lectura de la absorbancia, el cristal violeta fue disuelto con ácido acético al 30 % durante 30 min. Finalmente, se determinó la DO a 595 nm en un lector de microplacas (iMark™, Bio-Rad Laboratories Inc, CA, USA).

El porcentaje de desprendimiento se calculó por la diferencia entre el promedio de la DO de los pocillos tratados y el control:

$$\% \text{ desprendimiento} = 100 - \frac{(\text{DO promedio Tratamiento})(100)}{\text{DO Control no tratado}}$$

El criterio de evaluación se llevó a cabo de la siguiente manera: <10% se consideró sin desprendimiento, de 10 a 50% se consideró como desprendimiento intermedio, de 51 a 75% desprendimiento moderadamente fuerte y más de 75% como desprendimiento fuerte.

### **6.8. Evaluación de la expresión de genes asociados a adherencia.**

Se evaluó mediante PCR en tiempo real la expresión de genes que codifican proteínas involucradas en la adherencia: las proteína A de la capa S (SlpA) y la cistein proteasa Cwp84; lo anterior se evaluó en aislamientos seleccionados de diversos ribotipos y niveles de producción de biopelícula, en el modelo utilizado para el estudio de la producción de biofilm.

#### **6.8.1. Ensayos de expresión.**

Los aislamientos fueron inoculados por estría en CDA y se incubaron a 37°C por 24 horas; después, se inocularon caldos infusión cerebro corazón (BHI) suplementados con cisteína al 0.1% y extracto de levadura al 0.5% (caldo BHIS) y se incubaron en las mismas condiciones. Posteriormente se realizó una dilución 1:10 de los caldos con crecimiento en caldo BHIS fresco. Con la dilución se inocularon 4 pocillos de una placa de microtitulación (Corning and Falcon, MA, EUA) con 200 µL cada uno; además, se inocularon 4 pocillos con caldo BHIS estéril como blanco. Las placas fueron selladas con parafilm y se incubaron durante 72 horas a 37°C en atmósfera de anaerobiosis.

#### **6.8.2. Extracción de RNA.**

Después de la incubación se transfirieron 500 µL del caldo de los cuatro pocillos de cada aislamiento a un vial de 1.5 ml y se centrifugaron a 3500 rpm durante 5 min. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 200 µL de buffer Tris-HCl 10 mM pH 8; además, se agregaron 4 µL de una solución de lisozima a 50 mg/L y se agitó en

vórtex. Los tubos se mantuvieron en incubación por una hora en baño de agua a 37°C; después de la incubación, se agregaron 6 µL de proteinasa K a 10 mg/L y se incubó a 55°C por una hora.

Al finalizar la incubación se agregaron 200 µL de una solución de lisis y se dejó incubando 10 min a temperatura ambiente; a partir de este lisado se extrajo el ARN total utilizando el kit QIAmp DSP viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se determinó la cantidad y calidad del ARN total por espectrofotometría en el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, MA, EE. UU.) midiendo la relación de absorbancias a 260/280 y empleando la siguiente fórmula: [ARN] = A260 x factor de dilución x 40 µg/mL.

### 6.8.3. Estandarización de PCR en tiempo real.

Se construyeron curvas estándar para los genes blanco (*cwp84* y *slpA*) y el gen endógeno (16S rRNA); para *cwp84* y *slpA* el rango dinámico utilizado fue de 12.5 ng a 200 ng por reacción con diluciones seriadas 1:2. De manera similar, el rango empleado para el gen endógeno fue de 6.25 a 100 ng por reacción con diluciones seriadas 1:2. Se utilizaron los oligonucleótidos diseñados por Deneve *et al* (Deneve y Bouttier *et al.* 2009) que se enlistan en la tabla 7.

**Tabla 7.** Oligonucleótidos utilizados para la PCR en tiempo real.

Oligonucleótido	Secuencia	Producto (pb)
16S-F	GGGAGACTTGAGTGCAGGAG	120
16S-R	GTGCCTCAGCGTCAGTTACA	
<i>cwp84</i> -F	TGGGCAACTGGTGGAAAATA	151
<i>cwp84</i> -R	TAGTTGCACCTTGTGCCTCA	

<i>slpA</i> -F	AATGATAAAGCATTGTAGTTGGTG	126
<i>slpA</i> -R	TATTGGAGTAGCATCTCCATC	

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando un termociclador Cepheid SmartCycler II real-time PCR system (Cepheid, Sunnyvale, CA). Para cada gen, las mezclas de la amplificación por PCR (25 µL), contenían 1X de 2X Reaction Mix, 0.5 µL de SuperScript III RT/Platinum Taq Mix, 5 mM de MgSO<sub>4</sub>, 400 nM de cada oligonucleótido descrito en la tabla 7 y la cantidad de ARN correspondiente a cada dilución de la curva. Cada punto de la curva estándar fue incluido por triplicado. Para la amplificación se llevó a cabo un paso inicial de retrotranscripción a 50°C por 15 min; seguido de 1 ciclo de activación de la polimerasa a 95°C por 5 min; posteriormente se incluyeron 45 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 s, alineamiento a 60°C por 30 s y extensión a 72°C por 25 s.

Los Ct obtenidos para cada punto de la curva fueron promediados y utilizados para graficar logaritmo de la cantidad de ARN utilizado contra Ct; se obtuvo la R<sup>2</sup> y se determinó la ecuación de la gráfica (y = mx + b) mediante regresión lineal. La eficiencia (E) de la reacción fue determinada mediante la fórmula:

$$E = (10^{(-1/m)} - 1) \times 100$$

Donde m es la pendiente obtenida de la ecuación de la gráfica. Las curvas estándar fueron validadas cuando la eficiencia de la reacción alcanzó de 90% a 100% y la R<sup>2</sup> fue de al menos 0.9.

#### **6.8.4. Determinación de la expresión de *cwp84* y *slpA*.**

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando un termociclador Pico Real-Time PCR System (Helixis, CA, EE. UU.). Para cada gen, las mezclas de la amplificación

por PCR (15  $\mu$ L) incluyeron: 1X de 2X Reaction Mix, 0.3  $\mu$ L de SuperScript III RT/Platinum Taq Mix, 5 mM de MgSO<sub>4</sub>, 400 nM de cada oligonucleótido descrito en la tabla 7 y 100 ng de ARN. Las reacciones fueron realizadas por duplicado por cada aislamiento y por gen. La amplificación se llevó a cabo con las mismas condiciones utilizadas en la estandarización.

Los resultados obtenidos para cada aislamiento y por gen fueron normalizados utilizando los niveles de expresión en las cepas ATCC 9689 y BAA-1805 (calibradores), tanto para el gen endógeno como para los genes de interés. Para ello se calculó la cantidad de nanogramos del gen de interés y del endógeno tanto en los aislamientos como en las cepas calibradoras. Los niveles de expresión relativos se calcularon siguiendo la fórmula siguiente, propuesta por Chang *et al* (Chang y Chen *et al.* 2004).

$$\text{de expresión relativa} = \frac{\text{Número de veces}}{\text{de expresión relativa}} = \frac{\text{ng del gen de interés en aislamientos}}{\text{ng del gen endógeno en aislamientos}} \bigg/ \frac{\text{ng del gen de interés en calibrador}}{\text{ng del gen endógeno en calibrador}}$$

Se consideró como sobreexpresión de los genes cuando el nivel de la expresión relativa era al menos 3 en comparación con la cepa calibradora. Los resultados se expresaron como expresión relativa media  $\pm$  desviación estándar.

### **6.9. Análisis estadístico.**

Se determinó la asociación entre las características de los aislamientos mediante la prueba de chi-cuadrada utilizando el software SPSS Statistics version 22.0 (IBM Corporation, Somers, NY). Este método se utilizó para determinar asociación entre el ribotipo y la producción fuerte de biofilm, así como ribotipo y resistencia a fármacos.

Además, para determinar si hay diferencia entre grupos de aislamientos y la expresión de genes se utilizó la prueba U de Mann-Whitney utilizando el software antes mencionado. Para todas las pruebas estadísticas, un valor de  $P < 0.05$  se consideró estadísticamente significativo.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Aislamientos.

Se procesaron un total de 332 muestras colectadas en el periodo de febrero de 2011 a enero de 2016, de las cuales 214 provenían del hospital Civil de Guadalajara y 118 muestras provenían del Hospital Universitario en Monterrey. El diagnóstico de los pacientes, se realizó principalmente por el sistema Xpert® *C. difficile*/Epi en 213 de las muestras, mientras que 141 de las muestras fueron analizadas mediante el uso de Meridian ImmunoCard® Toxins A&B; por lo que 22 muestras fueron analizadas mediante ambos sistemas.

En cuanto al cultivo, se obtuvieron 132 aislamientos que fueron confirmados como *C. difficile* por medio de la amplificación de un fragmento del gen *tpi* y por el sistema MALDI-TOF, con el 100 % de concordancia entre los dos métodos. Para el estudio se incluyó un aislamiento por paciente.

### 7.2. Tipificación y ribotipos.

Los genes de la toxina A y de la toxina B fueron amplificados en todos los aislamientos (*tcdA+*, *tcdB+*), mientras que los genes de la toxina binaria fueron amplificados en 89 (67.4%) de los aislamientos (*cdtA+*, *cdtB+*); de este grupo, 86 (96.6%) contenían además la delección de 18 pb en *tcdC* (*tcdCΔ18+*), mientras que tres (3.4%) aislamientos no presentaron delección (*tcdCΔ18-*). En el grupo de aislamientos sin toxina binaria (43, 32.6%), solo uno (2.3%) presentó la delección de 18 pb en *tcdC*, mientras que el resto (97.7%) no contenían delección.

El análisis de ribotipificación por medio de PCR agrupó a 81 (61.4%) aislamientos con un patrón de bandas igual al de la cepa control BAA-1805 de ribotipo 027; además, estos aislamientos amplificaron los genes de las toxinas A, B y binaria y contenían la delección de 18 pb, por lo que fueron designados con este ribotipo. De este grupo de aislamientos se seleccionaron 12 para el análisis de ribotipo por electroforesis capilar en el laboratorio de referencia en Leeds y el estudio confirmó el ribotipo. Por otro lado, hubo un segundo grupo de 18 aislamientos (13.6%) con un patrón de bandas similar al de la cepa ATCC 9689 de ribotipo 001; de este grupo se confirmaron cuatro aislamientos como ribotipo 001 en el laboratorio de referencia por lo que todos los demás también fueron designados como tal. Finalmente, en los 33 aislamientos restantes se identificaron los ribotipos 002, 003, 012, 014, 017, 019, 020, 076, 106, 176, 220 y 353; así como ribotipos que no pudieron ser identificados en 16 aislamientos (tabla 8).

**Tabla 8.** Correlación de ribotipos con genotipo.

<b>n (%)</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Ribotipos</b>
81 (61.4)	<i>tcdA+</i> , <i>tcdB+</i> , <i>cdtA+</i> , <i>cdtB+</i> , <i>tcdCΔ18+</i>	027
18 (13.6)	<i>tcdA+</i> , <i>tcdB+</i> , <i>cdtA-</i> , <i>cdtB-</i> , <i>tcdCΔ18-</i>	001
4 (3)	<i>tcdA+</i> , <i>tcdB+</i> , <i>cdtA-</i> , <i>cdtB-</i> , <i>tcdCΔ18-</i>	106
3 (2.3)	<i>tcdA+</i> , <i>tcdB+</i> , <i>cdtA+</i> , <i>cdtB+</i> , <i>tcdCΔ18+</i>	176
1 (0.8)	<i>tcdA+</i> , <i>tcdB+</i> , <i>cdtA-</i> , <i>cdtB-</i> , <i>tcdCΔ18-</i>	003
1 (0.8)	<i>tcdA+</i> , <i>tcdB+</i> , <i>cdtA+</i> , <i>cdtB+</i> , <i>tcdCΔ18-</i>	019
1 (0.8) <sup>a</sup>	<i>tcdA+</i> , <i>tcdB+</i> , <i>cdtA-</i> , <i>cdtB-</i> , <i>tcdCΔ18-</i>	002, 012, 014, 017, 020, 076, 220, 353

<sup>a</sup> Un aislamiento por ribotipo

### 7.3. Susceptibilidad de aislamientos.

Se encontró susceptibilidad reducida a ciprofloxacino, moxifloxacino, eritromicina, clindamicina y rifampicina en más del 70% de los aislamientos, mientras que no se detectaron aislamientos con susceptibilidad reducida para fidaxomicina o tetraciclina; sin embargo, se encontraron proporciones relativamente altas de susceptibilidad reducida para agente antimicrobianos utilizados como tratamiento para la ICD, tales como vancomicina y metronidazol (tabla 9).

**Tabla 9.** Susceptibilidad global de aislamientos.

<b>Antimicrobiano</b>	<b>CMI<sub>50</sub> (mg/L)</b>	<b>CMI<sub>90</sub> (mg/L)</b>	<b>SR n (%)</b>
<i>Asociados a ICD</i>			
Ciprofloxacino	>128	>128	129 (97.7)
Moxifloxacino	32	64	113 (85.6)
Eritromicina	>128	>128	103 (78)
Clindamicina	>128	>128	110 (83)
Tetraciclina	0.06	0.5	0 (0)
<i>Tratamiento de ICD</i>			
Vancomicina	2	4	41 (31)
Metronidazol	2	8	23 (17.4)
Fidaxomicina	0.015	0.06	0 (0)
Rifampicina	>128	>128	105 (79.5)
<i>Potencialmente terapéuticos</i>			
Linezolid	4	16	48 (36.4)

SR = susceptibilidad reducida

La susceptibilidad reducida fue mayor a 90% en el grupo de aislamientos del ribotipo 027 para ciprofloxacino, moxifloxacino, eritromicina, clindamicina y rifampicina;

mientras que en el grupo de aislamientos del ribotipo 001 solo hubo susceptibilidad reducida mayor a 90% para ciprofloxacino y eritromicina; sin embargo, se encontró susceptibilidad reducida mayor al 80% en moxifloxacino, clindamicina y rifampicina. Hubo asociación entre la susceptibilidad reducida a moxifloxacino, eritromicina, clindamicina, rifampicina ( $P < 0.001$ ) y vancomicina ( $P < 0.05$ ) y el ribotipo 027. De manera similar, hubo asociación entre la susceptibilidad reducida a eritromicina ( $P < 0.05$ ) y la susceptibilidad reducida a linezolid ( $P < 0.01$ ) con el ribotipo 001.

**Tabla 10.** Susceptibilidad de los ribotipos 027 y 001.

Antimicrobiano	Ribotipo 027 (n = 81)			Ribotipo 001 (n = 18)		
	CMI <sub>50</sub> (mg/L)	CMI <sub>90</sub> (mg/L)	SR n (%)	CMI <sub>50</sub> (mg/L)	CMI <sub>90</sub> (mg/L)	SR n (%)
<i>Asociados a ICD</i>						
Ciprofloxacino	>128	>128	80 (98.8)	>128	>128	18 (100)
Moxifloxacino	32	64	80 (98.8)	48	64	16 (88.9)
Eritromicina	>128	>128	76 (93.8)	>128	>128	17 (94.4)
Clindamicina	>128	>128	79 (97.5)	>128	>128	16 (88.9)
Tetraciclina	0.03	0.25	0 (0)	0.125	4	0 (0)
<i>Tratamiento de ICD</i>						
Vancomicina	2	4	30 (37)	2	4	6 (33.3)
Metronidazol	2	8	14 (17.3)	0.25	0.5	0 (0)
Fidaxomicina	0.015	0.06	0 (0)	0.026	0.03	0 (0)
Rifampicina	>128	>128	80 (98.8)	>128	>128	15 (83.3)
<i>Potencialmente terapéuticos</i>						
Linezolid	4	8	31 (38.3)	8	32	12 (66.7)

SR = susceptibilidad reducida

#### 7.4. Producción de biopelícula y ensayos de desprendimiento.

Los aislamientos de *C. difficile* mostraron capacidad de adherirse *in vitro* sobre superficies de poliestireno. Más del 70% (98/132) de los aislamientos fueron clasificados como productores fuertes de biopelícula, mientras que el 22% (29/132) fueron no productores y el 4.5% (6/132) solo produjeron biopelícula débilmente.

La mayoría de los aislamientos productores fuertes pertenecieron al ribotipo 027, sin embargo no se encontró asociación entre el ribotipo y la producción fuerte de biopelícula ( $P > 0.05$ ).

**Tabla 11.** Producción de biopelícula y ribotipos.

<b>n (%)</b>	<b>Clasificación</b>	<b>Ribotipos (n)</b>
29 (22)	No adherente	027 (16), 001 (6), otros RT (7)
6 (4.5)	Adherencia débil	027 (3), 176 (1), otros RT (2)
97 (73.5)	Adherencia fuerte	027 (62), 001 (12), 106 (3), otros RT (20)

Los ensayos de desprendimiento de biopelícula se realizaron en 71 aislamientos productores fuertes de biopelícula que pertenecían a los principales ribotipos encontrados: los ribotipos 001 (12 aislamientos) y 027 (59 aislamientos). En la tabla se muestran los rangos de desprendimiento, la media y la desviación estándar.

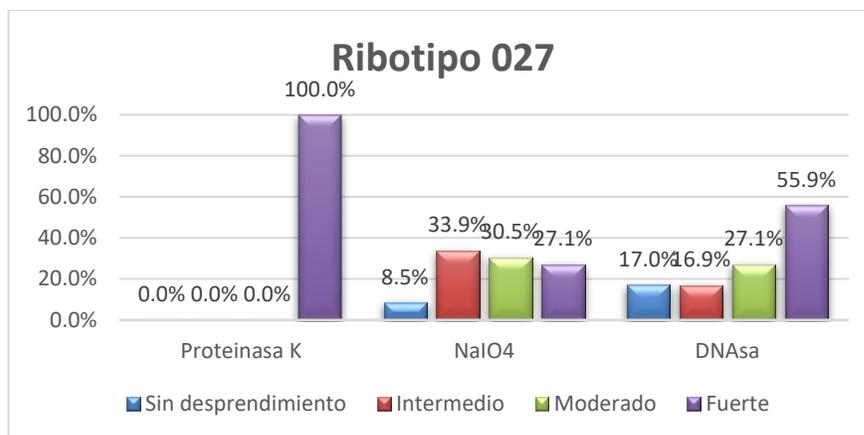
Los ensayos mostraron el mayor desprendimiento de la biopelícula cuando esta fue tratada con proteinasa K, obteniéndose porcentajes de desprendimiento mayores al 90% para ambos ribotipos; sin embargo, en los tratamientos con NaIO<sub>4</sub> (para carbohidratos) y DNAsa (DNA en biopelícula) los resultados fueron muy variables con rangos que van

desde 0.8 % (nulo desprendimiento) hasta 99.8 (desprendimiento fuerte); por lo que no hubo diferencias significativas de desprendimiento en ninguno de los tratamientos ni por ribotipo.

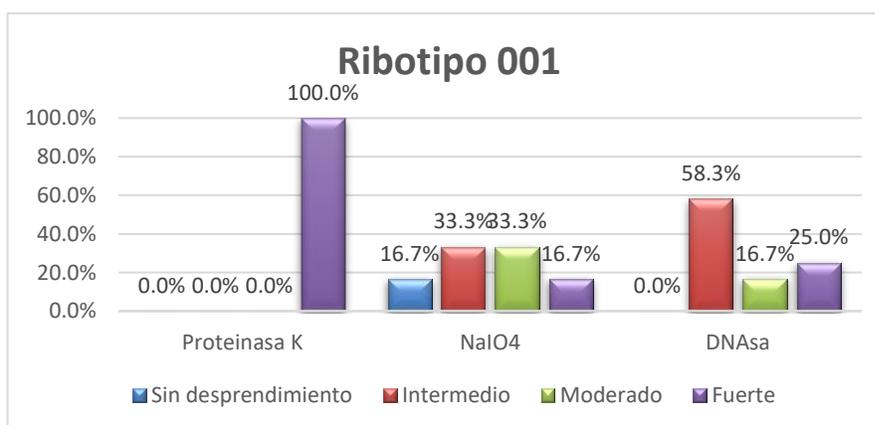
**Tabla 12.** Rangos y medias de desprendimiento por tratamiento y ribotipo.

<b>Proteinasa K</b>		
	<b>RT 001</b>	<b>RT027</b>
<b>Rango (%)</b>	96.9 – 99.6	95.5 – 99.8
<b>Media (%) ±SD</b>	98.8 ± 0.9	99.2 ± 0.8
<b>Metaperyodato de sodio</b>		
<b>Rango (%)</b>	0.8 – 81.8	3 – 89.6
<b>Media (%)±SD</b>	49.3 ± 28.4	53.8 ± 25.5
<b>DNAsa I</b>		
<b>Rango (%)</b>	12.5 – 86.5	23.2 – 98.9
<b>Media (%)±SD</b>	51 ± 25.3	73.7 ± 21.9

En la siguientes figuras se muestran las proporciones de aislamientos de cada ribotipo que no presentaron desprendimiento (<10%), de desprendimiento intermedio (10 a 50%), de desprendimiento moderadamente fuerte (51 a 75%) y de desprendimiento fuerte (más de 75%). Para ambos ribotipos, el 100% de los aislamientos mostraron desprendimiento fuerte de la biopelícula cuando esta fue tratada con proteinasa K; sin embargo, en los tratamientos con NaIO<sub>4</sub> (para carbohidratos), alrededor del 30% de los aislamientos en ambos ribotipos tuvieron desprendimiento intermedio y moderado. En el tratamiento con DNAsa (DNA en biopelícula), más de la mitad de los aislamientos tuvieron desprendimiento fuerte en el ribotipo 027, mientras que una proporción similar fue encontrada en el ribotipo 001 pero en desprendimiento intermedio.



**Figura 3.** Proporciones de desprendimiento por tratamiento en ribotipo 027.



**Figura 4.** Proporciones de desprendimiento por tratamiento en ribotipo 001.

### 7.5. Expresión de *cwp84* y *slpA*.

Se analizaron 44 aislamientos, 17 de los cuales pertenecían al ribotipo 001 y 27 al ribotipo 027. De los aislamientos del ribotipo 001, cinco fueron clasificados como no productores de biopelícula y 12 como productores fuertes; mientras que en los aislamientos de ribotipo 027, 13 de ellos eran no productores y 14 productores fuertes.

En el grupo de aislamientos del ribotipo 001 y tomando en cuenta el punto de corte para considerar sobreexpresión de los genes *slpA* y *cwp84* (al menos 3 veces el nivel de

expresión de la cepa calibradora) se encontró sobreexpresión de *cwp84* en 2/5 (40%) de los aislamientos no productores de biofilm y en 4/12 (33.3%) de los aislamientos productores fuertes; mientras que *slpA* fue sobreexpresado en 5/5 (100%) aislamientos no productores y en 12/12 (100%) de los aislamientos productores fuertes de biopelícula. En el grupo de aislamientos del ribotipo 027 solamente se encontró sobreexpresión de *cwp84* en un 1/13 (7.7%) aislamiento no productor de biofilm, y en ninguno de los aislamientos productores fuertes; mientras que *slpA* fue sobreexpresado en 4/13 (30.8%) aislamientos no productores y en 1/14 (7.1%) de los aislamientos productores fuertes de biopelícula.

En la siguiente tabla se muestran los resultados de la expresión relativa media de los aislamientos por ribotipo y por gen, así como el resultado de la prueba estadística. Solamente hubo diferencia significativa en la expresión de *slpA* en los aislamientos productores fuertes y no productores del ribotipo 027.

**Tabla 13.** Expresión relativa media de los aislamientos.

<b>Ribotipo</b>	<b>Gen</b>	<b>No productores Media ± DE</b>	<b>Productores Media ± DE</b>	<b>Valor P</b>
001	<i>cwp84</i>	4.1±3.6	3.2±3.4	0.461
	<i>slpA</i>	15.2 ±7.3	13±8.4	0.598
027	<i>cwp84</i>	1.6±0.97	0.99±0.68	0.099
	<i>slpA</i>	3.7±5.9	0.77±1.65	0.017*

DE: desviación estándar; P: valor P,  $\alpha=0.05$

## 8. DISCUSIÓN

Múltiples factores determinan la incidencia, la gravedad y la mortalidad asociadas a la ICD, algunos de los cuales son la resistencia a los antimicrobianos, el tipo de cepa, la producción de toxinas, esporulación y factores de virulencia adicionales, como la producción de biopelícula. En este estudio se pretendió hacer un análisis de distintos factores de virulencia que están presentes en las cepas circulantes de *C. difficile* en México y que probablemente contribuyan a su diseminación y adaptación.

Aunque se analizaron muestras de pacientes con diagnóstico confirmado de ICD (por diversas metodologías además del diagnóstico clínico), no fue posible recuperar el agente causal en 60.2% de las muestras. Esto contrasta con diversos estudios en donde los porcentajes de recuperación son mayores (>90%) (Tyrrell y Citron *et al.* 2013; Han y Chang *et al.* 2014). La baja recuperación puede deberse a múltiples factores entre los que se encuentra el almacenamiento inadecuado, ya que largos periodos de congelación pudieran haber afectado la viabilidad de las esporas; además, es probable que antes de su congelación, hayan pasado varias horas desde la obtención de la muestra hasta su correcto almacenamiento. Sumado a esto, a pesar de haber utilizado un medio selectivo para *C. difficile*, hay otros medios enriquecidos con sales biliares que estimulan la germinación de las esporas, dando una mejor recuperación (Tyrrell y Citron *et al.* 2013). En cuanto a la identificación por ambos sistemas (PCR y MALDI-TOF), hubo concordancia del 100%, lo que indica que ambos sistemas son útiles para la identificación de *C. difficile*, aunque el sistema MALDI-TOF posee la ventaja de ser un método más rápido.

En nuestro estudio, el ribotipo 027 fue la cepa predominante, que representó el 61.4% de los casos. Este ribotipo, está ampliamente distribuido y cuenta con diversos reportes en instituciones de todo el mundo (Barbut y Mastrantonio *et al.* 2007; Cheknis y Sambol *et al.* 2009; Bauer y Notermans *et al.* 2011); desde su aparición hasta la actualidad, este ribotipo ha sido asociado a una mayor morbi-mortalidad y se ha descrito como la cepa predominante en brotes e incluso como una cepa endémica en varias instituciones. En nuestro país, esta cepa ha sido reportada previamente, en un estudio microbiológico-molecular en uno de los hospitales de nuestro medio (Camacho-Ortiz y Lopez-Barrera *et al.* 2015); sin embargo, en el presente estudio se estudió un mayor número de casos y de aislamientos, lo que permitió recuperar aislamientos de otros ribotipos diferentes a la cepa 027. Sin embargo, esta cepa también ha sido descrita en otros nosocomios a nivel nacional, como en Jalisco en donde también es el ribotipo predominantemente encontrado (Morfin-Otero y Garza-Gonzalez *et al.* 2016). Lo anterior apoya la idea generalizada de que la cepa ribotipo 027 posee un mayor grado de adaptabilidad y sus características favorecen la diseminación y permanencia dentro de las instituciones de salud. Además, es bien sabido que en nuestro país aún hay mucho por hacer en cuanto a control del uso de antimicrobianos, y siendo este el factor de riesgo más importante para el desarrollo de la ICD es poco probable que haya una disminución de la presencia de esta cepa e incluso de la ICD en nuestro medio mientras no haya un adecuado control y educación sobre el uso adecuado de antimicrobianos.

El segundo ribotipo más frecuente en nuestro medio fue el ribotipo 001, representando el 13.6% de los casos. Esta cepa es el principal ribotipo circulante en Corea (Lee y Lee *et al.* 2014), Republica checa (Krutova y Matejkova *et al.* 2016), Croacia

(Novak y Spigaglia *et al.* 2014) y Eslovaquia (Nyc y Krutova *et al.* 2015); esta cepa se ha asociado con una alta resistencia a los antibióticos, incluida la resistencia a ciprofloxacino, eritromicina y clindamicina (Novak y Spigaglia *et al.* 2014; Adler y Miller-Roll *et al.* 2015), que por sí mismos son factores de riesgo para el desarrollo de ICD. El ribotipo 001 es una cepa epidémica en Europa durante un largo periodo de tiempo, ya que ha sido reportada en estudios multicéntricos europeos en diversos años; fue reportado como el segundo ribotipo de PCR en 2008 por Bauer *et al.* (Bauer y Notermans *et al.* 2011) y también en 2015 por Davies *et al.* (Davies y Ashwin *et al.* 2016). Sin embargo, esta es la primera descripción de la circulación de este ribotipo en México. El hecho de encontrar un segundo ribotipo predominante (si bien su proporción es varias veces menor que la frecuencia del ribotipo 027) sugiere que las condiciones de las instituciones de salud propician la aparición y mantenimiento de cepas específicas. Además, el encontrar un ribotipo que es predominante en otros países y que ha persistido durante largos periodos, es un motivo de preocupación ya que por una parte, significa que en existen dos cepas virulentas y con farmacoresistencia que coexisten en durante un mismo periodo de tiempo y en un mismo nosocomio (todos los casos de ribotipo 001 fueron obtenidos en Guadalajara); y por otra parte, que pudiera ocurrir desplazamientos de un ribotipo por otro si se dan las condiciones propicias.

Por otro lado, se encontraron algunos aislamientos de ribotipos que también han sido reportados en diversas áreas geográficas y que incluso son cepas predominantes. Tal es el caso del ribotipo 106 (se encontraron cuatro aislamientos) que fue el ribotipo más frecuente en un estudio en Escocia (Wiuff y Brown *et al.* 2011) y que se asoció con resistencia a moxifloxacino, levofloxacino, eritromicina y cefotaxima. El ribotipo 176 (tres

aislamientos) está relacionado con el ribotipo 027, ya que pertenece al mismo clado y posee las mismas características en cuanto a toxinotipo, incluso se ha reportado que el sistema Gene Xpert que se basa en la detección de la toxina binaria, detecta como ribotipo 027 a los aislamientos del ribotipo 176. Por otro lado, se encontraron (un aislamiento por ribotipo) el ribotipo 002, una cepa emergente y la tercera más frecuente en Japón (Senoh y Kato *et al.* 2015); el ribotipo 014, el cual ha sido detectado tanto en fuentes humanas como en reservorios animales como cerdos, vacas, gatos, cabras y ovejas (Knight y Squire *et al.* 2016) y se encuentra dentro de los 10 ribotipos más detectados en Europa (Bauer y Notermans *et al.* 2011; Davies y Longshaw *et al.* 2014; Davies y Ashwin *et al.* 2016) y los Estados Unidos (Tenover y Tickler *et al.* 2012; Tickler y Goering *et al.* 2014): y el ribotipo 017, el cual no expresa TcdA debido a una deleción en *tcdA*, sin embargo, se ha relacionado con enfermedad severa y está ampliamente distribuido en Asia (Collins y Hawkey *et al.* 2013; Cairns y Preston *et al.* 2015).

De acuerdo con nuestros resultados, la resistencia a fármacos en esta especie, es bastante alta como ha sido descrito en estudios anteriores y de diversos ribotipos; las cepas del ribotipo 001, han sido reportadas hasta un 99% resistentes a moxifloxacino y levofloxacino en Alemania (Zaiss y Witte *et al.* 2010). Del mismo modo, en Escocia, se han notificado niveles elevados de resistencia a moxifloxacino, levofloxacino, eritromicina y cefotaxima (Wiuff y Brown *et al.* 2011).

En ambos ribotipos hubo una elevada proporción de susceptibilidad reducida para los antibióticos que frecuentemente se relacionan con el desarrollo de la ICD, tal como clindamicina, quinolonas y rifampicina. En este último caso, Norén *et al* encontraron que el 80% los aislamientos que estudiaron presentaban CMI muy bajas ( $> 0.016 \mu\text{g/ml}$ ) o bien

CMI elevadas ( $>256 \mu\text{g/ml}$ ), lo que sugiere una distribución bimodal para este fármaco (Noren y Alriksson *et al.* 2010); además, en un estudio Europeo, en Italia se encontraron proporciones muy altas de resistencia a rifampicina, lo cual se asoció con el uso de la misma para tratamiento para la tuberculosis (Freeman y Vernon *et al.* 2015).

Existen pocos estudios en donde se haya reportado susceptibilidad reducida a linezolid en *C. difficile* (Marin y Martin *et al.* 2015; Freeman y Pilling *et al.* 2017); sin embargo, en el presente estudio se encontró susceptibilidad disminuida en el 36,4% de los aislamientos. Además, los aislamientos del ribotipo 001 mostraron los CMI más altos (8-32  $\mu\text{g/ml}$ ) y se encontró asociación entre este ribotipo y la susceptibilidad reducida a linezolid ( $p < 0.001$ ). Linezolid es un antimicrobiano usado ampliamente en el Hospital Civil de Guadalajara para el tratamiento de la neumonía nosocomial, infecciones de heridas quirúrgicas y también se usa para infecciones del torrente sanguíneo no asociadas a catéter. Esto último puede explicar la alta proporción de aislamientos con susceptibilidad reducida a linezolid que fueron recuperados en esta institución (el 85.4 % de los aislamientos resistentes se aislaron de este hospital).

El tratamiento estándar para la ICD es vancomicina o metronidazol, como se recomienda en las guías clínicas (Cohen y Gerding *et al.* 2010). La resistencia a la vancomicina se ha informado escasamente (Freeman y Vernon *et al.* 2015; Freeman y Pilling *et al.* 2017); sin embargo, no se han definido valores de corte clínicamente relevantes ya que se alcanzan concentraciones muy altas en tracto gastrointestinal tras la administración oral de vancomicina, por lo que los valores de CMI obtenidos pudieran no reflejar la realidad clínica y por el término “resistencia” no puede utilizarse para describir los valores obtenidos en los aislamientos. Por otra parte, se encontraron proporciones

relativamente altas de susceptibilidad reducida a metronidazol, lo que contrasta con diversos estudios en donde no han detectado susceptibilidad reducida (Cheng y Xiao *et al.* 2016; Fraga y Nicodemo *et al.* 2016; Aptekorz y Szczegielniak *et al.* 2017). Similar al caso de vancomicina, metronidazol alcanza niveles altos de concentración en colon por lo que la susceptibilidad reducida podría carecer de relevancia clínica. Sumado a esto, las fallas clínicas con metronidazol como tratamiento se han atribuido al desarrollo de heterorresistencia, lo que implica la existencia de sub poblaciones resistentes, dentro de la población bacteriana total y que son seleccionables por el tratamiento (Pelaez y Cercenado *et al.* 2008). Además, se sabe que la resistencia al metronidazol es inestable, con la pérdida de niveles de resistencia debido a la manipulación de laboratorio (Spigaglia 2016); por lo que aun los aislamientos susceptibles pudieran representar aislamientos que potencialmente podrían desarrollar susceptibilidad reducida o resistencia ante la presión selectiva del antibiótico.

Recientemente la FDA, aprobó a la fidaxomicina para el tratamiento de la ICD; la principal ventaja de este nuevo fármaco es que tiene un espectro limitado de actividad antimicrobiana, lo que lo hace adecuado para el tratamiento con ICD ya que no altera significativamente la microbiota intestinal. (Crawford y Huesgen *et al.* 2012). Para la fidaxomicina se han reportado CMI bajas, ya que presenta buena actividad con diversas cepas de *C. difficile* (CMI 90 de 0.5 µg/mL) (Goldstein y Babakhani *et al.* 2012). Sin embargo, se ha reportado susceptibilidad reducida a este fármaco en algunos estudios; particularmente en un ensayo clínico se detectaron aislamientos con CMI 16 µg/mL (Goldstein y Citron *et al.* 2011), a pesar de ello, los pacientes involucrados respondieron al tratamiento por lo que no se detectó resistencia clínica. La CMI 90 en nuestro estudio fue

0.06 µg/mL; lo anterior es de particular relevancia ya que la fidaxomicina no está disponible en los hospitales mexicanos y ninguno de los pacientes incluidos en el estudio estuvo expuesto a este medicamento; por lo que los valores obtenidos en el presente estudio sirven como datos basales antes de la introducción del fármaco en el país; una vez que eso suceda es necesario mantener la vigilancia a fin de prevenir la aparición y diseminación de clonas con susceptibilidad reducida que pudieran generar un problema nuevo de resistencia.

El estudio de la biopelícula de *C. difficile* es aún un área en desarrollo; poco estudios se han realizado analizando biopelícula de esta especie, y hasta el momento no se han analizado aislamientos clínicos, si no que se han realizado estudios de ciencia básica (Dawson y Valiente *et al.* 2012; Dapa y Unnikrishnan 2013; Semenyuk y Laning *et al.* 2014). Además, la formación de biopelícula en otros patógenos se asocia con farmacorresistencia gracias a la barrera poco permeable que representa la matriz extracelular que compone la biopelícula. En *C. difficile* la biopelícula pudiera representar un ambiente cerrado en el que además de proteger a la población bacteriana de la presión del antibiótico, pudiera además propiciar la aparición de recurrencias de la enfermedad.

La mayoría de los aislamientos analizados fueron productores fuertes de biopelícula o bien, presentaron adherencia fuerte al poliestireno; sin embargo, no hubo asociación con algún ribotipo. Ethapa *et al* estudiaron la biopelícula producida por dos cepas de *C. difficile*; una cepa de ribotipo no hipervirulento (RT 012) y una cepa de ribotipo 027; y encontraron que la formación de biopelícula era mayor y en menor tiempo, por la cepa de ribotipo 027 llegando a un máximo a las 72 h (Ethapa y Leuzzi *et al.* 2013). Se ha estudiado la biopelícula de *C. difficile* en biopelícula de tres, cinco y seis días, con la

máxima formación a los cinco días (Dawson y Valiente *et al.* 2012; Semenyuk y Laning *et al.* 2014); sin embargo, en este estudio observamos que a las 48 horas de incubación la mayoría de los aislamientos mostraron adherencia, lo cual concuerda con estudios en donde se ha estudiado la biopelícula a 48 y 72 horas y donde se muestra que está completamente estructurada a ese tiempo de incubación (Dawson y Valiente *et al.* 2012).

Además, la observación microscópica ha revelado que la biopelícula está formada por varias capas de bacterias protegidas por una matriz densa (Dawson y Valiente *et al.* 2012; Ethapa y Leuzzi *et al.* 2013; Semenyuk y Laning *et al.* 2014). En el presente estudio se evaluó la posible participación de proteínas, carbohidratos y DNA extracelular como componentes de la matriz. Todas las cepas analizadas presentaron desprendimiento mayor al 90% cuando se trató con proteinasa K la biopelícula de 48 horas; lo que sugiere una participación importante de esta biomolécula en la adherencia inicial o en el proceso de maduración de biopelícula. Lo anterior concuerda con estudios en donde tras tratar la biopelícula preformada con proteinasa K, se observó una disminución de la biopelícula en comparación con el control sin tratar; además, el tratamiento previno la formación de biopelícula cuando se añadió proteinasa K previo a la formación de la biopelícula (Ethapa y Leuzzi *et al.* 2013). En el caso de los carbohidratos, también han sido estudiados como probables componentes, ya que en algunos estudios se han realizados marcajes específicos de carbohidratos y se han observado como estructuras fibrosas que se extienden sobre la matriz de la biopelícula (Ethapa y Leuzzi *et al.* 2013); sin embargo, la evidencia sugiere que los polisacáridos en la regiones intercelulares y los polisacáridos alrededor de las células individuales no son similares (Semenyuk y Laning *et al.* 2014). En nuestro estudio, el rango de desprendimiento varió desde considerarse sin desprendimiento hasta

desprendimiento fuerte pero con proporciones similares en ambos ribotipos estudiados, lo que implica que el tipo de polisacárido no varía según el ribotipo, si no que otros factores modifican la proporción de carbohidratos y/o tipo de carbohidratos en la matriz. El ADN extra celular también se ha descrito como un componente esencial de la biopelícula en *C. difficile*, pero en proporciones menores a las de las proteínas (Ethapa y Leuzzi *et al.* 2013); en este estudio la proporción de desprendimiento fue diferente para las dos cepas estudiadas, siendo mayor el desprendimiento en las cepas de ribotipo 027.

Aunque la metodología utilizada es ampliamente conocida y sirve de modelo para explicar y estudiar la formación de biopelícula en distintos patógenos, en el caso de *C. difficile* sirve como aproximación a lo que pudiera suceder *in vivo*, ya que aunque las células de *C. difficile*, presentan adherencia fuerte, podría no ser el modelo ideal para el estudio de la biopelícula de *C. difficile*; sin embargo, la capacidad de adherencia de *in vitro* de los aislamientos podría indicar mejor colonización *in vivo* (Ethapa y Leuzzi *et al.* 2013). Evidencia sugiere que la colonización por *C. difficile* es un proceso complejo y que involucra diversas moléculas que aún se encuentran en estudio y de las cuales se busca determinar su contribución a la adherencia inicial de *C. difficile*; tal es el caso de la cisteína proteasa Cwp84 y de la proteína SlpA, la cual es una proteína precursora escindida por Cwp84 para formar las subunidades de alto y bajo peso molecular en la capa S de *C. difficile* (Sarker y Paredes-Sabja 2012). Dicha capa S, se encuentra involucrada en la adherencia inicial de *C. difficile* en el colon, ya que se ha demostrado que la eliminación de SlpA, elimina la capacidad de adherencia a células en cultivo (Sarker y Paredes-Sabja 2012). En el presente trabajo *slpA* se encontró sobreexpresado en el 100% de los aislamientos de ribotipo 001 independientemente de su capacidad de producción de

biopelícula; en contraste *cwp84* prácticamente no se sobreexpresó en ninguno de los dos ribotipos. Tomando en cuenta lo reportado por diversos autores, en donde encuentran sobre expresión de las moléculas anteriores ante el estímulo de concentraciones subinhibitorias de antibióticos (Deneve y Delomenie *et al.* 2008; Deneve y Bouttier *et al.* 2009), es posible que la baja expresión de estas moléculas tenga que ver con el modelo utilizado, ya que no se indujo la expresión al someter a las células al estrés del antibiótico y el cual funcionaría como el estímulo para iniciar la adherencia y la posterior formación de biopelícula. Es posible que lo anterior se deba a que la adherencia inicial se dé además sobre receptores celulares (aún desconocidos) de las células epiteliales del colon. Además, Cwp84 no solo participa en la maduración de la capa S, sino que además funciona degradando la matriz extracelular del colon y produciendo nutrientes para las bacterias adherentes (Sarker y Paredes-Sabja 2012); lo que explica la baja expresión encontrada, ya que no existen en el modelo los estímulos necesarios para su producción. Lo anterior resalta la necesidad de encontrar modelos adecuados para el estudio de la biopelícula de *C. difficile* para entender su rol en la patogénesis.

## 9. CONCLUSIONES

1. Existe circulación de los ribotipos hipervirulentos RT027 y RT001 en México.
2. El ribotipo 027 está asociado con susceptibilidad reducida a moxifloxacino, eritromicina, clindamicina, rifampicina y vancomicina.
3. El ribotipo 001 está asociado con susceptibilidad reducida a eritromicina y linezolid.
4. Los aislamientos clínicos de *C. difficile* son productores fuertes de biopelícula; sin embargo, no existe asociación con los ribotipos encontrados.
5. Las proteínas tienen una participación importante en la formación de la matriz de la biopelícula; mientras que la contribución de DNA y carbohidratos es variable.
6. El gen *slpA* se sobre expresa en las cepas de ribotipo 001 durante el establecimiento de la biopelícula.

## **10.PERSPECTIVAS**

1. Realizar un estudio más amplio cuidando las condiciones de captación de muestras para mejorar la recuperación.
2. Determinar la composición de biopelícula ante diferentes condiciones tal como la presión de antibióticos.
3. Determinar la composición de biopelícula a varios tiempos de maduración de biopelícula.
4. Determinar la expresión de moléculas asociadas a la biopelícula en diferentes condiciones de presión con antibióticos.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Adler A, Miller-Roll T, Bradenstein R, Block C, Mendelson B, Parizade M, Paitan Y, Schwartz D, Peled N, Carmeli Y y Schwaber MJ. 2015. A national survey of the molecular epidemiology of *Clostridium difficile* in Israel: the dissemination of the ribotype 027 strain with reduced susceptibility to vancomycin and metronidazole. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 83(1): 21-24.
- Al-Nassir WN, Sethi AK, Li Y, Pultz MJ, Riggs MM y Donskey CJ. 2008. Both oral metronidazole and oral vancomycin promote persistent overgrowth of vancomycin-resistant enterococci during treatment of *Clostridium difficile*-associated disease. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 52(7): 2403-2406.
- Aptekorz M, Szczegieliński A, Wiechula B, Harmanus C, Kuijper E y Martirosian G. 2017. Occurrence of *Clostridium difficile* ribotype 027 in hospitals of Silesia, Poland. *Anaerobe*.
- Aslam S, Hamill RJ y Musher DM. 2005. Treatment of *Clostridium difficile*-associated disease: old therapies and new strategies. *The Lancet Infectious Diseases* 5(9): 549-557.
- Balassiano IT, Yates EA, Domingues RM y Ferreira EO. 2012. *Clostridium difficile*: a problem of concern in developed countries and still a mystery in Latin America. *Journal of medical microbiology* 61(Pt 2): 169-179.
- Barbut F, Mastrantonio P, Delmee M, Brazier J, Kuijper E y Poxton I. 2007. Prospective study of *Clostridium difficile* infections in Europe with phenotypic and genotypic characterisation of the isolates. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 13(11): 1048-1057.
- Bartlett JG, Chang TW, Gurwith M, Gorbach SL y Onderdonk AB. 1978. Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia. *The New England journal of medicine* 298(10): 531-534.
- Bauer MP, Notermans DW, van Benthem BH, Brazier JS, Wilcox MH, Rupnik M, Monnet DL, van Dissel JT y Kuijper EJ. 2011. *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey. *Lancet* 377(9759): 63-73.
- Bidet P, Barbut F, Lalande V, Burghoffer B y Petit JC. 1999. Development of a new PCR-ribotyping method for *Clostridium difficile* based on ribosomal RNA gene sequencing. *FEMS microbiology letters* 175(2): 261-266.
- Brazier JS, Raybould R, Patel B, Duckworth G, Pearson A, Charlett A y Duerden BI. 2008. Distribution and antimicrobial susceptibility patterns of *Clostridium difficile* PCR ribotypes in English hospitals, 2007-08. *Euro surveillance: bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 13(41).
- Burnham CA y Carroll KC. 2013. Diagnosis of *Clostridium difficile* infection: an ongoing conundrum for clinicians and for clinical laboratories. *Clinical microbiology reviews* 26(3): 604-630.
- Cairns MD, Preston MD, Lawley TD, Clark TG, Stabler RA y Wren BW. 2015. Genomic Epidemiology of a Protracted Hospital Outbreak Caused by a Toxin A-Negative

- Clostridium difficile* Sublineage PCR Ribotype 017 Strain in London, England. *Journal of clinical microbiology* 53(10): 3141-3147.
- Camacho-Ortiz A, Lopez-Barrera D, Hernandez-Garcia R, Galvan-De Los Santos AM, Flores-Trevino SM, Llaca-Diaz JM, Maldonado-Garza HJ, Bosques-Padilla FJ y Garza-Gonzalez E. 2015. First report of *Clostridium difficile* NAP1/027 in a Mexican hospital. *PloS one* 10(4): e0122627.
- Camacho-Ortiz A, Ponce-de-Leon A y Sifuentes-Osornio J. 2009. [*Clostridium difficile* associated disease in Latin America]. *Gaceta medica de Mexico* 145(3): 223-229.
- Cohen SH, Gerding DN, Johnson S, Kelly CP, Loo VG, McDonald LC, Pepin J y Wilcox MH. 2010. 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). *Infection control and hospital epidemiology* 31(5): 431-455.
- Collins DA, Hawkey PM y Riley TV. 2013. Epidemiology of *Clostridium difficile* infection in Asia. *Antimicrobial resistance and infection control* 2(1): 21.
- Crawford T, Huesgen E y Danziger L. 2012. Fidaxomicin: a novel macrocyclic antibiotic for the treatment of *Clostridium difficile* infection. *American journal of health-system pharmacy: AJHP: official journal of the American Society of Health-System Pharmacists* 69(11): 933-943.
- Chang LL, Chen HF, Chang CY, Lee TM y Wu WJ. 2004. Contribution of integrons, and SmeABC and SmeDEF efflux pumps to multidrug resistance in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 53(3): 518-521.
- Cheknis AK, Sambol SP, Davidson DM, Nagaro KJ, Mancini MC, Hidalgo-Arroyo GA, Brazier JS, Johnson S y Gerding DN. 2009. Distribution of *Clostridium difficile* strains from a North American, European and Australian trial of treatment for *C. difficile* infections: 2005-2007. *Anaerobe* 15(6): 230-233.
- Cheng JW, Xiao M, Kudinha T, Kong F, Xu ZP, Sun LY, Zhang L, Fan X, Xie XL y Xu YC. 2016. Molecular Epidemiology and Antimicrobial Susceptibility of *Clostridium difficile* Isolates from a University Teaching Hospital in China. *Frontiers in microbiology* 7: 1621.
- Dapa T y Unnikrishnan M. 2013. Biofilm formation by *Clostridium difficile*. *Gut microbes* 4(5): 397-402.
- Davies KA, Ashwin H, Longshaw CM, Burns DA, Davis GL y Wilcox MH. 2016. Diversity of *Clostridium difficile* PCR ribotypes in Europe: results from the European, multicentre, prospective, biannual, point-prevalence study of *Clostridium difficile* infection in hospitalised patients with diarrhoea (EUCLID), 2012 and 2013. *Euro surveillance: bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 21(29).
- Davies KA, Longshaw CM, Davis GL, Bouza E, Barbut F, Barna Z, Delmee M, Fitzpatrick F, Ivanova K, Kuijper E, Macovei IS, Mentula S, Mastrantonio P, von Muller L, Oleastro M, Petinaki E, Pituch H, Noren T, Novakova E, Nyc O, Rupnik M, Schmid D y Wilcox MH. 2014. Underdiagnosis of *Clostridium difficile* across Europe: the European, multicentre, prospective, biannual, point-prevalence study of *Clostridium difficile* infection in hospitalised patients with diarrhoea (EUCLID). *The Lancet. Infectious diseases* 14(12): 1208-1219.

- Dawson LF, Valiente E, Faulds-Pain A, Donahue EH y Wren BW. 2012. Characterisation of *Clostridium difficile* biofilm formation, a role for Spo0A. *PLoS one* 7(12): e50527.
- Debast SB, Bauer MP y Kuijper EJ. 2014. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 20 Suppl 2: 1-26.
- Deneve C, Bouttier S, Dupuy B, Barbut F, Collignon A y Janoir C. 2009. Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on colonization factor expression by moxifloxacin-susceptible and moxifloxacin-resistant *Clostridium difficile* strains. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 53(12): 5155-5162.
- Deneve C, Delomenie C, Barc MC, Collignon A y Janoir C. 2008. Antibiotics involved in *Clostridium difficile*-associated disease increase colonization factor gene expression. *Journal of medical microbiology* 57(Pt 6): 732-738.
- Dickinson B y Surawicz CM. 2014. Infectious diarrhea: an overview. *Current gastroenterology reports* 16(8): 399.
- Donelli G, Vuotto C, Cardines R y Mastrantonio P. 2012. Biofilm-growing intestinal anaerobic bacteria. *FEMS immunology and medical microbiology* 65(2): 318-325.
- Drudy D, Harnedy N, Fanning S, Hannan M y Kyne L. 2007. Emergence and control of fluoroquinolone-resistant, toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile*. *Infection control and hospital epidemiology* 28(8): 932-940.
- Eckert C, Jones G y Barbut F. 2013. Diagnosis of *Clostridium difficile* infection: the molecular approach. *Future microbiology* 8(12): 1587-1598.
- Egerer M, Giesemann T, Jank T, Satchell KJ y Aktories K. 2007. Auto-catalytic cleavage of *Clostridium difficile* toxins A and B depends on cysteine protease activity. *The Journal of biological chemistry* 282(35): 25314-25321.
- Ethapa T, Leuzzi R, Ng YK, Baban ST, Adamo R, Kuehne SA, Scarselli M, Minton NP, Serruto D y Unnikrishnan M. 2013. Multiple factors modulate biofilm formation by the anaerobic pathogen *Clostridium difficile*. *Journal of bacteriology* 195(3): 545-555.
- Fraga EG, Nicodemo AC y Sampaio JL. 2016. Antimicrobial susceptibility of Brazilian *Clostridium difficile* strains determined by agar dilution and disk diffusion. *The Brazilian journal of infectious diseases: an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases* 20(5): 476-481.
- Freeman J, Pilling S, Vernon J y Wilcox MH. 2017. In Vitro Activities of MCB3681 and Eight Comparators against *Clostridium difficile* Isolates with Known Ribotypes and Diverse Geographical Spread. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 61(3).
- Freeman J, Vernon J, Morris K, Nicholson S, Todhunter S, Longshaw C y Wilcox MH. 2015. Pan-European longitudinal surveillance of antibiotic resistance among prevalent *Clostridium difficile* ribotypes. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 21(3): 248 e249-248 e216.
- Gaynes R, Rimland D, Killum E, Lowery HK, Johnson TM, 2nd, Killgore G y Tenover FC. 2004. Outbreak of *Clostridium difficile* infection in a long-term care facility: association with gatifloxacin use. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 38(5): 640-645.

- George WL, Sutter VL, Citron D y Finegold SM. 1979. Selective and differential medium for isolation of *Clostridium difficile*. *Journal of clinical microbiology* 9(2): 214-219.
- Gerding DN. 2004. Clindamycin, cephalosporins, fluoroquinolones, and *Clostridium difficile*-associated diarrhea: this is an antimicrobial resistance problem. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 38(5): 646-648.
- Gerding DN, Johnson S, Rupnik M y Aktories K. 2014. *Clostridium difficile* binary toxin CDT: mechanism, epidemiology, and potential clinical importance. *Gut microbes* 5(1): 15-27.
- Ghose C. 2013. *Clostridium difficile* infection in the twenty-first century. *Emerging Microbes & Infections* 2(9): e62.
- Goldstein EJ, Babakhani F y Citron DM. 2012. Antimicrobial activities of fidaxomicin. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 55 Suppl 2: S143-148.
- Goldstein EJ, Citron DM, Sears P, Babakhani F, Sambol SP y Gerding DN. 2011. Comparative susceptibilities to fidaxomicin (OPT-80) of isolates collected at baseline, recurrence, and failure from patients in two phase III trials of fidaxomicin against *Clostridium difficile* infection. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 55(11): 5194-5199.
- Golledge CL, Carson CF, O'Neill GL, Bowman RA y Riley TV. 1992. Ciprofloxacin and *Clostridium difficile*-associated diarrhoea. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 30(2): 141-147.
- Goorhuis A, Debast SB, van Leengoed LA, Harmanus C, Notermans DW, Bergwerff AA y Kuijper EJ. 2008. *Clostridium difficile* PCR ribotype 078: an emerging strain in humans and in pigs? *Journal of clinical microbiology* 46(3): 1157; author reply 1158.
- Gorbach SL. 1999. Antibiotics and *Clostridium difficile*. *The New England journal of medicine* 341(22): 1690-1691.
- Goudarzi M, Seyedjavadi SS, Goudarzi H, Mehdizadeh Aghdam E y Nazeri S. 2014. *Clostridium difficile* Infection: Epidemiology, Pathogenesis, Risk Factors, and Therapeutic Options. *Scientifica* 2014: 916826.
- Hall IC y O'Toole E. 1935. Intestinal flora in new-born infants: With a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. *American Journal of Diseases of Children* 49(2): 390-402.
- Han SB, Chang J, Shin SH, Park KG, Lee GD, Park YG y Park YJ. 2014. Performance of chromID *Clostridium difficile* agar compared with BBL *C. difficile* selective agar for detection of *C. difficile* in stool specimens. *Annals of laboratory medicine* 34(5): 376-379.
- Hirota S, Sasaki T, Kuwahara-Arai K y Hiramatsu K. 2011. Rapid and accurate identification of human-associated staphylococci by use of multiplex PCR. *Journal of clinical microbiology* 49(10): 3627-3631.
- Huang H, Weintraub A, Fang H, Wu S, Zhang Y y Nord CE. 2010. Antimicrobial susceptibility and heteroresistance in Chinese *Clostridium difficile* strains. *Anaerobe* 16(6): 633-635.
- Huang H, Wu S, Wang M, Zhang Y, Fang H, Palmgren AC, Weintraub A y Nord CE. 2009. *Clostridium difficile* infections in a Shanghai hospital: antimicrobial

- resistance, toxin profiles and ribotypes. *International journal of antimicrobial agents* 33(4): 339-342.
- Janezic S, Indra A, Rattei T, Weinmaier T y Rupnik M. 2014. Recombination drives evolution of the *Clostridium difficile* 16S-23S rRNA intergenic spacer region. *PLoS one* 9(9): e106545.
- Janezic S, Ocepek M, Zidaric V y Rupnik M. 2012. *Clostridium difficile* genotypes other than ribotype 078 that are prevalent among human, animal and environmental isolates. *BMC microbiology* 12: 48.
- Janoir C. 2016. Virulence factors of *Clostridium difficile* and their role during infection. *Anaerobe* 37: 13-24.
- Johnson S, Samore MH, Farrow KA, Killgore GE, Tenover FC, Lyras D, Rood JJ, DeGirolami P, Baltch AL, Rafferty ME, Pear SM y Gerding DN. 1999. Epidemics of diarrhea caused by a clindamycin-resistant strain of *Clostridium difficile* in four hospitals. *The New England journal of medicine* 341(22): 1645-1651.
- Kachrimanidou M y Malisiovas N. 2011. *Clostridium difficile* infection: a comprehensive review. *Critical reviews in microbiology* 37(3): 178-187.
- Khan FY y Elzouki A-N. 2014. *Clostridium difficile* infection: a review of the literature. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 7: S6-S13.
- Killgore G, Thompson A, Johnson S, Brazier J, Kuijper E, Pepin J, Frost EH, Savelkoul P, Nicholson B, van den Berg RJ, Kato H, Sambol SP, Zukowski W, Woods C, Limbago B, Gerding DN y McDonald LC. 2008. Comparison of seven techniques for typing international epidemic strains of *Clostridium difficile*: restriction endonuclease analysis, pulsed-field gel electrophoresis, PCR-ribotyping, multilocus sequence typing, multilocus variable-number tandem-repeat analysis, amplified fragment length polymorphism, and surface layer protein A gene sequence typing. *Journal of clinical microbiology* 46(2): 431-437.
- Kim HY, Cho A, Kim JW, Kim H y Kim B. 2018. High prevalence of *Clostridium difficile* PCR ribotype 078 in pigs in Korea. *Anaerobe* 51: 42-46.
- Knight DR, Squire MM, Collins DA y Riley TV. 2016. Genome Analysis of *Clostridium difficile* PCR Ribotype 014 Lineage in Australian Pigs and Humans Reveals a Diverse Genetic Repertoire and Signatures of Long-Range Interspecies Transmission. *Frontiers in microbiology* 7: 2138.
- Knoop FC, Owens M y Crocker IC. 1993. *Clostridium difficile*: clinical disease and diagnosis. *Clinical microbiology reviews* 6(3): 251-265.
- Kolli S, Mallipedhi A, Thomas R y Reddy MK. 2009. Injudicious antibiotic use leading to fulminating *Clostridium difficile* infection: a case report. *Cases journal* 2: 7978.
- Krutova M, Matejkova J, Kuijper EJ, Drevinek P y Nyc O. 2016. *Clostridium difficile* PCR ribotypes 001 and 176 - the common denominator of *C. difficile* infection epidemiology in the Czech Republic, 2014. *Euro surveillance: bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 21(29).
- Krutova M, Zouharova M, Matejkova J, Tkadlec J, Krejci J, Faldyna M, Nyc O y Bernardy J. 2018. The emergence of *Clostridium difficile* PCR ribotype 078 in piglets in the Czech Republic clusters with *Clostridium difficile* PCR ribotype 078 isolates from Germany, Japan and Taiwan. *International journal of medical microbiology : IJMM* 308(7): 770-775.

- Land KM y Johnson PJ. 1999. Molecular basis of metronidazole resistance in pathogenic bacteria and protozoa. *Drug resistance updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* 2(5): 289-294.
- Le Monnier A, Zahar JR y Barbut F. 2014. Update on *Clostridium difficile* infections. *Medecine et maladies infectieuses* 44(8): 354-365.
- Lee JH, Lee Y, Lee K, Riley TV y Kim H. 2014. The changes of PCR ribotype and antimicrobial resistance of *Clostridium difficile* in a tertiary care hospital over 10 years. *Journal of medical microbiology* 63(Pt 6): 819-823.
- Lemee L, Dhalluin A, Testelin S, Mattrat MA, Maillard K, Lemeland JF y Pons JL. 2004. Multiplex PCR targeting *tpi* (triose phosphate isomerase), *tcdA* (Toxin A), and *tcdB* (Toxin B) genes for toxigenic culture of *Clostridium difficile*. *Journal of clinical microbiology* 42(12): 5710-5714.
- Lipovsek S, Leitinger G y Rupnik M. 2013. Ultrastructure of *Clostridium difficile* colonies. *Anaerobe* 24: 66-70.
- Lister M, Stevenson E, Heeg D, Minton NP y Kuehne SA. 2014. Comparison of culture based methods for the isolation of *Clostridium difficile* from stool samples in a research setting. *Anaerobe* 28: 226-229.
- Manzo CE, Merrigan MM, Johnson S, Gerding DN, Riley TV, Silva J, Jr. y Brazier JS. 2014. International typing study of *Clostridium difficile*. *Anaerobe* 28: 4-7.
- Marin M, Martin A, Alcala L, Cercenado E, Iglesias C, Reigadas E y Bouza E. 2015. *Clostridium difficile* isolates with high linezolid MICs harbor the multiresistance gene cfr. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 59(1): 586-589.
- Marwick CA, Yu N, Lockhart MC, McGuigan CC, Wiuff C, Davey PG y Donnan PT. 2013. Community-associated *Clostridium difficile* infection among older people in Tayside, Scotland, is associated with antibiotic exposure and care home residence: cohort study with nested case-control. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 68(12): 2927-2933.
- Morfin-Otero R, Garza-Gonzalez E, Aguirre-Diaz SA, Escobedo-Sanchez R, Esparza-Ahumada S, Perez-Gomez HR, Petersen-Morfin S, Gonzalez-Diaz E, Martinez-Melendez A y Rodriguez-Noriega E. 2016. *Clostridium difficile* outbreak caused by NAP1/BI/027 strain and non-027 strains in a Mexican hospital. *The Brazilian journal of infectious diseases: an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases* 20(1): 8-13.
- Mutlu E, Wroe AJ, Sanchez-Hurtado K, Brazier JS y Poxton IR. 2007. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility patterns of *Clostridium difficile* strains isolated from hospitals in south-east Scotland. *Journal of medical microbiology* 56(Pt 7): 921-929.
- Mylonakis E, Ryan ET y Calderwood SB. 2001. *Clostridium difficile*--Associated diarrhea: A review. *Archives of internal medicine* 161(4): 525-533.
- Neely F, Lambert ML, Van Broeck J y Delmee M. 2017. Clinical and laboratory features of the most common *Clostridium difficile* ribotypes isolated in Belgium. *The Journal of hospital infection* 95(4): 394-399.
- Noren T, Alriksson I, Akerlund T, Burman LG y Unemo M. 2010. In vitro susceptibility to 17 antimicrobials of clinical *Clostridium difficile* isolates collected in 1993-2007 in Sweden. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 16(8): 1104-1110.

- Novak A, Spigaglia P, Barbanti F, Goic-Barisic I y Tonkic M. 2014. First clinical and microbiological characterization of *Clostridium difficile* infection in a Croatian University Hospital. *Anaerobe* 30: 18-23.
- Nyc O, Krutova M, Liskova A, Matejkova J, Drabek J y Kuijper EJ. 2015. The emergence of *Clostridium difficile* PCR-ribotype 001 in Slovakia. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 34(8): 1701-1708.
- Patterson L, Wilcox MH, Fawley WN, Verlander NQ, Geoghegan L, Patel BC, Wyatt T y Smyth B. 2012. Morbidity and mortality associated with *Clostridium difficile* ribotype 078: a case-case study. *The Journal of hospital infection* 82(2): 125-128.
- Pelaez T, Alcalá L, Alonso R, Rodríguez-Creixems M, García-Lechuz JM y Bouza E. 2002. Reassessment of *Clostridium difficile* susceptibility to metronidazole and vancomycin. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 46(6): 1647-1650.
- Pelaez T, Alonso R, Perez C, Alcalá L, Cuevas O y Bouza E. 2002. In vitro activity of linezolid against *Clostridium difficile*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 46(5): 1617-1618.
- Pelaez T, Cercenado E, Alcalá L, Marin M, Martín-López A, Martínez-Alarcón J, Catalán P, Sánchez-Somolinos M y Bouza E. 2008. Metronidazole resistance in *Clostridium difficile* is heterogeneous. *Journal of clinical microbiology* 46(9): 3028-3032.
- Persson S, Jensen JN y Olsen KE. 2011. Multiplex PCR method for detection of *Clostridium difficile* *tcdA*, *tcdB*, *cdtA*, and *cdtB* and internal in-frame deletion of *tcdC*. *Journal of clinical microbiology* 49(12): 4299-4300.
- Persson S, Torpdahl M y Olsen KE. 2008. New multiplex PCR method for the detection of *Clostridium difficile* toxin A (*tcdA*) and toxin B (*tcdB*) and the binary toxin (*cdtA/cdtB*) genes applied to a Danish strain collection. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 14(11): 1057-1064.
- Rashid MU, Dalhoff A, Weintraub A y Nord CE. 2014. In vitro activity of MCB3681 against *Clostridium difficile* strains. *Anaerobe* 28: 216-219.
- Remes-Troche JM. 2012. [*Clostridium difficile*-associated diarrhea infection: is it time for us to start worrying in Mexico?]. *Revista de gastroenterología de México* 77(2): 58-59.
- Reynolds CB, Emerson JE, de la Riva L, Fagan RP y Fairweather NF. 2011. The *Clostridium difficile* cell wall protein CwpV is antigenically variable between strains, but exhibits conserved aggregation-promoting function. *PLoS pathogens* 7(4): e1002024.
- Rohde CL, Bartolini V y Jones N. 2009. The use of probiotics in the prevention and treatment of antibiotic-associated diarrhea with special interest in *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Nutrition in clinical practice: official publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition* 24(1): 33-40.
- Rupnik M. 2005. Revised nomenclature of *Clostridium difficile* toxins and associated genes. *Journal of medical microbiology* 54(2): 113-117.
- Rupnik M. 2010. *Clostridium difficile* toxinotyping. *Methods Mol Biol* 646: 67-76.
- Rupnik M, Avesani V, Janc M, von Eichel-Streiber C y Delmee M. 1998. A novel toxinotyping scheme and correlation of toxinotypes with serogroups of *Clostridium difficile* isolates. *Journal of clinical microbiology* 36(8): 2240-2247.

- Rupnik M, Braun V, Soehn F, Janc M, Hofstetter M, Laufenberg-Feldmann R y von Eichel-Streiber C. 1997. Characterization of polymorphisms in the toxin A and B genes of *Clostridium difficile*. FEMS microbiology letters 148(2): 197-202.
- Rupnik M, Brazier JS, Duerden BI, Grabnar M y Stubbs SL. 2001. Comparison of toxinotyping and PCR ribotyping of *Clostridium difficile* strains and description of novel toxinotypes. Microbiology 147(Pt 2): 439-447.
- Rupnik M, Dupuy B, Fairweather NF, Gerding DN, Johnson S, Just I, Lysterly DM, Popoff MR, Rood JJ, Sonenshein AL, Thelestam M, Wren BW, Wilkins TD y von Eichel-Streiber C. 2005. Revised nomenclature of *Clostridium difficile* toxins and associated genes. Journal of medical microbiology 54(Pt 2): 113-117.
- Rupnik M, Grabnar M y Geric B. 2003. Binary toxin producing *Clostridium difficile* strains. Anaerobe 9(6): 289-294.
- Rupnik M, Widmer A, Zimmermann O, Eckert C y Barbut F. 2008. *Clostridium difficile* toxinotype V, ribotype 078, in animals and humans. Journal of clinical microbiology 46(6): 2146.
- Rupnik M, Wilcox MH y Gerding DN. 2009. *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. Nature reviews. Microbiology 7(7): 526-536.
- Sarker MR y Paredes-Sabja D. 2012. Molecular basis of early stages of *Clostridium difficile* infection: germination and colonization. Future microbiology 7(8): 933-943.
- Semenyuk EG, Laning ML, Foley J, Johnston PF, Knight KL, Gerding DN y Driks A. 2014. Spore formation and toxin production in *Clostridium difficile* biofilms. PloS one 9(1): e87757.
- Senoh M, Kato H, Fukuda T, Niikawa A, Hori Y, Hagiya H, Ito Y, Miki H, Abe Y, Furuta K, Takeuchi H, Tajima H, Tominaga H, Satomura H, Morita S, Tanada A, Hara T, Kawada M, Sato Y, Takahashi M, Higuchi A, Nakajima T, Wakamatsu Y, Toyokawa M, Ueda A, Roberts P, Miyajima F y Shibayama K. 2015. Predominance of PCR-ribotypes, 018 (smz) and 369 (trf) of *Clostridium difficile* in Japan: a potential relationship with other global circulating strains? Journal of medical microbiology 64(10): 1226-1236.
- Shah D, Dang MD, Hasbun R, Koo HL, Jiang ZD, DuPont HL y Garey KW. 2010. *Clostridium difficile* infection: update on emerging antibiotic treatment options and antibiotic resistance. Expert review of anti-infective therapy 8(5): 555-564.
- Spigaglia P. 2016. Recent advances in the understanding of antibiotic resistance in *Clostridium difficile* infection. Therapeutic advances in infectious disease 3(1): 23-42.
- Spigaglia P, Barbanti F, Dionisi AM y Mastrantonio P. 2010. *Clostridium difficile* isolates resistant to fluoroquinolones in Italy: emergence of PCR ribotype 018. Journal of clinical microbiology 48(8): 2892-2896.
- Spigaglia P, Barbanti F y Mastrantonio P. 2011. Multidrug resistance in European *Clostridium difficile* clinical isolates. The Journal of antimicrobial chemotherapy 66(10): 2227-2234.
- Spigaglia P, Barketi-Klai A, Collignon A, Mastrantonio P, Barbanti F, Rupnik M, Janezic S y Kansau I. 2013. Surface-layer (S-layer) of human and animal *Clostridium difficile* strains and their behaviour in adherence to epithelial cells and intestinal colonization. Journal of medical microbiology 62(Pt 9): 1386-1393.

- Spigaglia P y Mastrantonio P. 2004. Comparative analysis of *Clostridium difficile* clinical isolates belonging to different genetic lineages and time periods. *Journal of medical microbiology* 53(Pt 11): 1129-1136.
- Stare BG, Delmee M y Rupnik M. 2007. Variant forms of the binary toxin CDT locus and *tcdC* gene in *Clostridium difficile* strains. *Journal of medical microbiology* 56(Pt 3): 329-335.
- Stevens V, Dumyati G, Brown J y Wijngaarden E. 2011. Differential risk of *Clostridium difficile* infection with proton pump inhibitor use by level of antibiotic exposure. *Pharmacoepidemiology and drug safety* 20(10): 1035-1042.
- Stubbs S, Rupnik M, Gibert M, Brazier J, Duerden B y Popoff M. 2000. Production of actin-specific ADP-ribosyltransferase (binary toxin) by strains of *Clostridium difficile*. *FEMS microbiology letters* 186(2): 307-312.
- Surawicz CM, Brandt LJ, Binion DG, Ananthakrishnan AN, Curry SR, Gilligan PH, McFarland LV, Mellow M y Zuckerbraun BS. 2013. Guidelines for diagnosis, treatment, and prevention of *Clostridium difficile* infections. *Am J Gastroenterol* 108(4): 478-498; quiz 499.
- Tasteyre A, Barc MC, Collignon A, Boureau H y Karjalainen T. 2001. Role of FliC and FliD flagellar proteins of *Clostridium difficile* in adherence and gut colonization. *Infection and immunity* 69(12): 7937-7940.
- Tenover FC, Tickler IA y Persing DH. 2012. Antimicrobial-resistant strains of *Clostridium difficile* from North America. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 56(6): 2929-2932.
- Tickler IA, Goering RV, Whitmore JD, Lynn AN, Persing DH y Tenover FC. 2014. Strain types and antimicrobial resistance patterns of *Clostridium difficile* isolates from the United States, 2011 to 2013. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 58(7): 4214-4218.
- Tschudin-Sutter S. 2014. Molecular epidemiology of *Clostridium difficile* for clinical practice. *Swiss medical weekly* 144: w13995.
- Tyrrell KL, Citron DM, Leoncio ES, Merriam CV y Goldstein EJ. 2013. Evaluation of cycloserine-cefoxitin fructose agar (CCFA), CCFA with horse blood and taurocholate, and cycloserine-cefoxitin mannitol broth with taurocholate and lysozyme for recovery of *Clostridium difficile* isolates from fecal samples. *Journal of clinical microbiology* 51(9): 3094-3096.
- Waligora AJ, Hennequin C, Mullany P, Bourlioux P, Collignon A y Karjalainen T. 2001. Characterization of a cell surface protein of *Clostridium difficile* with adhesive properties. *Infection and immunity* 69(4): 2144-2153.
- Walk ST y Young VB. 2008. Emerging Insights into Antibiotic-Associated Diarrhea and *Clostridium difficile* Infection through the Lens of Microbial Ecology. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases* 2008: 125081.
- Weiss K, Bergeron L, Bernatchez H, Goyette M, Savoie M y Thirion D. 2007. *Clostridium difficile*-associated diarrhoea rates and global antibiotic consumption in five Quebec institutions from 2001 to 2004. *International journal of antimicrobial agents* 30(4): 309-314.
- Wiuff C, Brown DJ, Mather H, Banks AL, Eastaway A y Coia JE. 2011. The epidemiology of *Clostridium difficile* in Scotland. *The Journal of infection* 62(4): 271-279.

- Yip C, Loeb M, Salama S, Moss L y Olde J. 2001. Quinolone use as a risk factor for nosocomial *Clostridium difficile*-associated diarrhea. Infection control and hospital epidemiology 22(9): 572-575.
- Zaiss NH, Witte W y Nubel U. 2010. Fluoroquinolone resistance and *Clostridium difficile*, Germany. Emerging infectious diseases 16(4): 675-677.

## RESUMEN BIOGRÁFICO

M. C. Julio Adrián Martínez Meléndez

Candidato para el Grado de  
Doctor en Ciencias con Orientación en Microbiología

**Tesis:** ANÁLISIS DE FACTORES DE VIRULENCIA EN AISLAMIENTOS DE *Clostridium difficile* DE DOS HOSPITALES DE TERCER NIVEL DE MÉXICO.

**Campo de estudio:** Microbiología Médica y Epidemiología Molecular.

**Datos Personales:** Nacido en Monterrey, Nuevo León el 7 de agosto de 1989, hijo de Julio Martínez Hernández e Isidra Meléndez Marín.

**Educación:** Egresado de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en el año 2012 con el grado de Químico Farmacéutico Biólogo y en el año 2014 con el grado de Maestro en Ciencias con acentuación en Microbiología por la Facultad de Ciencias Biológicas de la misma universidad.

**Experiencia profesional:** Profesor de asignatura en la carrera de Químico Farmacéutico Biólogo de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

## ANEXO I

### Preparación de reactivos y soluciones.

**Agua-DEPC al 0.1%:** Añadir 1 mL de DEPC por cada litro de H<sub>2</sub>O libre de RNAsas y DNAsas previamente esterilizada, incubar de 12-14 h a 37°C con agitación. Esteriliza nuevamente.

**Ácido acético al 30%:** Disolver 30 ml de ácido fórmico en 70 ml de agua destilada.

**Ácido fórmico al 70%:** Disolver 70 ml de ácido fórmico en 30 ml de agua grado HPLC.

**Buffer para proteinasa K:** Pesar 0.5844 g de NaCl y disolver en 100 mL de Tris-HCl 20 mM pH 7.5.

**Buffer de lisis (extracción RNA):** Pesar 15.95 g de tiocianato de guanidina y disolver en 15 ml de Tris-HCl 50 mM, añadir 9 ml de IGEPAL. Ajustar pH a 6.6. Aforar a 30 ml con Tris-HCl 50 mM.

**Bromuro de etidio, 1 mg/mL (Solución stock):** Disolver 50 mg de bromuro de etidio en 40 mL de agua ultrapura. Aforar a 50 mL y almacenar a 4° C protegido de la luz en un recipiente de vidrio ámbar.

**Caldo *Brucella* con glicerol al 15%:** Preparar caldo *Brucella* según las instrucciones del fabricante, empleando una solución de glicerol al 15% en agua destilada como solvente del caldo.

**Caldo BHIS:** Para 100 ml de caldo, pesar 3.7 g de caldo BHI, 0.5 g de extracto de levadura y 0.1 g de cisteína-HCl. Disolver con ligero calentamiento en agua destilada. Esterilizar en autoclave.

**Cristal violeta de Hucker al 0.1%**

Solución A: Disolver 0.1 g de cristal violeta en 20 ml de etanol absoluto.

Solución B: Disolver 0.8 g de oxalato de amonio en 80 ml de agua destilada. Dejar la solución en reposo durante una noche o calentar ligeramente hasta que se solubilice. Mezclar las dos soluciones y filtrar.

**DMSO al 10%:** Disolver 10 ml de dimetilsulfóxido en 90 ml de agua destilada. Manejar en campana de extracción.

**EDTA 500 mM:** Disolver 18.62 g de EDTA en 100 mL de agua destilada y ajustar el pH a 8 con lentejas de NaOH.

**Fenol saturado:** Fundir el fenol a temperatura de 68°C (destilar si su aspecto fundido no es cristalino). Equilibrar el fenol a pH mayor de 7.8. Agregar hidroxiquinoleína a una concentración final de 0.1%

**Gel de agarosa al 2 %:** Disolver 4 g de agarosa en 200 mL de TBE 1X, calentar en microondas hasta fundir, agregar 20  $\mu$ L de bromuro de etidio 1 mg/mL y vaciar en la cámara de electroforesis.

**Gel de agarosa al 3 %:** Disolver 6 g de agarosa en 200 mL de TBE 1X, calentar en microondas hasta fundir, agregar 20  $\mu$ L de bromuro de etidio 1 mg/mL y vaciar en la cámara de electroforesis.

**Jugo azul 5X (Buffer de carga para electroforesis):** Disolver 25 mg de azul de bromofenol, 25 mg de xilencianol y 3 mL de glicerol en TE 1X pH 8 y aforar a 10 mL.

**MgCl<sub>2</sub> (5 mM):** Pesar 0.0476 g de MgCl<sub>2</sub> y aforar a 100 mL en agua destilada.

**NaIO<sub>4</sub> (40 mM):** Pesar 0.8556 g de NaIO<sub>4</sub> y aforar a 100 mL en agua destilada.

**Proteinasa K a 10 mg/mL (extracción de ADN y ARN):** Disolver 10 mg de proteinasa K por cada mililitro de solución de a preparar en agua libre ultrapura.

**Proteinasa K a 10 mg/mL (ensayos de desprendimiento):** Disolver 0.1 mg de proteinasa K por cada mililitro de solución de a preparar en buffer para proteinasa K.

**SEVAG:** Mezclar 24 mL de cloroformo y 1 mL de alcohol isoamílico.

**TBE 10X:** Disolver 27 g de Tris-base, 13.7 g de ácido bórico, 10 mL de EDTA 0.5 M pH 8 en agua destilada, ajustar a pH 8 y aforar a 500 mL. Esterilizar en autoclave.

**TBE 0.5X:** Medir 50 mL de TBE 10X y aforar a 1L con agua destilada.

**TE 1X (Tris-HCl 500 mM pH 8, EDTA 1 mM):** Mezclar 10 mL de Tris-HCl 500 mM pH 8 y 1 mL de EDTA 500 mM en agua destilada, ajustar el pH a 8 y aforar a 500 mL. Esterilizar en autoclave.

**Tris-HCl 500 mM:** Disolver 30.3 g de Tris base en 300 mL de agua destilada, ajustar el pH a 8 con HCl concentrado y aforar a 500 mL.

**Tris-HCl 10 mM, pH 8:** Disolver 0.121 g de Tris base en 80 mL de agua destilada, ajustar el pH a 8 con HCl concentrado y aforar a 100 mL.

**Tris-HCl 10 mM, pH 7.5:** Disolver 0.242 g de Tris base en 80 mL de agua destilada, ajustar el pH a 7.5 con HCl concentrado y aforar a 100 mL.

**Tris-HCl 50 mM, pH 6.6:** Disolver 0.6057 g de Tris base en 80 mL de agua destilada, ajustar el pH a 6.6 con HCl concentrado y aforar a 100 mL.

## ANEXO II

### Procedencia y resultados de tipificación molecular por aislamiento.

Aislamiento	Procedencia	Ribotipo	<i>tcdA</i>	<i>tcdB</i>	<i>cdtA, cdtB</i>	Delección <i>tcdC</i> (pb)
1	GDL	027	+	+	+	18
8	GDL	003	+	+	neg	0
27	GDL	027	+	+	+	18
30	GDL	027	+	+	+	18
33	GDL	027	+	+	+	18
35	GDL	027	+	+	+	18
38	GDL	027	+	+	+	18
39	GDL	001	+	+	neg	0
44	GDL	027	+	+	+	18
45	GDL	027	+	+	+	18
49	GDL	027	+	+	+	18
52	GDL	027	+	+	+	18
54	GDL	027	+	+	+	18
55	GDL	027	+	+	+	18
56	GDL	014	+	+	neg	0
57	GDL	001	+	+	neg	0
58	GDL	027	+	+	+	18
61	GDL	001	+	+	neg	0
63	GDL	027	+	+	+	18
64	GDL	017	+	+	neg	0
65	GDL	027	+	+	+	18
67	GDL	027	+	+	+	18
68	GDL	076	+	+	neg	0
71	GDL	001	+	+	neg	0
72	GDL	027	+	+	+	18
73	GDL	019	+	+	+	0
76	GDL	001	+	+	neg	0
78	GDL	176	+	+	+	18
80	GDL	027	+	+	+	18
82	GDL	001	+	+	neg	0
83	GDL	001	+	+	neg	0
84	GDL	001	+	+	neg	0
85	GDL	001	+	+	neg	0
91	GDL	106	+	+	neg	0

94	GDL	176	+	+	+	18
97	GDL	027	+	+	+	18
98	GDL	027	+	+	+	18
100	HU	027	+	+	+	18
101	HU	027	+	+	+	18
102	HU	027	+	+	+	18
104	HU	027	+	+	+	18
106	HU	012	+	+	neg	0
108	HU	027	+	+	+	18
111	HU	027	+	+	+	18
118	HU	027	+	+	+	18
121	HU	027	+	+	+	18
122	HU	027	+	+	+	18
127	HU	027	+	+	+	18
128	HU	027	+	+	+	18
131	HU	027	+	+	+	18
135	HU	027	+	+	+	18
139	HU	027	+	+	+	18
156	HU	027	+	+	+	18
157	HU	027	+	+	+	18
161	HU	027	+	+	+	18
166	HU	027	+	+	+	18
169	HU	027	+	+	+	18
176	HU	027	+	+	+	18
183	HU	027	+	+	+	18
186	HU	106	+	+	neg	0
195	HU	027	+	+	+	18
15 - 01	GDL	027	+	+	+	18
15 - 02	GDL	027	+	+	+	18
15 - 05	GDL	176	+	+	+	18
15 - 07	GDL	ND	+	+	neg	18
15 - 08	GDL	001	+	+	neg	0
15 - 12	GDL	001	+	+	neg	0
15 - 13	GDL	001	+	+	neg	0
15 - 15	GDL	001	+	+	neg	0
15 - 16	GDL	027	+	+	+	18
15 - 18	GDL	001	+	+	neg	0
15 - 23	GDL	ND	+	+	neg	0
15 - 24	GDL	027	+	+	+	18
15 - 26	GDL	ND	+	+	neg	0
15 - 28	GDL	027	+	+	+	18

15 - 30	GDL	027	+	+	+	18
15 - 31	GDL	027	+	+	+	18
15 - 34	GDL	353	+	+	neg	0
15 - 37	GDL	ND	+	+	neg	0
15 - 38	GDL	027	+	+	+	18
15 - 41	GDL	027	+	+	+	18
15 - 43	GDL	106	+	+	neg	0
15 - 44	GDL	027	+	+	+	18
15 - 47	GDL	027	+	+	+	18
15 - 50	GDL	001	+	+	neg	0
15 - 53	GDL	027	+	+	+	18
15 - 54	GDL	027	+	+	+	18
15 - 58	GDL	027	+	+	+	18
15 - 59	GDL	027	+	+	+	18
15 - 61	GDL	ND	+	+	neg	0
15 - 62	GDL	ND	+	+	+	0
15 - 66	GDL	001	+	+	neg	0
15 - 73	GDL	020	+	+	neg	0
15 - 74	GDL	027	+	+	+	18
15 - 75	GDL	027	+	+	+	18
15 - 76	GDL	027	+	+	+	18
15 - 77	GDL	ND	+	+	neg	0
15 - 80	GDL	001	+	+	neg	0
15 - 81	GDL	ND	+	+	+	18
15 - 83	GDL	027	+	+	+	18
15 - 84	GDL	106	+	+	neg	0
15 - 86	GDL	ND	+	+	+	0
15 - 88	GDL	027	+	+	+	18
15 - 90	GDL	027	+	+	+	18
15 - 92	GDL	220	+	+	neg	0
15 - 93	GDL	027	+	+	+	18
15 - 96	GDL	027	+	+	+	18
15 - 98	GDL	ND	+	+	neg	0
15 - 99	GDL	ND	+	+	neg	0
17 - 31	GDL	027	+	+	+	18
17 - 33	GDL	ND	+	+	+	18
17 - 39	GDL	ND	+	+	neg	0
17 - 40	GDL	ND	+	+	neg	0
17 - 41	GDL	ND	+	+	neg	0
A12	GDL	027	+	+	+	18
A6	GDL	027	+	+	+	18

E02	HU	027	+	+	+	18
E03	HU	027	+	+	+	18
E04	HU	027	+	+	+	18
E05	HU	027	+	+	+	18
E06	HU	027	+	+	+	18
E07	HU	027	+	+	+	18
E09	HU	027	+	+	+	18
E10	HU	002	+	+	neg	0
E11	HU	027	+	+	+	18
E12	HU	027	+	+	+	18
E13	HU	027	+	+	+	18
E14	HU	027	+	+	+	18
E15	HU	027	+	+	+	18
E17	HU	027	+	+	+	18
E19	HU	ND	+	+	neg	0
L14	GDL	001	+	+	neg	0

HU: Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” en Monterrey; GDL: Hospital Cil “Fray Antonio Alcalde” en Guadalajara; pb: pares de bases.

## ANEXO III

### Concentraciones mínimas inhibitorias por aislamiento.

Aislamiento	Ribotipo	CIP	MOX	ERI	CLIN	VAN	MET	LIN	FDX	RIF	TET
1	027	128	32	>128	>128	2	0.5	8	0.06	>128	0.06
8	003	16	2	0.5	1	0.5	0.125	2	0.06	0.002	0.06
27	027	>128	32	>128	>128	2	0.5	8	0.06	>128	0.06
30	027	>128	32	>128	>128	2	0.5	8	0.06	>128	0.06
33	027	128	32	>128	>128	2	0.5	16	0.06	>128	0.06
35	027	>128	32	>128	>128	2	0.5	8	0.03	>128	0.06
38	027	>128	32	>128	>128	2	1	8	0.06	>128	0.06
39	001	16	2	0.25	0.5	1	0.125	2	0.06	0.001	0.06
44	027	>128	32	>128	>128	2	0.5	8	0.06	>128	0.06
45	027	>128	32	>128	>128	2	1	2	0.06	>128	0.06
49	027	>128	32	>128	>128	2	1	8	0.06	>128	0.06
52	027	>128	32	>128	>128	2	1	8	0.06	>128	0.06
54	027	128	32	>128	>128	2	1	8	0.06	>128	0.06
55	027	>128	32	>128	>128	2	1	8	0.06	>128	4
56	014	64	16	1	1	0.5	0.125	2	0.06	0.002	0.06
57	001	64	32	>128	>128	2	0.06	8	0.015	>128	0.125
58	027	128	64	>128	>128	2	1	8	0.03	>128	0.06
61	001	64	>128	>128	>128	2	0.25	16	0.015	1	0.06
63	027	64	32	>128	>128	2	1	8	0.03	>128	0.06
64	017	16	4	0.5	>128	0.5	0.125	2	0.06	0.002	0.06
65	027	>128	32	>128	>128	2	0.5	8	0.03	>128	0.06
67	027	>128	32	>128	>128	2	1	8	0.06	>128	0.25
68	076	16	2	1	1	0.5	0.125	1	0.06	0.002	0.06
71	001	16	2	>128	>128	0.5	0.125	1	0.03	0.001	0.06
72	027	>128	32	>128	>128	2	1	8	0.06	>128	0.06
73	019	16	2	0.5	0.5	0.5	0.125	2	0.06	0.002	0.06
76	001	>128	64	>128	>128	2	0.06	32	0.015	>128	0.125
78	176	>128	32	>128	>128	2	1	8	0.06	>128	0.03
80	027	128	32	>128	>128	2	1	8	0.03	>128	0.06
82	001	>128	32	>128	>128	2	0.06	32	0.015	>128	0.06
83	001	>128	32	>128	>128	2	0.5	8	0.03	>128	0.03
84	001	128	32	>128	>128	2	0.06	32	0.015	>128	0.06
85	001	>128	32	>128	>128	2	0.06	32	0.015	>128	0.125
91	106	16	2	1	0.5	0.5	0.125	2	0.06	0.002	0.06
94	176	128	32	>128	>128	2	1	1	0.06	>128	0.03

97	027	128	32	>128	>128	2	2	8	0.03	>128	0.03
98	027	128	32	>128	>128	2	1	8	0.03	>128	0.06
100	027	128	32	>128	>128	2	0.5	8	0.015	>128	0.06
101	027	128	32	32	>128	2	8	16	ND	64	0.125
102	027	>128	32	>128	>128	4	2	4	0.015	>128	0.06
104	027	>128	32	>128	>128	2	2	4	0.015	>128	0.06
106	012	>128	32	>128	64	2	2	4	0.015	>128	0.25
108	027	>128	32	>128	>128	2	2	4	0.015	>128	0.03
111	027	128	32	>128	>128	4	2	1	0.015	>128	0.03
118	027	128	32	>128	>128	2	2	1	0.015	>128	0.03
121	027	128	32	>128	>128	2	2	4	0.015	>128	0.03
122	027	>128	32	>128	>128	2	2	4	0.015	>128	0.03
127	027	128	32	>128	>128	2	2	4	0.015	>128	0.03
128	027	128	32	>128	>128	2	2	1	0.015	>128	0.03
131	027	128	32	>128	>128	2	2	4	0.06	>128	0.03
135	027	>128	32	>128	>128	2	2	4	0.015	>128	0.03
139	027	128	32	>128	>128	4	2	4	0.015	>128	0.03
156	027	128	32	>128	>128	4	2	4	0.015	>128	0.03
157	027	128	32	32	>128	2	8	16	ND	64	0.125
161	027	>128	32	1	1	4	2	4	0.015	>128	0.03
166	027	128	32	>128	>128	4	2	4	0.015	>128	0.03
169	027	128	32	>128	>128	2	2	4	0.015	>128	0.03
176	027	128	32	>128	>128	2	2	4	0.015	>128	0.03
183	027	128	32	>128	>128	2	2	4	0.015	>128	0.03
186	106	16	2	2	0.5	2	2	2	0.06	0.002	0.03
195	027	128	32	32	>128	2	8	16	ND	64	0.5
15 - 01	027	>128	64	>128	>128	4	2	4	0.015	>128	0.03
15 - 02	027	64	64	>128	>128	4	2	4	0.015	>128	0.03
15 - 05	176	64	64	>128	>128	4	2	1	0.06	>128	0.03
15 - 07	ND	32	16	32	>128	4	4	1	ND	0.001	0.125
15 - 08	001	>128	64	4	>128	4	0.5	16	0.008	>128	0.125
15 - 12	001	>128	64	>128	>128	2	0.25	16	0.002	>128	4
15 - 13	001	>128	64	>128	>128	2	0.25	1	0.008	>128	0.125
15 - 15	001	>128	64	>128	>128	4	0.5	16	0.004	>128	8
15 - 16	027	>128	64	>128	>128	4	2	4	0.008	>128	0.03
15 - 18	001	>128	64	>128	>128	4	0.5	2	0.008	>128	0.06
15 - 23	ND	16	2	2	4	4	4	4	ND	0.001	0.5
15 - 24	027	>128	64	>128	>128	2	1	4	0.008	>128	0.03
15 - 26	ND	16	2	2	2	2	4	4	ND	0.125	0.5
15 - 28	027	>128	64	>128	>128	4	2	4	0.008	>128	0.03
15 - 30	027	>128	32	32	>128	2	8	8	ND	0.5	0.5

15 - 31	027	>128	64	>128	>128	4	2	4	0.008	>128	0.03
15 - 34	353	>128	16	1	0.5	2	0.5	1	0.015	0.002	0.06
15 - 37	ND	16	2	2	4	2	2	4	ND	0.001	0.125
15 - 38	027	>128	64	>128	>128	4	2	4	0.008	>128	0.03
15 - 41	027	>128	64	>128	>128	4	2	4	0.008	>128	0.03
15 - 43	106	>128	16	1	0.5	2	1	1	0.06	0.002	0.06
15 - 44	027	>128	64	>128	>128	4	2	4	0.008	>128	0.03
15 - 47	027	>128	64	>128	>128	4	2	4	0.008	>128	0.03
15 - 50	001	>128	64	>128	2	4	0.5	8	0.004	>128	0.06
15 - 53	027	>128	64	>128	>128	4	2	4	0.008	>128	0.03
15 - 54	027	64	32	32	>128	2	8	16	ND	64	0.5
15 - 58	027	>128	64	>128	>128	4	2	4	0.008	>128	0.03
15 - 59	027	>128	32	32	>128	2	8	16	ND	64	0.125
15 - 61	ND	8	2	2	4	2	2	4	ND	0.001	0.125
15 - 62	ND	128	32	2	8	2	4	4	ND	0.001	0.5
15 - 66	001	64	16	>128	>128	4	0.5	1	0.008	0.001	2
15 - 73	020	64	16	0.25	1	4	1	1	0.03	0.002	0.06
15 - 74	027	>128	64	>128	>128	4	2	4	0.008	>128	0.03
15 - 75	027	128	32	32	>128	2	8	4	ND	64	0.125
15 - 76	027	>128	64	>128	>128	8	2	4	0.008	>128	0.03
15 - 77	ND	4	1	2	8	1	2	4	ND	0.001	0.5
15 - 80	001	>128	64	>128	>128	4	1	8	0.004	>128	4
15 - 81	ND	>128	16	32	>128	2	8	8	ND	64	0.25
15 - 83	027	>128	64	>128	>128	4	2	1	0.03	>128	0.03
15 - 84	106	64	16	1	0.5	2	1	1	0.125	0.002	0.06
15 - 86	ND	16	2	2	4	2	4	2	ND	0.001	0.5
15 - 88	027	>128	32	32	>128	2	8	4	ND	64	0.25
15 - 90	027	>128	64	>128	>128	8	2	4	0.03	>128	0.03
15 - 92	220	64	16	1	1	2	1	1	0.03	>128	0.06
15 - 93	027	128	32	32	>128	2	8	4	ND	64	0.25
15 - 96	027	>128	64	>128	>128	8	2	4	0.008	>128	0.03
15 - 98	ND	8	2	2	8	1	4	4	ND	0.001	0.25
15 - 99	ND	8	2	2	8	4	2	4	ND	0.001	0.125
17 - 31	027	>128	32	32	>128	2	8	16	ND	64	0.5
17 - 33	ND	>128	32	32	>128	2	8	16	ND	64	0.125
17 - 39	ND	>128	32	32	>128	2	4	128	ND	64	0.25
17 - 40	ND	>128	32	32	>128	2	2	128	ND	64	0.25
17 - 41	ND	8	2	2	4	2	2	4	ND	0.001	0.5
A12	027	16	2	0.5	1	2	0.25	2	0.06	0.001	0.06
A6	027	>128	>128	>128	>128	2	0.5	8	0.015	0.5	0.06
E02	027	>128	64	>128	>128	4	2	4	0.015	>128	0.03

E03	027	>128	64	>128	>128	4	2	4	0.015	>128	0.03
E04	027	>128	64	2	>128	2	8	4	ND	64	0.125
E05	027	>128	64	>128	>128	4	2	4	0.015	>128	0.03
E06	027	128	32	32	>128	2	8	16	ND	64	0.5
E07	027	64	64	>128	>128	4	2	1	0.015	>128	0.03
E09	027	128	32	32	>128	2	8	16	ND	64	0.25
E10	002	16	16	2	2	1	0.5	1	0.06	0.002	0.03
E11	027	>128	64	>128	>128	4	2	4	0.015	>128	0.03
E12	027	>128	64	2	>128	4	2	4	0.015	>128	0.03
E13	027	>128	32	2	>128	2	8	16	ND	64	0.25
E14	027	64	64	>128	>128	4	2	1	0.015	>128	0.03
E15	027	>128	64	>128	>128	4	2	4	0.015	>128	0.03
E17	027	>128	64	>128	>128	2	2	4	0.015	>128	0.03
E19	ND	4	2	32	>128	2	2	4	ND	0.001	0.25
L14	001	128	32	>128	>128	0.5	0.125	4	0.008	>128	0.125

ND: No determinado; CIP: ciprofloxacino; MOX: moxifloxacino; ERI: eritromicina; CLIN: clindamicina; VAN: vancomicina; MET: metronidazol; LIN: linezolid; FDX: fidaxomicina; RIF: rifampicina; TET: tetraciclina.

## ANEXO IV

### Producción de biopelícula y ensayos de desprendimiento.

Aislamientos		Producción de BP	Ensayos de desprendimiento						
Cepa	Ribotipo	IBP	D. O. Control	Proteínasa K		NaIO <sub>4</sub>		DNAsa I	
				D. O.	% Desp	D. O.	% Desp	D. O.	% Desp
39	001	8.0	3.500	0.014	99.6	0.637	81.8	0.835	76.2
61	001	1.9	3.433	0.032	99.1	1.161	66.2	2.213	35.5
76	001	12.1	0.799	0.017	97.9	0.545	31.7	0.598	25.2
82	001	1.8	1.369	0.013	99.1	0.870	36.4	1.198	12.5
83	001	2.7	3.500	0.016	99.5	0.912	74.0	1.077	69.2
84	001	2.2	2.252	0.009	99.6	0.527	76.6	0.507	77.5
85	001	2.4	0.741	0.023	96.9	0.509	31.3	0.612	17.5
15 - 08	001	2.0	1.556	0.030	98.1	1.543	0.8	0.778	50.0
15 - 13	001	2.5	1.630	0.036	97.8	1.576	3.3	0.919	43.6
15 - 15	001	2.0	1.460	0.021	98.6	0.744	49.0	0.386	73.6
15 - 50	001	2.9	3.362	0.012	99.6	0.875	74.0	1.867	44.5
L14	001	3.2	0.978	0.005	99.5	0.328	66.5	0.132	86.5
1	027	1.6	3.500	0.018	99.5	1.026	70.7	1.928	44.9
30	027	12.0	3.500	0.024	99.3	0.706	79.8	0.084	97.6
33	027	1.3	3.500	0.014	99.6	0.365	89.6	0.822	76.5
35	027	1.3	3.500	0.019	99.5	0.533	84.8	1.000	71.4
44	027	5.4	3.500	0.009	99.8	0.511	85.4	0.704	79.9
45	027	4.2	3.500	0.011	99.7	1.558	55.5	1.901	45.7
49	027	3.1	3.500	0.020	99.4	0.608	82.6	1.318	62.4
52	027	6.9	3.500	0.013	99.6	0.663	81.1	0.651	81.4
55	027	5.8	3.500	0.018	99.5	2.743	21.6	2.515	28.1
58	027	8.0	3.447	0.014	99.6	1.394	59.6	1.804	47.7
63	027	1.6	3.500	0.010	99.7	1.634	53.3	2.687	23.2
65	027	12.9	3.500	0.011	99.7	1.107	68.4	1.521	56.5
80	027	4.7	3.500	0.011	99.7	2.029	42.0	2.592	25.9
97	027	10.7	3.101	0.011	99.7	0.963	68.9	1.394	55.0
100	027	9.0	3.242	0.010	99.7	0.455	86.0	0.076	97.7
104	027	8.0	2.790	0.016	99.4	0.358	87.2	0.103	96.3
111	027	4.4	3.500	0.014	99.6	0.579	83.5	0.146	95.8
131	027	1.9	3.500	0.013	99.6	1.804	48.5	0.138	96.1
157	027	2.9	3.132	0.029	99.1	1.868	40.4	0.665	78.8
161	027	33.2	2.710	0.011	99.6	0.727	73.2	0.105	96.1
166	027	2.2	2.975	0.018	99.4	1.229	58.7	0.186	93.7
169	027	1.6	3.500	0.020	99.4	0.733	79.1	0.071	98.0

176	027	1.9	0.683	0.023	96.7	0.205	70.0	0.085	87.6
195	027	3.7	3.353	0.027	99.2	2.086	37.8	0.606	81.9
15 - 01	027	3.8	3.500	0.010	99.7	0.709	79.8	0.324	90.8
15 - 02	027	13.7	3.500	0.012	99.7	2.443	30.2	1.423	59.4
15 - 16	027	5.7	3.500	0.012	99.7	0.782	77.7	0.174	95.0
15 - 28	027	4.1	3.500	0.010	99.7	1.046	70.1	0.127	96.4
15 - 30	027	4.9	3.089	0.030	99.0	2.834	8.3	0.725	76.5
15 - 31	027	2.0	3.500	0.008	99.8	0.635	81.9	0.649	81.5
15 - 38	027	3.8	3.500	0.007	99.8	1.099	68.6	2.278	34.9
15 - 44	027	8.5	2.049	0.010	99.5	1.008	50.8	0.953	53.5
15 - 47	027	1.8	3.500	0.007	99.8	2.320	33.7	1.204	65.6
15 - 53	027	4.9	3.174	0.019	99.4	1.767	44.3	2.013	36.6
15 - 54	027	2.7	3.500	0.030	99.2	2.861	18.3	1.060	69.7
15 - 58	027	21.6	3.500	0.011	99.7	1.335	61.9	1.216	65.3
15 - 59	027	23.8	3.500	0.028	99.2	3.033	13.4	1.738	50.3
15 - 74	027	9.0	3.500	0.008	99.8	1.548	55.8	1.404	59.9
15 - 75	027	6.0	2.314	0.061	97.4	1.799	22.3	1.509	34.8
15 - 76	027	9.3	3.500	0.013	99.6	1.537	56.1	0.738	78.9
15 - 83	027	20.9	3.500	0.007	99.8	1.373	60.8	1.326	62.1
15 - 88	027	2.3	3.500	0.023	99.4	3.283	6.2	0.418	88.0
15 - 90	027	3.5	3.500	0.022	99.4	0.489	86.0	0.054	98.5
15 - 93	027	5.4	2.938	0.030	99.0	1.765	39.9	1.246	57.6
15 - 96	027	4.3	3.382	0.033	99.0	2.255	33.3	1.247	63.1
17 - 31	027	1.7	3.393	0.037	98.9	1.945	42.7	0.838	75.3
A12	027	1.7	1.887	0.022	98.8	0.441	76.6	0.085	95.5
A6	027	2.5	3.500	0.009	99.7	1.594	54.5	0.219	93.8
E02	027	7.2	3.500	0.013	99.6	0.957	72.7	0.038	98.9
E03	027	3.3	2.038	0.092	95.5	1.973	3.2	0.738	63.8
E05	027	5.3	3.500	0.016	99.5	1.736	50.4	0.049	98.6
E07	027	4.7	3.500	0.027	99.2	3.396	3.0	0.470	86.6
E09	027	5.9	3.500	0.023	99.3	2.122	39.4	1.638	53.2
E11	027	5.9	2.755	0.038	98.6	1.800	34.7	0.410	85.1
E12	027	2.5	3.500	0.012	99.7	1.407	59.8	0.049	98.6
E13	027	10.6	1.645	0.034	98.0	0.344	79.1	0.113	93.1
E14	027	2.9	3.203	0.055	98.3	2.984	6.8	0.243	92.4
E15	027	4.4	0.608	0.015	97.6	0.416	31.5	0.031	95.0
E17	027	6.0	3.281	0.024	99.3	2.896	11.7	0.570	82.6

## ANEXO V

### Resultados de ensayos de expresión

Aislamientos			Gen endógeno		<i>cwp84</i>				<i>slpA</i>			
ID	BP	RT	Media Ct	ng RNA	Media Ct	ng RNA	Norm	Ratio	Media	ng RNA	Norm	Ratio
15 - 12	NP	001	11.94	10.22	24.35	3.65	0.36	2.45	26.13	6.30	0.62	23.75
15 - 66	NP	001	10.10	35.01	20.68	38.10	1.09	7.47	24.51	19.10	0.55	21.02
15 - 80	NP	001	9.80	42.81	20.18	52.70	1.23	8.45	25.30	11.13	0.26	10.02
71	NP	001	9.26	61.18	22.86	9.47	0.15	1.06	24.20	23.63	0.39	14.88
15 - 18	NP	001	9.08	69.14	22.46	12.21	0.18	1.21	25.24	11.56	0.17	6.44
98	NP	027	9.33	58.29	18.90	119.14	2.04	2.37	18.90	895.34	15.36	20.48
15 - 41	NP	027	9.18	64.78	19.75	69.30	1.07	1.24	19.75	500.64	7.73	10.30
102	NP	027	10.77	22.34	21.77	19.05	0.85	0.99	21.77	125.32	5.61	7.48
15 - 24	NP	027	7.40	211.59	19.80	66.86	0.32	0.37	19.80	481.75	2.28	3.03
127	NP	027	8.94	75.96	18.98	112.90	1.49	1.72	22.85	59.64	0.79	1.05
156	NP	027	8.67	91.01	19.84	65.35	0.72	0.83	22.20	93.20	1.02	1.37
38	NP	027	9.15	65.75	23.01	8.61	0.13	0.15	26.56	4.68	0.07	0.09
183	NP	027	8.86	80.13	18.43	161.14	2.01	2.33	23.20	46.81	0.58	0.78
27	NP	027	8.92	76.57	19.98	59.64	0.78	0.90	25.66	8.68	0.11	0.15
135	NP	027	8.75	86.14	19.02	110.08	1.28	1.48	24.39	20.70	0.24	0.32
122	NP	027	7.71	172.20	16.66	498.71	2.90	3.36	21.80	122.40	0.71	0.95
72	NP	027	9.22	63.05	18.78	128.64	2.04	2.37	25.76	8.09	0.13	0.17
121	NP	027	8.39	109.56	17.69	258.41	2.36	2.74	21.98	108.06	0.99	1.31
15 - 58	PF	027	9.76	43.76	28.67	0.23	0.01	0.01	21.01	210.70	4.81	6.42
E12	PF	027	9.06	69.92	19.08	106.38	1.52	1.76	25.22	11.74	0.17	0.22
E09	PF	027	8.56	97.79	19.47	82.91	0.85	0.98	23.73	32.73	0.33	0.45
15 - 76	PF	027	8.62	93.83	18.74	132.17	1.41	1.63	23.30	43.77	0.47	0.62
76	PF	001	8.62	93.53	21.10	29.28	0.31	2.15	25.52	9.54	0.10	3.93
15 - 15	PF	001	7.57	189.01	21.64	20.63	0.11	0.75	23.05	52.03	0.28	10.61
15 - 74	PF	027	8.63	93.13	20.24	50.58	0.54	0.63	25.80	7.88	0.08	0.11
E02	PF	027	8.52	100.59	19.21	97.84	0.97	1.13	24.66	17.24	0.17	0.23
15 - 59	PF	027	8.69	89.49	20.38	46.25	0.52	0.60	26.77	4.05	0.05	0.06
15 - 54	PF	027	7.32	223.75	18.37	166.71	0.75	0.86	25.74	8.24	0.04	0.05
82	PF	001	9.33	58.50	20.50	42.90	0.73	5.03	23.20	46.92	0.80	30.91
15 - 88	PF	027	8.37	111.15	19.10	104.53	0.94	1.09	22.42	80.01	0.72	0.96
15 - 13	PF	001	11.36	15.06	21.48	22.91	1.52	10.44	26.39	5.28	0.35	13.52
E05	PF	027	7.86	156.03	17.42	306.65	1.97	2.28	22.39	82.08	0.53	0.70
83	PF	001	9.07	69.68	21.43	23.58	0.34	2.32	23.50	38.10	0.55	21.07
85	PF	001	9.46	53.58	24.26	3.88	0.07	0.50	24.83	15.35	0.29	11.04
39	PF	001	8.81	82.39	23.33	7.02	0.09	0.59	24.94	14.26	0.17	6.67

15 - 08	PF	001	10.68	23.66	21.07	29.67	1.25	8.61	27.04	3.38	0.14	5.50
E07	PF	027	9.41	55.48	19.67	73.00	1.32	1.53	23.91	28.86	0.52	0.69
15 - 50	PF	001	9.49	52.49	20.65	39.03	0.74	5.11	25.23	11.66	0.22	8.56
L14	PF	001	8.49	102.37	24.53	3.26	0.03	0.22	24.61	17.88	0.17	6.73
15 - 47	PF	027	7.19	243.05	23.34	6.96	0.03	0.03	25.64	8.79	0.04	0.05
84	PF	001	8.59	95.73	21.52	22.28	0.23	1.60	23.76	31.94	0.33	12.86
61	PF	001	9.63	47.78	23.18	7.70	0.16	1.11	23.81	30.99	0.65	25.00
15 - 90	PF	027	7.65	179.11	23.86	5.02	0.03	0.03	26.06	6.60	0.04	0.05
A6	PF	027	8.39	109.61	18.91	118.27	1.08	1.25	24.78	15.87	0.14	0.19
9689	PF	001	6.62	356.28	20.2	51.90	0.15	1.00	25.57	9.25	0.03	1.00
BAA-1805	PF	027	8.96	74.79	19.86	64.50	0.86	1.00	22.94	56.10	0.75	1.00

ID: identificación de aislamiento; BP: biopelícula; NP: no productor; PF: productor fuerte; RT: ribotipo; Norm: normalizado.

## ANEXO VI.

### Artículos

#### Artículos publicados:

1. **Título:** Circulation of Highly Drug-Resistant *Clostridium difficile* Ribotypes 027 and 001 in Two Tertiary-Care Hospitals in Mexico.

**Revista:** Microbial Drug Resistance.

2. **Título:** Current knowledge on the laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infection.

**Revista:** World Journal of Gastroenterology.