

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA Y
RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN BIOPELÍCULA DE *Clostridioides*
(*Clostridium*) *difficile* EN INFECCIONES RECURRENTE Y NO
RECURRENTE

Por

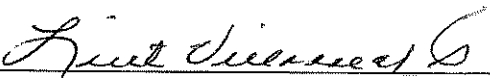
M. C. LAURA ESTHER TIJERINA RODRÍGUEZ

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

Junio, 2019

**ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA Y
RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN BIOPELÍCULA DE *Clostridioides*
(Clostridium) difficile EN INFECCIONES RECURRENTE Y NO
RECURRENTE**

Comité de Tesis:



Dra. Licet Villarreal Treviño

Presidente



Dra. Elvira Garza González

Secretario



Dr. Adrián Carracho Ortiz

Vocal



Dr. Juan Francisco Contreras Cordero

Vocal



Dr. José Santos García Alvarado

Vocal

**ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA Y
RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN BIOPELÍCULA DE *Clostridioides*
(Clostridium) difficile EN INFECCIONES RECURRENTE Y NO
RECURRENTE**

Dirección de Tesis:



Dra. Licet Villarreal Treviño

Director

ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA Y
RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN BIOPELÍCULA DE *Clostridioides*
(*Clostridium*) *difficile* EN INFECCIONES RECURRENTE Y NO RECURRENTE

Presentado por: M.C. Laura Esther Tijerina Rodríguez

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 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 y en el Laboratorio de Ciencias Biológicas y Ambientales de la Universidad de Hertfordshire en Hatfield, Reino Unido, bajo la asesoría del Dr. Simon D. Baines.

When I was a child I used to enjoy starrng at the murky water of fish tanks or natural ponds, where there was an accumulation of solids that seemed to be dirt and floating particles whose nature was unknown for me. That caught my attention... the bubbles because of the effervescence, the fish's residues, seaweed, the greenish material over the rocks and in few occasions tiny particles dancing around.

That was more than twenty years ago, at that time my eyesight was perfect. All of that was something magical for me, to believe that those dots in motion were living beings, as complex as I was, tiny dancing "little animals" that were part of a sync universe different from mine, which only in dreams I might be able to explore as a part of it, as an escape from my own reality. The first time that I saw protozoa moving and feeding under a stereoscope, I felt more excited than ever, part of my childhood fantasies became reality. The illusion of getting immerse into a new tiny world for me, mixed with my curiosity and enthusiasm, turning into a big motivation. I am really grateful to that child and her imagination for taking me to this point of my life. And I dedicate the following message:

"I owed it to you, I hope to be fulfilling your dreams. Thank you for being so persevering and creating the women I am today."

AGRADECIMIENTOS

A los pilares de mi vida:

A mi Madre, la mejor amiga que pude llegar a tener y la cual ha aprendido junto conmigo a lo largo de este largo camino, de cierta forma, cada título que he obtenido es tuyo también, gracias por tu apoyo en todo momento, paciencia, y por ser siempre un ejemplo de esfuerzo y perseverancia. Nunca te agotaste de mis miles de pláticas sobre mis experimentos fallidos y exitosos. Gracias por tener siempre palabras de aliento y motivarme a no desistir nunca y dar lo mejor de mí.

A mi Padre, gracias por compartir todo este camino conmigo y por el apoyo que me has brindado en todas mis etapas, somos muy diferentes y a pesar de eso siempre te esfuerzas en entender mis planes locos. Gracias también por heredarme el gusto por la Biología. Gracias por extender tu mano cada que consideras que lo necesito y también por considerarme fuerte e independiente, sé que esto ha sido muy difícil para mi mamá como para ti en mis momentos de estrés y silencio, pero cada uno ha tenido su “granote” de arena en ayudarme a levantarme con la frente en alto en cada momento de frustración y me han ayudado a convertirme en la mujer que soy hoy en día.

Todas las anécdotas de los esfuerzos tan grandes que han hecho ambos en diferentes etapas de sus vidas, han sido un gran impulso, para ser siempre una mejor persona y un mejor profesional.

A la familia que he elegido a lo largo del camino:

A quienes admiro y me han ayudado a ser mejor tanto en lo profesional como personal; Ashanti, gracias por compartir este “rollercoaster” conmigo desde el primer día de licenciatura, juntas somos un gran equipo, a ti y a Beto, que han estado en mis mejores y peores momentos; me han presionado, impulsado y hasta regañado como hermanos mayores, son unos investigadores y amigos grandiosos, y he sido muy afortunada por tener su cariño, y por poder ser parte de su vida, gracias por tanto.

Carlos Ramírez, tu amistad llegó de manera sorpresiva hace 10 años, como una hermandad a distancia, gracias por tus sabios consejos y por el apoyo que me has brindado siempre, en mis peores momentos has aparecido como algo inexplicable, como un ángel, gracias por tanto.

A los amigos de esta aventura llamada posgrado:

El mejor amigo, consejero, confidente, pareja, asesor de vida y carrera, gracias por siempre darme palabras llenas de verdad y sinceridad, te admiro enormemente, gracias por abrirme los ojos cada que lo necesito, y por sacudirme la nube de dudas existenciales que se forman en mi cabeza de vez en cuando, eres un gran Doctor y un

hombre incansable, gracias Angel Merino, por recordarme siempre las cosas importantes de la vida.

Hugo Sánchez, Dianelys Sotolongo y Alberto Aguayo, muchas tristezas y alegrías compartidas, han sido parte de mis mejores momentos porque siempre me hacen reír, que bonito tesoro encontré en ustedes en los primeros momentos del Doctorado.

A mis compañeros de laboratorio con los que compartí buenos y malos momentos, ha sido un placer estar en el mismo barco con ustedes, aprendí muchas cosas de nuestra convivencia, les deseo el mejor de los éxitos y les agradezco la retroalimentación dada cada semana, Jessica Gutiérrez, Adrián Martínez, Verónica Villarreal y Edeer Montoya.

A los amigos entrañables con los que compartí en el laboratorio grandes momentos y siempre tuve su consejo dentro y fuera de la institución, gracias por agregar un poco de frescura a esos días que compartimos y por su amistad: Cesar Pezina, Aurora Luna de Alba, Nefertiti Castro y Denisse Rodríguez.

A quienes hicieron posible este proyecto:

Agradezco a mis asesoras, Doctora Licet Villarreal y Dra. Elvira Garza, por creer en mí y por todo su apoyo durante este largo y arduo proceso, gracias por todas sus enseñanzas. Agradezco también el apoyo brindado por la Dra. Rayo Morfín, Dr. Eduardo Rodríguez Noriega y Dr. Adrián Camacho, sin ustedes esto no habría sido posible. Así como al Dr. Santos García Alvarado y Dr. Juan Francisco Cordero, gracias por sus recomendaciones y observaciones para mejorar esta investigación.

Un agradecimiento especial a la Dra. Paola Bocanegra y Dra. Samantha Flores, por su cálida y agradable compañía, asesoría y consejos. Gracias por todo su apoyo y paciencia. Gracias Paola pues después de cuatro años he sentido un gran cariño por ti y tu tan característica forma de corregirnos y aconsejarnos. Gracias a ambas por siempre estar ahí para nosotros los estudiantes.

I am very grateful with Simon D. Baines for his support for the development of this project, and giving me the opportunity to grow personally and professionally in other latitudes, I would like to thank him for his guidance and advice for the culmination of this research. But most of all for having the bliss of meeting a great human being, it has been an honour to work with you.

Agradezco también al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios de posgrado. Al Laboratorio General de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Laboratorio de Diagnóstico Microbiológico de Alta Especialidad (LADIME) del Servicio de Gastroenterología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” así como a The School of Life and Medical Sciences de la Universidad de Hertfordshire en Reino Unido por permitirme el uso de sus instalaciones para el desarrollo de este proyecto.

DEDICATORIA

A Dios y a mis padres.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Oligonucleótidos para amplificación del gen <i>tpi</i>	26
2. Oligonucleótidos para amplificación de los genes codificadores de toxinas	27
3. Oligonucleótidos para la amplificación de <i>tcdC</i>	28
4. Oligonucleótidos para la amplificación de la región intergénica del RNA ribosomal	29
5. Clasificación de aislamientos en base a la producción de biopelícula	31
6. Puntos de corte para los agentes antimicrobianos.	33
7. Oligonucleótidos para la determinación de la expresión de factores de virulencia mediante PCR tiempo real.	36
8. Características de pacientes con ICD-R e ICD- NR.	38
9. Distribución de ribotipos entre el grupo de ICD-R e ICD-NR.	40
10. Distribución de los aislamientos productores y no productores con los ribotipos de <i>C. difficile</i> obtenidos del grupo ICD-R e ICD-NR.	41
11. Susceptibilidad antimicrobiana (mg/L) de aislamientos de ICD-R e ICD-NR.	42
12. Distribución de CMIs y CMIBs entre aislamientos obtenidos de ICD-R e ICD-NR.	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Mecanismo de patogenicidad de <i>C. difficile</i>	6
2. Locus de patogenicidad (PaLoc) de <i>C. difficile</i>	7
3. Amplificación del gen <i>tcdC</i> de <i>C. difficile</i> mediante PCR	28
4. Ribotipificación por PCR. Amplificación de la región intergénica de las subunidades 16-23S del RNA ribosomal de <i>C. difficile</i> .	29
5. Niveles de expresión relativa media de transcritos de <i>spo0A</i> , <i>sigH</i> , <i>cwp84</i> , <i>slpA</i> , <i>agrD1</i> , y <i>luxS</i> entre aislamientos de ICD-R e ICD-NR.	46

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

AI	Autoinductor
ATCC	American Type Culture Collection
BP	Biopelícula
CIP	Ciprofloxacino
CLIN	Clindamicina
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CMIB	Concentración mínima inhibitoria de biopelícula
ct	Threshold cycle (valores umbral del ciclo)
CV	Cristal violeta
DEPC	dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
DO	Densidad óptica
ER	Expresión relativa
ERI	Eritromicina
<i>et al</i>	Y colaboradores
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FDX	Fidaxomicina
g	Gramos
GDL	Guadalajara

h	Horas
HU	Hospital Universitario
IB	Indice de biopelícula
ICC	Caldo Infusión cerebro corazón
ICD	Infección por <i>C. difficile</i>
ICD-NR	Infección por <i>C. difficile</i> no recurrente
ICD-R	Infección por <i>C. difficile</i> recurrente
kb	Kilobases
L	Litros
LIN	Linezolid
M	Concentración molar
mg	Miligramos
MG	Media geométrica
mg/L	Miligramos por litro
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Concentración milimolar
mm	Milímetros
MOX	Moxifloxacino
MTZ	Metronidazol
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros

NT	No tipificable
pb	Pares de bases
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PM	Peso molecular
QS	Quorum sensing
REA	Análisis de restricción de endonucleasas
RIF	Rifampicina
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
s	Segundos
SEM	Microscopia electrónica de barrido
TET	Tetraciclina
U	Unidad
UFC	Unidades formadoras de colonias
UTI	Infección del tracto urinario
UV	Ultravioleta
V	Voltios
VAN	Vancomicina
µg	Microgramos
µL	Microlitros

μMol

Concentración en micromoles

ÍNDICE

PORTADA	i
ÍNDICE	ii
RESUMEN	iii
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	4
1. Historia	
2. Características morfológicas	
3. Importancia clínica	
4. Patogénesis	5
5. Factores de patogenicidad	7
5.1. Toxinas	
5.2. Esporas	8
5.3. Otros factores	9
5.3.1. Producción de biopelícula	
5.3.2. Quorum sensing	11
5.3.2.1. Sistema LuxS/AI2-QS	
5.3.2.2. Sistema Agr-QS	12
5.3.3. Proteínas asociadas a la adhesión	13
6. ICD recurrente	15
7. Cepas hipervirulentas y su asociación con ICD recurrente	16
8. Asociación de biopelícula con otras infecciones recurrentes	18
JUSTIFICACIÓN	20
HIPÓTESIS	22
OBJETIVOS	23
METODOLOGÍA	24
1. Obtención de muestras	
2. Detección y aislamiento de <i>C. difficile</i>	

3. Identificación mediante espectrometría de masas	25
4. Identificación por PCR	
5. Caracterización por PCR	26
6. Análisis de <i>tcdA</i> , <i>tcdB</i> , <i>cdtA</i> y <i>cdtB</i>	
7. Análisis de la región deletada en <i>tcdC</i>	27
8. Ribotipificación de <i>C. difficile</i>	28
9. Modelo de biopelícula de <i>C. difficile</i>	30
10. Modelo de biopelícula de <i>C. difficile</i> con microbiota	31
11. Pruebas de susceptibilidad a antibióticos	32
12. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de biopelícula (CMIB)	33
13. Cuantificación de esporas en biopelícula	34
14. Determinación de los niveles de expresión de <i>spo0A</i> , <i>sigH</i> , <i>slpA</i> , <i>cwp84</i> , <i>agrD1</i> , y <i>luxS</i> en biopelícula	
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	37
RESULTADOS	38
1. Población de estudio	
2. Cultivo y ribotipificación	39
3. Modelo de biopelícula de <i>C. difficile</i>	40
4. Modelo de biopelícula de <i>C. difficile</i> con microbiota	41
5. CMIs	
6. CMIBs	44
7. Expresión de <i>spo0A</i> , <i>sigH</i> , <i>slpA</i> , <i>cwp84</i> , <i>agrD1</i> , y <i>luxS</i>	45
DISCUSIÓN	47
CONCLUSIONES	52
PERSPECTIVAS	53
BIBLIOGRAFÍA	54
ANEXO I.- Ribotipos de <i>C. difficile</i> y presencia de genes por aislamiento	65
ANEXO II.- Concentraciones mínimas inhibitorias a antibióticos asociados a la ICD.	69
ANEXO III.- Concentraciones mínimas inhibitorias a antibióticos para el tratamiento de la ICD.	71

ANEXO IV.- Concentraciones mínimas inhibitorias de biopelícula.	75
ANEXO V.- Producción de biopelícula con y sin microbiota y su clasificación de acuerdo al índice de biopelícula.	79
ANEXO VI.- Cuantificación de esporas en biopelícula con y sin microbiota.	83
ANEXO VII.- Expresión relativa (ER) de <i>sigH</i> , <i>spo0A</i> , <i>slpA</i> , <i>luxS</i> , <i>cwp84</i> y <i>agrD</i> de cada aislamiento.	88
ANEXO VIII.- Constancias de presentación en congresos y premios.	89
ANEXO IX.- Artículos	96

RESUMEN

La infección por *Clostridioides (Clostridium) difficile* (ICD) es una de las principales causas de diarrea nosocomial a nivel mundial. Se estima que del 20 al 30% de los pacientes con ICD pueden desarrollar infección recurrente (ICD-R), y posterior a la primera recurrencia, hasta el 60% pueden desarrollar múltiples episodios.

En este trabajo, se desarrolló un modelo de biopelícula de *C. difficile* con microbiota para evaluar diferencias en la producción de biopelícula con y sin microbiota, esporulación y susceptibilidad a antimicrobianos, expresión de genes asociados a esporulación (*sigH*, *spo0A*), quorum sensing (*agrDI*, and *luxS*), y a la adhesión y formación de biopelícula (*slpA* and *cwp84*) en una selección de aislamientos de *C. difficile* de pacientes con ICD-R y no recurrente (ICD-NR).

Se obtuvieron 110 aislamientos de *C. difficile* a partir de 254 pacientes con ICD confirmada (74 con ICD-NR y 36 con ICD-R). La mayoría de los aislamientos fueron productores de biopelícula (109/110), y la mayoría fueron productores fuertes. Además, la mayoría de los aislamientos correspondió al ribotipo 027 (81.37%, 83/102). La esporulación fue mayor en el grupo de aislamientos de ICD-R en comparación con los de ICD-NR ($p = 0.015$).

Los aislamientos de ICD-R presentaron menor susceptibilidad a vancomicina que los aislamientos de ICD-NR (27.78% [10/36] y 9.09% [6/66] respectivamente, $p = 0.013$). Las concentraciones mínimas inhibitorias de biopelícula a vancomicina y linezolid fueron 100 veces y 20 veces mayor respectivamente que los valores de susceptibilidad en cultivo planctónico.

La expresión de *sigH*, *spo0A*, *cwp84* y *agrDI* fue mayor en los aislamientos de ICD-R que en los aislamientos de ICD-NR en biopelícula. Todos estos factores podrían influir en el desarrollo de la infección recurrente

ABSTRACT

Clostridioides [*Clostridium*] *difficile* infection (CDI) is one of the leading causes of diarrhea associated with medical care worldwide, 20-30 % of CDI patients might develop recurrent infection, and up to 60% of patients after the first recurrence might develop further episodes.

A multi-species microbiota biofilm model of *C. difficile* was designed to evaluate the differences in the production of biofilms with and without microbiota, sporulation, susceptibility to drugs, expression of sporulating (*sigH*, *spo0A*), quorum sensing (*agrD₁*, and *luxS*), and adhesion-associated and biofilm production (*slpA* and *cwp84*) pathway genes between selected *C. difficile* isolates from R-CDI and non-recurrent patients (NR-CDI).

We obtained 102 *C. difficile* isolates from 254 patients with confirmed CDI (66 from NR-CDI and 36 from R-CDI). Most of the isolates were biofilm producers (100/102), and most were strongly adherent. In addition, most of the strains were ribotype 027 (81.374%, 83/102). Sporulation was higher in the R-CDI than in the NR-CDI isolates ($p = 0.015$). The isolates from R-CDI patients more frequently demonstrated reduced susceptibility to vancomycin than isolates of NR-CDI patients (27.78% [10/36] and 9.09% [6/66], respectively, $p = 0.013$). The minimum inhibitory concentrations for vancomycin and linezolid against biofilms (BMIC) were up to 100 times and 20 times higher, respectively, than the corresponding planktonic MICs.

Expression of *sigH*, *spo0A*, *cwp84*, and *agrD₁* was higher in R-CDI than in NR-CDI isolates. A higher expression of sporulating pathway (*sigH*, *spo0A*), quorum sensing (*agrD₁*), and adhesion-associated (*cwp84*) genes was found in R-CDI than in NR-CDI isolates. All of these factors can have effect on the recurrence of the infection.

INTRODUCCIÓN

Clostridioides (Clostridium) difficile es considerado mundialmente como el principal agente etiológico de diarrea nosocomial. En un estudio realizado el 2011 en Estados Unidos, se estimaron aproximadamente 453 000 infecciones y 29 000 muertes, causadas por esta especie (Lessa, Mu, *et al.*, 2015).

La infección por *C. difficile* (ICD) tiene un amplio espectro de presentación clínica desde cuadros de diarrea leve, colitis pseudomembranosa aguda, megacolon tóxico y en ocasiones la muerte. El diagnóstico y el tratamiento de las ICD son complicados debido a la variedad de la presentación clínica, a que las opciones de tratamiento son limitadas y al desarrollo de persistencia de la infección. La colonización asintomática ocurre en el 1-3% de los adultos sanos y en el 40-60% de los neonatos, particularmente aquellos nacidos en un hospital (McFarland, Brandmarker, & Guandalini, 2000).

La población con mayor riesgo de contraer ICD son personas de edad avanzada (>65 años), pacientes internados en el área de cuidados intensivos, personal hospitalario y personas que han estado bajo tratamiento con antibióticos previamente (Owens, Donskey, Gaynes, Loo, & Muto, 2008) debido a que ocasionan una disrupción de la microbiota intestinal, dando a lugar la adhesión y colonización de microorganismos oportunistas como *C. difficile* (Kyne, Warny, Qamar, & Kelly, 2000) (Stewart, Berg, & Hegarty, 2014). Algunos estudios indican que la producción de factores de virulencia tales como las exotoxinas TcdA y TcdB, las esporas, la formación de biopelícula, las proteínas de la capa S, de la pared celular tales como Cwp66 y Cwp84, (Voth &

Ballard, 2005), las adhesinas, los pili, la presencia de flagelo y los procesos como quorum sensing, se encuentran involucrados en diferentes etapas del proceso de infección (Ethapa *et al.*, 2013). Sin embargo, no se ha descrito la función específica de estos factores, o su asociación directa con el desarrollo de episodios recurrentes de la ICD.

En años recientes, la frecuencia de ICD se ha incrementado significativamente, durante el periodo 2000-2010, se duplicó la incidencia de las ICD en personas mayores en Estados Unidos y aumentó 35% anualmente con un incremento total aproximadamente de 300% en personas hospitalizadas (Depestel & Aronoff, 2013; Sammons & Toltzis, 2015); de hecho, ha sobrepasado la incidencia de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) como agente etiológico de infecciones de origen nosocomial (Depestel & Aronoff, 2013; Lessa, Winston, McDonald, & Emerging Infections Program, 2015; Miller, Chen, Sexton, & Anderson, 2011), dicho incremento ha coincidido con la aparición de una cepa hipervirulenta identificada como NAP1/027 causante de brotes en Europa, Norteamérica, Latinoamérica (Costa Rica y Chile) y en algunas partes de Asia (Depestel & Aronoff, 2013; Hernandez-Rocha *et al.*, 2012). En las cepas hipervirulentas NAP1, el gen *tcdC* contiene una delección responsable de la producción elevada de TcdA y TcdB (Curry *et al.*, 2007). Otra característica de la cepa hipervirulenta es el aumento en los niveles de esporulación, lo que puede llevar a una mejor sobrevivencia y diseminación de la cepa en ambientes hospitalarios ocasionando una transmisión más rápida y eficiente de la ICD (Akerlund *et al.*, 2008).

Este importante incremento en la epidemiología coloca a las ICD como un problema financiero significativo para el sistema de salud. Se estima que en el 2008,

estas infecciones provocaron un incremento en costos hospitalarios de 4.8 billones de dólares (Dubberke & Olsen, 2012; Sammons & Toltzis, 2015).

Por lo mencionado anteriormente, el objetivo de este estudio es caracterizar los aislamientos de *C. difficile* obtenidos de pacientes con ICD en estado recurrente, analizar producción de biopelícula en presencia de microbiota con la finalidad de proveer condiciones similares a las del intestino, determinar la producción de factores de virulencia asociados con la propiedad de producir biopelícula, evaluar la susceptibilidad a antibióticos de los aislamientos y como determinar los niveles de esporulación en biopelícula, se determinará si existe una correlación entre la producción de biopelícula de *C. difficile* y de los factores de virulencia involucrados con este proceso y el desarrollo de recurrencia y persistencia de la ICD.

Los resultados de este proyecto podrían elucidar la causa del desarrollo de recurrencia de la ICD, la resistencia de *C. difficile* a las terapias actuales, y ser la pauta de nuevas investigaciones para el desarrollo de terapias alternativas más eficientes.

ANTECEDENTES

1.- HISTORIA

C. difficile fue descubierta en 1935 como parte de la microbiota intestinal de recién nacidos, fue considerada como bacteria no patógena durante cuatro años, hasta 1978 se describió como uno de los principales agentes etiológicos de diarrea y colitis pseudomembranosa en pacientes tratados con antibióticos (Rebmann, Carrico, Association for Professionals in Infection, & Epidemiology, 2011).

2.- CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

C. difficile es un bacilo anaerobio, Gram positivo y productor de esporas, las cuales persisten en el ambiente y son difíciles de erradicar. La morfología colonial varía dependiendo del medio de cultivo, en agar base sangre después de 24-48 horas de incubación, se desarrollan colonias de 3-5 mm de diámetro con un borde irregular, grises, opacas y no-hemolíticas, aunque algunas cepas tienen una apariencia verdosa debido a la alfa-hemólisis en el agar sangre. Después de 48-72 horas, las colonias pueden desarrollar un centro grisáceo o blanco, un factor asociado con la esporulación (Kuijper, van Dissel, & Wilcox, 2007).

3.- IMPORTANCIA CLÍNICA

Entre los principales factores de riesgo para contraer ICD se encuentran: tener edad avanzada (>65 años), haber estado bajo tratamiento con antibióticos, hospitalización previa o ser trabajador de la salud. La incidencia de ICD en mayores de 65 años es hasta 20 veces superior a las de individuos más jóvenes. Se han descrito otros

factores de riesgo tales como el tratamiento con inhibidores de la bomba de protones, bloqueadores de H₂, metotrexato así como presencia de enfermedades inflamatorias gastrointestinales (Deneve, Janoir, Poilane, Fantinato, & Collignon, 2009).

El espectro de presentación de la ICD es muy amplio, abarca desde una infección asintomática hasta cuadros de diarrea, colitis pseudomembranosa, colitis fulminante, megacolon tóxico y en ocasiones la muerte. En algunos casos de colitis moderada o severa se presenta diarrea profusa, dolor y distensión abdominal, hemorragia de colon, fiebre, náuseas y anorexia (Mylonakis, Ryan, & Calderwood, 2001).

Algunos antibióticos tales como la clindamicina, las cefalosporinas, los beta-lactámicos y las fluoroquinolonas se encuentran asociados con un alto riesgo de adquisición de la ICD (Bartlett & Gerding, 2008).

4.- PATOGÉNESIS

C. difficile es transmitido mediante la vía fecal-oral, y es ingerido en forma de células vegetativas o esporas resistentes, como resultado de contaminación del ambiente por parte de pacientes que tienen ICD, equipo infectado, y falta de higiene de trabajadores de la salud. Las esporas son capaces de resistir la acidez del estómago y en el intestino delgado germinan como células vegetativas y se multiplican (Rebmann *et al.*, 2011) (Figura 1). El uso de antibióticos ocasiona un desequilibrio en la microbiota intestinal, lo que permite la adhesión y colonización por medio los factores de virulencia de la bacteria (Deneve *et al.*, 2009).

La virulencia de *C. difficile* es causada principalmente por la producción de dos exotoxinas: TcdA y TcdB, las cuales son glucosiltransferasas que ocasionan inflamación

y daño en la mucosa, de manera específica, glucosilan las proteínas Rho utilizando UDP-glucosa como donador. (Deneve *et al.*, 2009). Estudios recientes describen la TcdB como el principal responsable de la virulencia de *C. difficile* (Rebmann *et al.*, 2011). Se ha descrito en algunas cepas, por ejemplo, la CD196 descrita por Popoff *et al.*, una toxina binaria conocida como Cdt, consiste en un componente de unión y uno enzimático, con actividad actin ribosil transferasa de ADP. Tanto las exotoxinas TcdA y TcdB como la toxina binaria ocasionan la desorganización del citoesqueleto celular (Deneve *et al.*, 2009; Rebmann *et al.*, 2011).

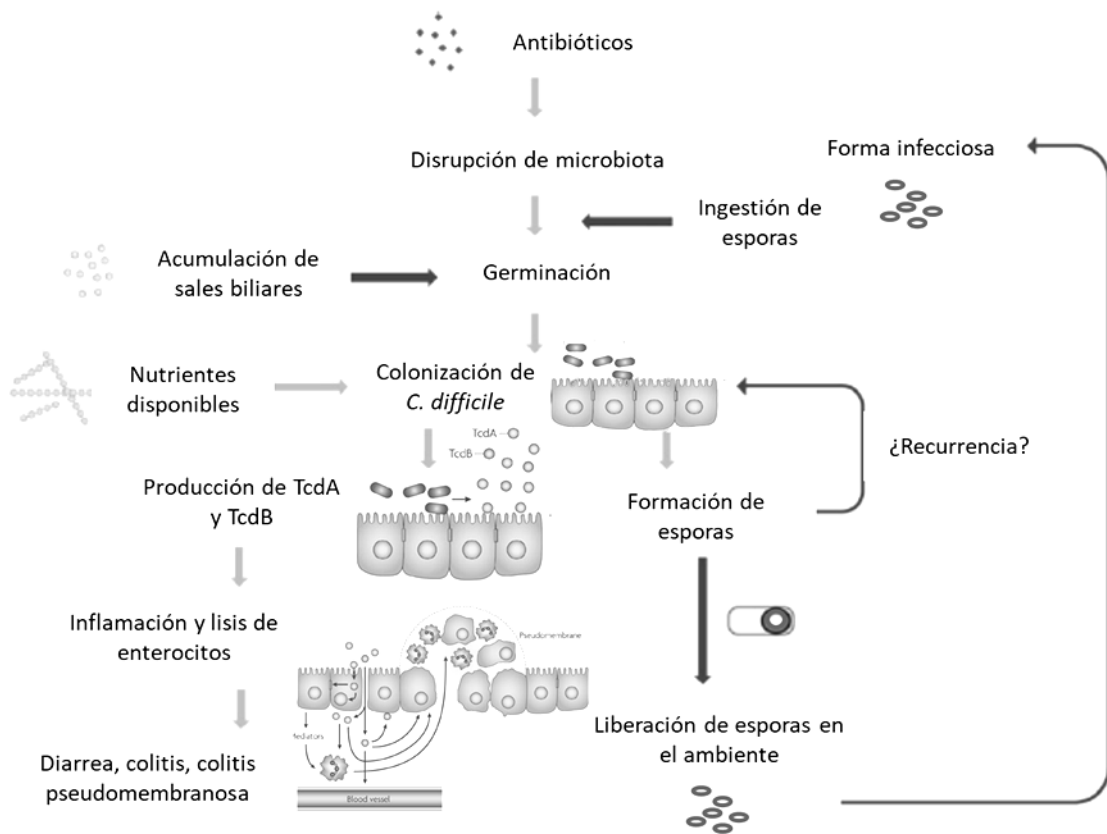


Figura 1. Mecanismo de patogenicidad de *C. difficile* (Rupnik, Wilcox, & Gerding, 2009; Saujet, Pereira, Henriques, & Martin-Verstraete, 2014).

5. FACTORES DE PATOGENICIDAD

5.1 TOXINAS

El locus de patogenicidad (PaLoc) es un segmento grande del genoma (19.6 kb) que se encuentra en las cepas toxigénicas pero que está ausente en las cepas no toxigénicas. El PaLoc contiene cinco genes: *tcdA*, *tcdB*, *tcdC*, *tcdE*, y *tcdR* (Figura 2). La toxina A (TcdA) y la toxina B (TcdB) son codificadas por los genes *tcdA* y *tcdB*, respectivamente y se encuentra en un segmento de 21 kb. Algunas cepas también producen una toxina adicional conocida como toxina binaria, codificada por los genes *ctdA* y *ctdB* (Voth & Ballard, 2005). Además de su contribución a la enfermedad, las toxinas TcdA y TcdB son los marcadores primarios para el diagnóstico de la ICD y son detectadas en las heces de los pacientes mediante ensayos basados en anticuerpos y citotoxicidad. El gen *tcdE* codifica una proteína que es importante para la liberación de las toxinas A y B. *tcdR* es un regulador positivo de la expresión de *tcdA* y *tcdB*, mientras que *tcdC* es un regulador negativo de la producción de toxinas durante la fase exponencial (Warny *et al.*, 2005). Se ha demostrado los efectos celulares de las toxinas de *C. difficile*, las cuales incluyen desorganización del citoesqueleto, inducción de apoptosis, acumulación de fluidos y destrucción del epitelio intestinal (Ethapa *et al.*, 2013).

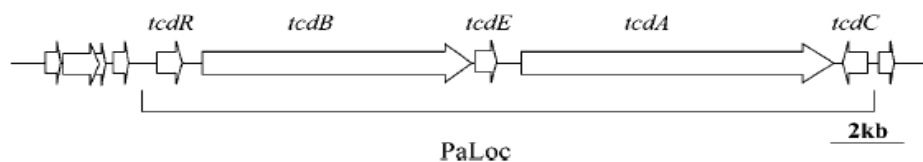


Figura 2. Locus de patogenicidad (PaLoc) de *C. difficile* (Dupuy, Govind, Antunes, & Matamouros, 2008).

5.2 ESPORAS

La transmisión de *C. difficile* es mediada principalmente por la contaminación con esporas procedentes del intestino. Las esporas son capaces de contribuir a la sobrevivencia durante terapia antimicrobiana. La disrupción de la microbiota intestinal por terapia antimicrobiana induce la infección y colonización de *C. difficile* en el tracto intestinal. Por lo que las esporas germinan y las células vegetativas se multiplican, y se producen los principales factores de virulencia (TcdA y TcdB). En condiciones adversas, como la limitación de nutrientes, las bacterias son capaces de cambiar su metabolismo y fisiología, y entran en fase estacionaria, en ocasiones para adaptarse a estas condiciones, expresan otros factores. Especies de la clase Bacilli y Clostridia, tienen la habilidad de llevar a cabo el proceso de diferenciación celular y formar esporas que germinarán cuando las condiciones vuelvan a ser favorables (Saujet, Monot, Dupuy, Soutourina, & Martin-Verstraete, 2011). Estudios recientes han descrito una cepa de *C. difficile* mutante para el gen regulador del proceso de esporulación, *spo0A*, lo cual lo hace incapaz de persistir eficientemente en el ambiente y de transmitir la infección (Dembek *et al.*, 2015).

Las esporas tienen una estructura multicapa, la cual les confiere la propiedad de resistir eficientemente a agentes desinfectantes de naturaleza química, física, calor y desecación. Por lo tanto, las esporas presentes en heces son difíciles de erradicar y son capaces de persistir en centros hospitalarios durante largos periodos ocasionando la infección y/o reinfección de individuos mediante la ingestión de esporas presentes en material contaminado (Dembek *et al.*, 2015).

Estudios recientes han demostrado que *C. difficile* es capaz de agregarse y formar biopelícula *in vitro* en superficies abióticas. La matriz de exopolisacáridos provee protección contra condiciones adversas como estrés oxidativo de las células vegetativas y esporas dentro de la biopelícula, sugiriendo un papel importante del regulador *spo0A* en la inducción de la formación de biopelícula en *C. difficile* (Dawson, Valiente, Faulds-Pain, Donahue, & Wren, 2012).

5.3 OTROS FACTORES

Existen otros factores involucrados en los procesos de virulencia, en el caso de las cepas hipervirulentas de *C. difficile* se ha descrito la sobreproducción de factores bacterianos tales como: proteínas asociadas a la capa S, proteínas de pared celular como Cwp66 y Cwp84, producción de biopelícula, producción de adhesinas, pili, proteína de choque térmico (GroEL), proteína de unión a fibronectina, componentes flagelares: flagelina (FliC) y proteína flagelar (FliD), entre otros (Deneve *et al.*, 2009; Ethapa *et al.*, 2013).

5.3.1 PRODUCCIÓN DE BIOPELÍCULA

La capacidad de producir biopelícula por parte de algunos patógenos tales como *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* y *S. aureus* ha sido asociada a infecciones bacterianas recurrentes (Hall-Stoodley & Stoodley, 2009). La formación de biopelícula facilita el proceso de infección potenciando la capacidad de adherirse al tejido hospedero y la resistencia a sus defensas, incluyendo el sistema inmune, y ha sido asociado también a resistencia a antimicrobianos. En algunos casos, las bacterias asociadas a biopelícula son 1000 veces más resistentes a antimicrobianos que las mismas en estado planctónico,

como resultado de esto algunas infecciones bacterianas pueden generar recurrencias después de tratamientos antimicrobianos repetitivos. Sin embargo, aún no se conocen los mecanismos específicos involucrados en el desarrollo de persistencia y resistencia de biopelícula en el hospedero (Semenyuk *et al.*, 2014).

La recurrencia y persistencia de *C. difficile* ha representado un problema de alto impacto en el tratamiento de las ICDs, estudios recientes *in vivo* han descrito la habilidad que tiene *C. difficile* de formar comunidades en células hospederas, y sugieren que tiene una función importante en la mayoría de las etapas de la enfermedad especialmente en la recurrencia, en la cual la biopelícula le confiere resistencia a las células bacterianas de ser removidas por el flujo del material gastrointestinal (Ethapa *et al.*, 2013) (Semenyuk *et al.*, 2014).

En un estudio *in vitro* se compararon diversos aspectos de la formación de biopelícula, en cepas NAP1/027 y no NAP1/027, entre ellos la presencia de esporas, debido a que estudios anteriores han descrito que la cepa hipervirulenta NAP1/027 tiene un aumento en la esporulación de 3-13 logaritmos en comparación a las no 027 (Akerlund *et al.*, 2008); a los 6 días de incubación observaron que no existía diferencia significativa, lo cual sugiere que las biopelículas llevan a cabo una supresión o disminución de la germinación en las cepas hipervirulentas, lo que les permite mantenerse en estado de latencia hasta desarrollar una infección recurrente (Semenyuk *et al.*, 2014).

5.3.2 QUORUM SENSING

Diversos factores de virulencia han mostrado tener una mayor eficiencia al ser producidos en presencia de una alta densidad poblacional de bacterias, las cuales son a su vez reguladas por un mecanismo denominado quorum sensing (QS) en el cual diversas poblaciones se comunican *inter* e *intra* especies para controlar la expresión genética de forma sincronizada de factores importantes en los procesos de colonización e infección del hospedero, esto ocurre en respuesta a la producción de moléculas señal que actúan como reguladoras que son liberadas al medio extracelular y a su vez son acumuladas conforme la densidad celular aumenta, estas moléculas son denominadas autoinductores (AI) (Carter, Purdy, Williams, & Minton, 2005; Darkoh, DuPont, Norris, & Kaplan, 2015).

5.3.2.1 Sistema LuxS/AI2-QS

El autoinductor 2 (AI-2) es una molécula señal que ha sido detectada en organismos Gram negativos y Gram positivos, ha sido implicada en la regulación de la expresión de factores de virulencia en diversos patógenos, su ubicuidad y falta de especificidad sugieren que se encuentra asociado al proceso de comunicación entre diferentes especies. La síntesis de AI2 es dependiente de *luxS* el cual codifica para AI-2 sintasa (LuxS). Estudios recientes han descrito a AI-2 como responsable de la regulación de diversos procesos, tales como: bioluminiscencia, formación de biopelícula, virulencia bacteriana, conjugación, esporulación, *swarming* y producción de antibióticos (Carter *et al.*, 2005; Han *et al.*, 2015).

La producción de AI-2 en cepas de *C. difficile* tales como la cepa 630 y CCUG19126, ocasiona un aumento significativo en la transcripción de las toxinas *tcdA* (7-10 log), *tcdB* (4-6 log) y *tcdE* (2-3 log), contrario al efecto mostrado al ser expuestas con sobrenadantes de *E. coli* DH5 α libres de células y en presencia de AI-2. Por otra parte, los niveles de toxina A no son sobre expresados por AI-2 al inicio de la fase logarítmica. Estos resultados sugieren que la regulación de la transcripción de toxinas de *C. difficile* es dependiente de LuxS^{cd}. Tanto el gen como la proteína LuxS son idénticos en las cepas analizadas, sugiriendo que este gen se encuentra conservado en cepas de *C. difficile* tanto patógenas como no patógenas (Lee & Song, 2005).

Por otro lado, Ethapa y colaboradores construyeron una mutante de *C. difficile* para el gen *luxS*, en este estudio analizaron la producción de biopelícula y observaron una disminución significativa de biomasa en comparación con la biopelícula producida por la cepa parental, así como un defecto en la formación de monocapa sobre una superficie abiótica; la cepa mutante fue complementada para recuperar la expresión completa de *luxS*, sin embargo el fenotipo parental no se pudo recuperar, a pesar de esto se detectaron varias capas de bacterias en la superficie abiótica comparado con la cepa mutante (Ethapa *et al.*, 2013).

5.3.2.2 Sistema Agr-QS

Se han identificado ortólogos del sistema del gen regulador accesorio, Agr, en *C. difficile*, y otras bacterias Gram-positivas, de las cuales el sistema Agr de *S. aureus*, ha sido el más estudiado. El sistema está formado por un operón conformado por cuatro genes: *agrA*, *agrB*, *agrC* y *agrD*. El *agrD* codifica para una prepeptido autoinductor, el

cual es procesado por la proteína transmembranal AgrB, liberando el péptido autoinductor (AI) al espacio extracelular, y activa la función de la ATPasa para llevar a cabo la fosforilación de AgrA, el regulador de respuesta. AgrA fosforilado, activa la transcripción a nivel del promotor del operón Agr, del promotor RNA III, para incrementar los niveles de RNA necesarios para regular la transcripción de los genes de interés.

Mediante la construcción de cepas mutantes para los genes *agrA* y *agrD*, se determinó que la molécula codificada por *agrD*, lleva a cabo la inducción temprana de la síntesis de toxinas independiente de la regulación mediada por *tcdC*. Por lo tanto, el sistema Agr tiene un papel crítico en la regulación de la expresión génica, la producción de factores de colonización y exoproteínas que son esenciales para el mecanismo de patogénesis de *C. difficile*.

5.3.3 PROTEÍNAS ASOCIADAS A LA ADHESIÓN

C. difficile lleva a cabo la expresión de proteínas asociadas a capa S y de pared celular, las cuales se encuentran involucradas con el proceso de adhesión y colonización celular, entre estas proteínas se encuentra SlpA la cual es un precursor proteínico formado por dos subunidades: la proteína de alto y bajo peso molecular, conocidas como HMW (P47) y LMW (P36) respectivamente, las cuales se ensamblan en la superficie bacteriana como un complejo no covalente y forman la capa paracristalina conocida como capa S. El proceso de clivaje o degradación proteolítica del precursor, es realizado por la proteasa Cwp84, esta proteína es procesada y exportada a la superficie bacteriana en donde el péptido señal N-terminal es removido, y es capaz de clivar SlpA

al estar en la superficie asociada a la capa S (Awad, Johanesen, Carter, Rose, & Lyras, 2014; Merrigan *et al.*, 2013).

Cwp84 es una de las proteínas de pared celular mejor caracterizadas, y además de procesar SlpA también tiene la capacidad de degradar proteínas de la matriz extracelular *in vitro* tales como fibronectina, laminina y vibronectina, sugiriendo que pueda tener un papel en la degradación de tejido y diseminación bacteriana durante la infección (Awad *et al.*, 2014; Pantaleon *et al.*, 2015). Cwp13 es una proteína homóloga de Cwp84, la cual tiene actividad proteolítica contra SlpA, sin embargo, no es esencial para el procesamiento de Cwp84 y SlpA. Se han descrito otras proteínas de pared celular las cuales son retenidas en la matriz o en la capa S, dependiendo de las condiciones de SlpA, Cwp66 y Cwp2 son secretadas al medio al haber una mutación en *cwp84*, lo cual es reversible al ser complementado (de la Riva, Willing, Tate, & Fairweather, 2011).

Estudios han evaluado la adherencia de *C. difficile* a células epiteliales bajo diferentes condiciones, al agregar una solución de SlpA purificada a un cultivo celular en monocapa, la adherencia se reduce significativamente, sugiriendo que la capa S tiene un papel importante en la adhesión a células y tejido gastrointestinal (Awad *et al.*, 2014; Merrigan *et al.*, 2013), así como en el proceso de producción de biopelícula, en un estudio con mutantes isogénicas para Cwp84 y otras proteínas de virulencia, se observó una reducción significativa en la biomasa de la biopelícula en la cepa mutante para Cwp84 en comparación con la parental, y la mutante complementada (Ethapa *et al.*, 2013).

En un estudio realizado en el 2014, se construyó una cepa de *C. difficile* mutante para el gen *Cwp84-* la cual producía una biopelícula con 72 veces mayor biomasa en comparación con la cepa parental e incluso que la mutante complementada con *Cwp84+*. Para determinar si este efecto se debía a la falta de la proteína *per se* o por la ausencia de su actividad proteolítica, se construyó una cepa recombinante con *Cwp84** no funcional, por lo cual SlpA no se clivaba, la cepa no fue capaz de producir biopelícula, sugiriendo que la acumulación de SlpA se encuentra directamente relacionada con la producción de biopelícula (Pantaleon *et al.*, 2015).

6. ICD RECURRENTE

La infección por *C. difficile* recurrente (ICD-R) puede desarrollarse como resultado de disrupción de la microbiota intestinal como consecuencia del uso indiscriminado o prolongado de antibióticos, por la producción de biopelícula por parte de *C. difficile* en el intestino proporcionando protección frente ambientes adversos dentro de la matriz de exopolisacáridos así como al permitirle colonizar nuevo nichos, o bien debido a la habilidad que tiene para sobrevivir a condiciones adversas en estado de latencia mediante la acumulación de esporas y posteriormente su germinación (Bjarnsholt, 2013).

Aproximadamente el 15-25% de los pacientes con ICD inicial desarrollan episodios de recurrencia dentro de los primeros dos meses. En un estudio realizado de 1994 a 1997, se estudiaron cepas *C. difficile* aisladas de ICD-R y encontraron que el 48.4% de los casos de ICD-R eran debido a infecciones por una cepa de *C. difficile* diferente a la inicial (reinfeción), sugiriendo que mediante la implementación del

aislamiento estricto de las cepas endémicas se podría obtener una reducción en la tasa de recurrencias (Barbut *et al.*, 2000).

En un estudio se analizaron cepas causantes de ICD-R mediante en donde se encontró que predominaron los ribotipos 078 y 020, y que el 88% (n=39) fueron causadas por una misma cepa (recaída) de acuerdo con la ribotipificación por PCR y confirmación mediante secuenciación (Mac Aogain *et al.*, 2015). En contraste, Richardson *et al.* encontraron en su población de estudio una predominancia del ribotipo 027 (70%) en el grupo de ICD-R. Además, las cepas presentaron susceptibilidad disminuida a metronidazol asociado al ribotipo (Richardson, Kim, Lee, Bersenas, & Weese, 2015).

Por otro lado, Crowther *et al.* desarrollaron un modelo complejo basado en la simulación del intestino humano, en el cual analizaron la interacción y la patogénesis de una infección inducida por dos cepas diferentes de *C. difficile*, en donde demostraron la proliferación y germinación simultánea, e inducir episodios de recurrencia, con diferencias en la tasa de crecimiento y tiempo de germinación; indicando que múltiples cepas pueden contribuir con el proceso de infección *in vitro* (Crowther *et al.*, 2015).

7. CEPAS HIPERVIRULENTAS Y SU ASOCIACIÓN CON ICD RECURRENTE

A partir del 2002 se dio un aumento significativo en la incidencia de ICD, lo cual se atribuyó en parte a la aparición de una cepa epidémica considerada hipervirulenta, implicada en brotes en Estados Unidos, Canadá, Reino Unido, Latinoamérica y Asia (Hubert *et al.*, 2007; Kuijper *et al.*, 2007; Warny *et al.*, 2005). Esta cepa fue identificada

como perteneciente al grupo BI, al ser analizada mediante la técnica de REA (del inglés “Restriction Endonuclease Analysis”); al grupo pulsotipo NAP1, al ser analizada por PFGE; y al ribotipo 027, a través de la ribotipificación (Rupnik *et al.*, 2009).

La cepa NAP1 presenta una delección de 18 pares de bases en el gen *tcdC*, el cual es un regulador negativo, que pierde la capacidad de regular negativamente la producción de las toxinas TcdA y TcdB, aumentando los niveles de ambas (Curry *et al.*, 2007; Dupuy *et al.*, 2008). Se observó que en las cepas NAP1 los niveles de expresión de las toxinas aumentan alrededor de 16 (TcdA) y 23 (TcdB) veces, además de que su producción ocurre durante las fases exponencial y estacionaria, a diferencia de las cepas comunes, cuya síntesis de toxinas solamente ocurre en la fase estacionaria (Warny *et al.*, 2005).

La propagación de NAP1 se ha asociado al desarrollo de resistencia a fluoroquinolonas, debido al uso indiscriminado de esta clase de antibióticos (Loo *et al.*, 2005; McDonald *et al.*, 2005; Warny *et al.*, 2005).

En países desarrollados como Reino Unido, los casos de ICD han disminuido considerablemente (de 55 498 a 13 361 casos, en el periodo del 2008 al 2014), debido a la implementación de un esquema de vigilancia por The National Health Service, que incluyeron el control del uso de antibióticos, el desarrollo de protocolos de control de infecciones y la creación de la red de ribotipificación de *C. difficile*, con el objetivo de prevenir la transmisión de la ICD, y controlar las cepas epidémicas (Brazier *et al.*, 2008; Dingle *et al.*, 2017; Duerden, 2011; Freeman *et al.*, 2018; Wilcox *et al.*, 2012).

La ICD es un problema mundial que se asocia al ribotipo 027, además de otros ribotipos, entre ellos algunos hipervirulentos, incluyendo los ribotipos 078, 001, 176, 020, 002, y 106 (Cassir *et al.*, 2017; Lessa, Mu, *et al.*, 2015; Nyc *et al.*, 2015; Pituch *et al.*, 2015; Rupnik *et al.*, 2016).

8. ASOCIACIÓN DE BIOPELÍCULA CON OTRAS INFECCIONES RECURRENTE

Diversos patógenos causantes de infecciones crónicas y recurrentes, tales como: *P. aeruginosa* en neumonía en paciente con fibrosis quística, *Haemophilus influenzae* y *S. aureus* en otitis media crónica, *S. aureus* en rinosinusitis y *E. coli* enteropatógena y uropatógena en infecciones intestinales y de tracto urinario, han sido asociadas con la capacidad de producir biopelícula.

Se ha demostrado la producción de biopelícula por parte de numerosos patógenos y es considerada como una estrategia de supervivencia importante. Sin embargo, además del análisis de placas dentales en muestras clínicas, se han realizado pocos reportes sobre el desarrollo de biopelícula. Las biopelículas se encuentran típicamente en infecciones crónicas resistentes a tratamientos antimicrobianos y a la respuesta inmune del hospedero (Hall-Stoodley & Stoodley, 2009).

En el 2012, un estudio realizado en pacientes con amigdalitis recurrente ocasionada por *Streptococcus*, determinaron la presencia de biopelícula a partir de muestras *in vivo*. Mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) detectaron presencia de biopelícula en el 80% de los pacientes con recurrencia y en el 45% de pacientes con dos años sin presentar reinfección (Woo *et al.*, 2013). De manera similar,

en el mismo año, se realizó un estudio en infantes con infecciones de vías respiratorias altas recurrentes con alta resistencia a antibióticos, en el cual llevaron a cabo biopsia de amígdalas y laringe, antes, durante, y después de cirugía, realizaron aislamiento de microorganismos y determinaron la producción de biopelícula mediante tinción con Cristal Violeta (CV) y SEM, observaron diferencias significativas en el tipo de biopelícula formada principalmente por *S. aureus* y *H. influenzae* antes y después de cirugía, sugiriendo un papel importante en el desarrollo de infección recurrente y persistente (Drago *et al.*, 2012).

Por otro lado, la producción de biopelícula ha sido también asociada al desarrollo infecciones de tracto urinario recurrente y persistente, a partir de muestras de infantes con infección del tracto urinario (UTI) recurrente y no recurrente por *E. coli*. En este estudio se realizó el análisis de producción de biopelícula en microplacas, tinción con CV y SEM y se observó un aumento en la producción de biopelícula en el grupo de aislamientos causantes de UTI recurrente en comparación con los de UTI no recurrente ($p= 0.006$), sugiriendo que la capacidad de formar biopelícula en *E. coli* uropatogénica (UPEC) es importante para el desarrollo UTI recurrente (Tapiainen, Hanni, Salo, Ikaheimo, & Uhari, 2014).

La evidencia de asociación entre el desarrollo de enfermedades crónicas y recurrentes y producción de biopelícula sugiere que tiene un papel importante en el desarrollo de persistencia y recurrencia de ICD (Crowther *et al.*, 2015).

JUSTIFICACIÓN

C. difficile es uno de los principales agentes causantes de diarrea nosocomial mundialmente, en años recientes su incidencia ha sido mayor que *S. aureus* resistente a meticilina la cual por muchos años se mantuvo en el primer lugar. La ICD ha sido asociada a tratamiento previo con antimicrobianos. Luego de algunas semanas de la cura clínica, los pacientes pueden sufrir de recurrencia (ICD-R).

Los índices de incidencia y mortalidad de *C. difficile* han ido en incremento con la aparición de una cepa epidémica hipervirulenta reconocida como ribotipo 027/NAP1/BI, la cual ha sido causante de brotes de ICD en Europa, Asia, Norteamérica y Latinoamérica, estas cepas epidémicas han sido estudiadas con el fin de conocer sus mecanismos de patogenicidad. Esta cepa presenta deleciones en el gen *tcdC* el cual regula negativamente la producción de toxinas, por lo que se considera ocasiona la síntesis elevada de toxinas A y B, sin embargo, este mecanismo no ha sido demostrado.

Otros estudios han demostrado la influencia de otros factores de virulencia en el proceso de infección, tales como: producción de biopelícula, presencia de flagelo, proteínas de la pared celular, de unión a fibronectina, adhesinas, entre otros. Estos factores son importantes en la adhesión y colonización; sin embargo, no se ha evaluado su efecto en la capacidad de producir recaídas, reinfecciones o persistencia en los pacientes con ICD. Estudios del genoma completo de cepas históricas de gran importancia como *C. difficile* 630 (ribotipo 012), han sido de gran utilidad para elucidar la función de los genes asociados a factores de virulencia en cepas epidémicas, sin embargo, actualmente existe una gran diversidad genómica entre las cepas de mayor interés debido a la microevolución y presencia de elementos genéticos móviles.

Por lo mencionado anteriormente es de suma importancia llevar a cabo la caracterización de aislamientos obtenidos de pacientes en estado recurrente, y no recurrente, analizar la capacidad que tienen para producir biopelícula, determinar los niveles de factores de virulencia y esporulación en biopelícula, así como la susceptibilidad a antibióticos, con el fin de determinar si existe una correlación entre la producción de biopelícula y el desarrollo de ICD recurrente.

HIPÓTESIS

La producción de factores de virulencia en biopelícula y el desarrollo de resistencia a antibióticos en *C. difficile* se encuentra asociada al desarrollo de ICD recurrente.

OBJETIVO

Determinar la producción de biopelícula, factores de virulencia y resistencia en biopelícula de cepas aisladas de pacientes con infección por *C. difficile* y su asociación con el desarrollo de ICD recurrente.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Aislar y caracterizar cepas de *C. difficile* a partir de muestras de pacientes con infección en estado recurrente y no recurrente.
2. Identificar el ribotipo de los aislamientos de *C. difficile*.
3. Determinar la producción de biopelícula de *C. difficile*
4. Determinar la susceptibilidad de los aislamientos de *C. difficile* en células vegetativas y de biopelícula a antibióticos.
5. Determinar los niveles de esporulación de las cepas de *C. difficile* en biopelícula.
6. Determinar la expresión de factores de virulencia en biopelícula.

METODOLOGÍA

1. Obtención de muestras

Durante el periodo Agosto 2015 - Diciembre 2017 se colectaron muestras fecales de pacientes con diagnóstico presuntivo de ICD del Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde” de Guadalajara, Jalisco y del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de Monterrey, Nuevo León. 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.). La infección se clasificó como ICD-R si presentaron ≥ 2 episodios confirmados para *C. difficile* en un periodo ≤ 8 semanas después del término del tratamiento para la ICD o de la resolución del episodio inicial (Surawicz *et al.*, 2013).

Se colectaron datos epidemiológicos, clínicos, información de terapia con antibióticos previo al diagnóstico de la ICD, y el tratamiento específico administrado para la ICD de 54 pacientes. Este estudio fue revisado y aprobado por el comité de ética (Aprobación: 047/16).

2. Detección y aislamiento de *C. difficile*

Las muestras fecales fueron tratadas con etanol durante 3 h y centrifugadas a 3000 rpm/5 min. Los sedimentos obtenidos fueron inoculados en placas con agar *C. difficile* (CDA, por sus siglas en inglés) (Neogen Corporation, Lansing, Michigan, EE. UU) con cefoxitina (16 mg/L) e incubados en anaerobiosis (90% N₂, 5%CO₂ y 5% H₂) a

37°C durante 48 h. Se seleccionaron colonias con morfología característica de *C. difficile* (colonias grises con borde irregular y secas). Posteriormente, se realizó tinción de Gram y se identificaron en el microscopio bacilos Gram positivos y presencia de esporas. Los aislamientos fueron almacenados a -80°C en caldo glicerol para posteriormente realizar la confirmación mediante espectrometría de masas y métodos moleculares.

3. Identificación mediante espectrometría de masas

Se realizó la identificación mediante la inoculación directa de colonias con morfología característica de *C. difficile* mediante espectrometría de masas acoplada a tiempo de vuelo (MALDI-TOF). A partir de un cultivo en placa de 24 h a 37°C en anaerobiosis, se tomaron 3 colonias y se colocaron 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- α -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.

4. Identificación por PCR

Para la obtención de DNA se realizó una lisis enzimática de los aislamientos clínicos, se seleccionaron cinco colonias típicas las cuales se resuspendieron en 200 µL de Tris-HCl 100 mM, se añadió lisozima (150 µl) y se incubó a 37°C durante 8 horas,

posteriormente se agregó proteinasa K (6 µl) y se incubó a 56°C durante 3 horas. Se realizó la extracción de DNA con el protocolo estándar fenol-cloroformo-alcohol isoamílico. Posteriormente, se realizó la amplificación del gen triosa fosfato isomerasa (*tpi*) (230 pb) por medio de PCR punto final, los oligonucleótidos que se utilizaron se encuentran citados en la Tabla 1 y se siguieron las condiciones descritas por Lemee y colaboradores (Lemee *et al.*, 2004) .

Tabla 1. Oligonucleótidos para amplificación del gen *tpi*

Oligonucleótido	5'-3'	Referencia
<i>tpi</i> -F	AAAGAAGCTACTAAGGGTACAAA	(Lemee <i>et al.</i> , 2004)
<i>tpi</i> -R	CATAATATTGGGTCTATTCCTAC	

5. Caracterización mediante PCR

Para todos los aislamientos obtenidos de *C. difficile* se realizó PCR múltiple para la identificación de los genes codificadores de toxinas: *tcdA*, *tcdB*, *cdtA*, *cdtB*, y del regulador negativo, *tcdC*, así como la delección del gen *tcdC*.

6. Análisis de *tcdA*, *tcdB*, *cdtA* y *cdtB*

Los genes *tcdA*, *tcdB*, *cdtA* y *cdtB* fueron amplificados mediante PCR punto final. El volumen total fue de 25 µL de: 0.5 µl de DNA y 24.5 µl de mezcla de reacción compuesta por: 3 mM de MgCl₂, 200 µM de dNTPs, buffer 1X (NH₄ 1X pH 8.8), 1 U de Taq polimerasa (Bioline, USA Inc., Boston, MA, EE. UU.) y 0.1 µM de cada oligonucleótido. (Tabla 2). Las condiciones de termociclador fueron las siguientes: 3 min a 94°C, 35 ciclos de 50 s a 94°C, 40 s a 56°C, 50 s a 72°C y una extensión final de 3 min a 72°C.

Tabla 2. Oligonucleótidos para amplificación de los genes codificadores de toxinas

Oligonucleótido	5'-3'	Referencia
<i>tcdA</i> -F3345	GCATGATAAGGCAACTTCAGTGGTA	(Persson, Torpdahl, & Olsen, 2008)
<i>tcdA</i> -R3969	AGTTCCTCCTGCTCCATCAAATG	
<i>tcdB</i> -F5670	CCAAARTGGAGTGTTACAAACAGGTG	(Persson <i>et al.</i> 2008)
<i>tcdB</i> -R6079A	GCATTTCTCCATTCTCAGCAAAGTA	
<i>tcdB</i> -R6079B	GCATTTCTCCGTTTTTCAGCAAAGTA	
<i>cdtA</i> -F739A	GGGAAGCACTATATTAAGCAGAAGC	(Persson <i>et al.</i> 2008)
<i>cdtA</i> -F739B	GGGAAACATTATATTAAGCAGAAGC	
<i>cdtA</i> -R958	CTGGGTTAGGATTATTTACTGGACCA	
<i>cdtB</i> -F617	TTGACCCAAAGTTGATGTCTGATTG	(Persson <i>et al.</i> 2008)
<i>cdtB</i> -R878	CGGATCTCTTGCTTCAGTCTTTATAG	

7. Análisis de la región deletada en *tcdC*

Para el análisis de la región deletada del gen *tcdC*, se llevó a cabo el protocolo descrito por Persson *et al.* (Persson, Jensen, & Olsen, 2011). El volumen total fue de 25 μ L de: 0.5 μ l de DNA y 24.5 μ l de mezcla de reacción compuesta por: 3 mM de MgCl₂, 200 μ M de dNTPs, buffer 1X (NH₄ 1X pH 8.8), 1 U de Taq polimerasa (Bioline, USA Inc., Boston, MA, EE. UU.) y 0.1 μ M de cada oligonucleótido para la amplificación de *tcdC* y sus deleciones (Tabla 3). Las condiciones de termociclador fueron las siguientes: 3 min a 94°C, 35 ciclos de 50 s a 94°C, 40 s a 56°C, 50 s a 72°C y una extensión final de 3 min a 72°C.

Tabla 3. Oligonucleótidos para la amplificación de *tcdC*

Oligonucleótido	5'-3'	Referencia
<i>tcdC</i> -F252	CATGGTTCAAAAATGAAAGACGAC	(Persson <i>et al.</i> , 2011)
<i>tcdC</i> -R415	GGTCATAAGTAATACCAGTATCATATCCTTTC	

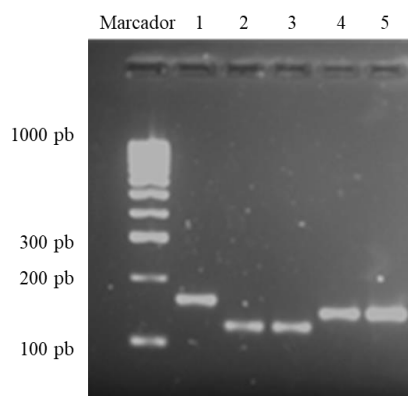


Figura 3. Amplificación del gen *tcdC* de *C. difficile* mediante PCR.

- 1.- *tcdC* sin deleción (160 pb).
- 2,3.-*tcdC* deleción de 39 pb (121 pb) característica del ribotipo 078.
- 4,5.- *tcdC* deleción de 18 pb (142 pb) característica del ribotipo 027.

8. Ribotipificación de *C. difficile*

Las reacciones de amplificación fueron realizadas de acuerdo con el método descrito por Bidet (Bidet *et al.*, 1999). El volumen total fue de 25 μ L de: 0.5 μ l de DNA y 24.5 μ l de mezcla de reacción compuesta por: 3mM de $MgCl_2$, 200 μ M de dNTPs, buffer 1X (NH_4 1X pH 8.8), 1 U de Taq polimerasa (Bioline, USA Inc., Boston, MA, E.U.A.) y 0.1 μ M para cada uno de los oligonucleótidos para las subunidades 16S y 23S (Tabla 4) del RNA ribosomal, las condiciones de termociclador fueron las siguientes: 6 min a 94°C, 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 57°C, 1 min a 72°C y una

extensión final de 7 min a 72°C. Los productos obtenidos de la amplificación fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa de 3% con bromuro de etidio durante 6 h a 85 V, y fue analizado en un transiluminador con luz ultravioleta con el software Lab Works Image Acquisition and Analysis Software Versión 4.5.00.0 para Windows (UVP, Inc., Upland, CA, EE. UU.).

Tabla 4. Oligonucleótidos para la amplificación de la región intergénica del RNA ribosomal.

Oligonucleótido	5'-3'	Referencia
16S	GTGCGGCTGGATCACCTCCT	(Bidet, Barbut, Lalande, Burghoffer, & Petit,
23S	CCCTGCACCCTTAATAACTTGACC	1999)

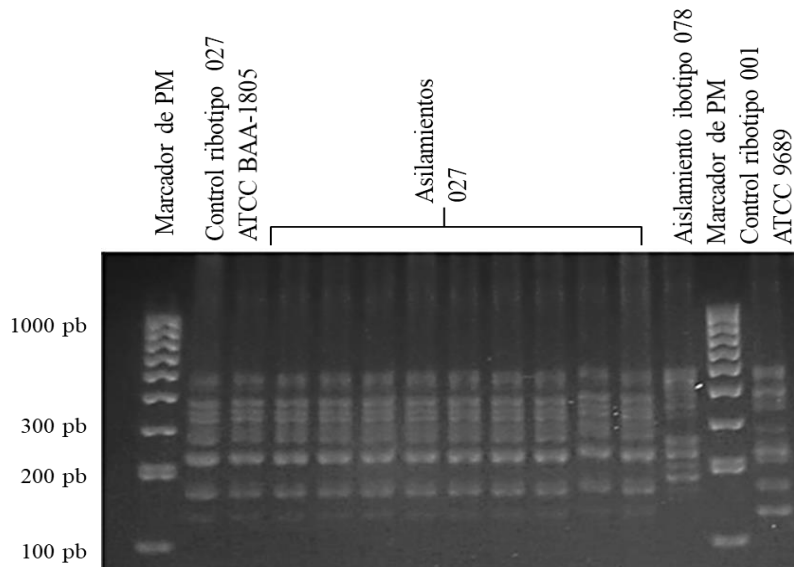


Figura 4. Ribotipificación por PCR. Amplificación de la región intergénica de las subunidades 16-23S del RNA ribosomal de *C. difficile*. Aislamientos correspondientes al ribotipo 027 con controles de cepas ATCC 9689 (ribotipo 038) y ATCC 70057 (ribotipo 001) de *C. difficile*

9. Modelo de biopelícula de *C. difficile*

Los ensayos de biopelícula fueron realizados de acuerdo a lo reportado anteriormente por Dawson *et al.* con algunas modificaciones (Dawson *et al.*, 2012; Hammond, Donkor, & Brown, 2014).

Los aislamientos fueron inoculados en infusión cerebro corazón (ICC) suplementado con extracto de levadura (0.5%) y L-cisteína (0.1%). Se realizaron diluciones 1:10 de cultivos de 18h de incubación a 37°C en anaerobiosis, cada dilución fue inoculada por cuadruplicado en placas de 96 pocillos e incubada estáticamente durante 7 días a 37°C en anaerobiosis. Posteriormente, se hicieron lavados de las células planctónicas y se leyó la densidad óptica a longitud de onda de 590 nm (DO₅₉₀) en un espectrómetro de microplacas iMark (Bio-rad, Hercules, CA, EE. UU.). Se realizaron tres lavados con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) (200 µl), la biopelícula fue fijada con glutaraldehído (2%), teñida con CV (0.1%), y el exceso de tinción fue eliminada mediante tres lavados con agua destilada estéril, finalmente se agregó ácido acético (30%) y se leyó su absorbancia (DO₅₉₀).

Se calculó el índice de biopelícula y los aislamientos fueron clasificados como fuertes productores, moderados, débiles y no productores (Tabla 5) (Stepanovic *et al.*, 2007). Los ensayos fueron realizados por triplicado y aquellos resultados con un coeficiente de variación menor al 20% fueron incluidos.

Tabla 5. Clasificación de aislamientos en base a la producción de biopelícula

Grupo	Índice de biopelícula
No productores	≤ 0.2
Productores débiles	0.2 - 0.90
Productores moderados	0.90 – 1.20
Productores fuertes	≥ 1.20

10. Modelo de biopelícula de *C. difficile* con microbiota

Se diseñó un modelo de biopelícula que incluye los aislamientos de *C. difficile* y especies representativas de la microbiota intestinal en un individuo sano, las cepas que se utilizaron fueron las siguientes: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *E. faecalis*, *Enterococcus faecium* *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rahnmosus* (obtenidas de especímenes clínicos).

Las cepas fueron inoculadas en ICC suplementado, posteriormente fueron incubadas en anaerobiosis a 37°C, las especies de *Enterococcus* durante 24 h y las de *Lactobacillus* durante 48 h, se realizó una dilución en ICC suplementado (1:10) y los cultivos fueron mezclados (1:1:1:1:1). Cada aislamiento de *C. difficile* fue agregado por cuadruplicado en una placa de 96 pocillos junto con la mezcla de microbiota y las placas fueron incubadas a 37°C durante 7 días en anaerobiosis. Se determinó el IB de la misma manera que con el modelo de biopelícula sin microbiota.

Para los experimentos de tipificación y producción de biopelícula se utilizaron las siguientes cepas como control de calidad: *C. difficile* ATCC BAA-1805 (ribotipo 027 y fuerte productor de biopelícula) y *C. difficile* ATCC 9689 (ribotipo 001 y débil productor de biopelícula).

11. Pruebas de susceptibilidad a antibióticos

Se realizaron pruebas de susceptibilidad antimicrobiana mediante el método de dilución en agar en una selección de aislamientos. Se incluyeron antibióticos administrados para el tratamiento de la ICD y antibióticos asociados con el desarrollo de ICD. Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) para los siguientes antibióticos: metronidazol (ICN Biomedical, Costa Mesa, CA), vancomicina, linezolid, ciprofloxacino, moxifloxacino, eritromicina, clindamicina, tetraciclina (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EE. UU.) y fidaxomicina (Stratech, Newmarket, UK).

Los diluyentes utilizados para la preparación de los antibióticos y los rangos de concentración probados fueron de acuerdo con las recomendaciones del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2019, M100-S28) y los puntos de corte utilizados se encuentran citados en la Tabla 6.

Los aislamientos de *C. difficile* fueron inoculados en caldo Schaedler (Neogen Corporation, MI, EE. UU.) e incubados en anaerobiosis durante 18 h a 37°C. Se inoculó una gota (10^4 UFC) en la superficie de agar Wilkins Chalgren (Neogen Corporation, MI, EE. UU.) con diferentes concentraciones de antibiótico (Freeman, Stott, Baines, Fawley, & Wilcox, 2005). La cepa *C. difficile* ATCC 700057 (ribotipo 038) fue usada como control de calidad.

Tabla 6. Puntos de corte para los agentes antimicrobianos.

Antimicrobiano	Punto de corte (mg/L)
Fidaxomicina	>1
Vancomicina ^a y linezolid ^b	≥4
Ciprofloxacino, moxifloxacino, Clindamicina ^c y eritromicina ^d	≥8
Tetraciclina	≥16
Metronidazol y rifampicina ^e	≥32

Los agentes antimicrobianos que no tienen puntos de corte establecidos por el CLSI, 2019 fueron basados en las siguientes fuentes: EUCAST, 2019^a; Pelaez *et al.*, 2002^b; Buchler *et al.*, 2014^c; CLSI, 2013^d y O'Connor *et al.*, 2008^e.

12. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de biopelícula (CMIB)

Para cada aislamiento de *C. difficile* se determinó la CMIB de vancomicina y linezolid, se retiraron las células planctónicas del cultivo de biopelícula de 7 días de incubación y se realizó un lavado con agua destilada estéril. Los antibióticos fueron diluidos en ICC suplementado y se agregaron 200 µl por pocillo. Los cultivos de biopelícula fueron resuspendidos e incubados a 37°C durante 48 h en anaerobiosis.

La CMIB fue la menor concentración de antibiótico que evitó el crecimiento microbiano. La cepa *C. difficile* ATCC 700057 (ribotipo 038) fue utilizada como control.

13. Cuantificación de esporas en biopelícula

Los cultivos de biopelícula de 7 días de incubación fueron resuspendidos en buffer fosfatos y se realizaron diluciones seriadas (10^1 - 10^7) e incubados a 65°C durante 20 min para eliminar las células vegetativas. Las diluciones fueron estriadas en placas con CDA antes y después del tratamiento térmico, las placas fueron incubadas a 37°C durante 48 h en anaerobiosis. Posteriormente se determinaron las células totales y las células resistentes al calor, que corresponden a la germinación de esporas como UFC/biopelícula.

14. Determinación de los niveles de expresión de *spo0A*, *sigH*, *slpA*, *cwp84*, *agrD₁*, y *luxS* en biopelícula

Se analizó una selección representativa de veinte aislamientos (10 obtenidos de pacientes con ICD-R y 10 de pacientes con ICD-NR). A partir de un cultivo de biopelícula de *C. difficile* de 48 h de incubación, se realizó la lisis bacteriana, se centrifugó y los sedimentos obtenidos fueron resuspendidos en agua DEPC (200 µl) e incubados con lisozima (10 mg/mL) (Bio-basic, Ontario, Canadá) y proteinasa K (Bio-basic, Ontario, Canadá). Se realizó la extracción de RNA total utilizando el kit Qiagen QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Alemania) y se determinó la calidad y concentración del RNA mediante espectrofotometría en el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, MA, EE. UU.).

Se determinaron los niveles relativos de expresión de genes asociados a la esporulación, *spo0A* y *sigH*; asociados a la adhesión y formación de la biopelícula, *slpA* y *cwp84*; y a quorum sensing, *luxS* y *agrDI*; la normalización de los genes fue realizada mediante la determinación del gen endógeno *rrs* correspondiente a la subunidad 16S del RNA ribosomal, se utilizó el kit SuperScript III Platinum One-Step (Invitrogen, CA, EE. UU.) siguiendo el protocolo del fabricante y se utilizaron oligonucleótidos diseñados en otros estudios, y para el gen *agrDI* fueron diseñados mediante el software Primer 3 plus (<https://primer3plus.com/>) (Tabla 7).

Se realizaron curvas estándar utilizando las siguientes concentraciones de RNA obtenido de la cepa control ATCC 9689: 12.5 ng, 25 ng, 50 ng, 100 ng y 200 ng, para cada gen de interés determinando la eficiencia de la reacción. Se incluyeron controles de RNA y de agua con DEPC. Las reacciones de RT-PCR fueron realizadas en dos muestras biológicas por duplicado, con 200 ng de RNA para cada aislamientos y 0.5 µl de los oligonucleótidos específicos para cada gen a 100 nM (listados en la Tabla 1) en un volumen de reacción total de 25 µL. El sistema Smart Cycler real time PCR (Cepheid, Sunnyvale, CA) fue utilizado con las siguientes condiciones: 94°C por 8 min, 45 ciclos de 94°C por 30 s; 60°C para *spo0A*, *sigH* and *cwp84*; 54°C para *slpA*, and *agrDI* y 30 s para *luxS*; y un ciclo de extensión a 72°C por 25 s.

Además, se realizaron curvas de disociación para confirmar la amplificación de los productos de interés y no de genes inespecíficos. Los datos fueron normalizados y analizados de acuerdo a lo descrito por Chang y colaboradores, la cepa ATCC 9689 fue

utilizada como cepa calibradora (Chang, Chen, Chang, Lee, & Wu, 2004). Se determinó la expresión relativa con la siguiente fórmula:

$$\text{Expresión relativa} = \frac{\text{ng del gen de interés en aislamientos} \div \text{ng del gen endógeno en aislamientos}}{\text{ng del gen de interés en calibrador} \div \text{ng del gen endógeno en calibrador}}$$

Los valores de expresión relativa mayor o igual a 3 fueron considerados como sobreexpresión.

Tabla 7. Oligonucleótidos para la determinación de la expresión de factores de virulencia mediante PCR tiempo real.

Oligonucleótido	5'-3'	Referencia
<i>rrs</i> -F	GGGAGACTTGAGTGCAGGAG	(Deneve, Delomenie, Barc, Collignon, & Janoir, 2008)
<i>rrs</i> -R	GTGCCTCAGCGTCAGTTACA	
<i>spo0A</i> -F	CTCAAAGCGCAATAAATCTAGGAGC	(Edwards, Nawrocki, & McBride, 2014)
<i>spo0A</i> -R	TTGAGTCTCTTGAAGTGGTCTAGG	
<i>sigH</i> -F	GTTGGTAGCAAAAAGAAAAAAGTTATGAG	(Karlsson, Burman, & Akerlund, 2008)
<i>sigH</i> -R	GTACTCTAGTGCTATTTTATCCCCTTCAC	
<i>slpA</i> -F	AATGATAAAGCATTGTAGTTGGTG	(Deneve <i>et al.</i> , 2008)
<i>slpA</i> -R	TATTGGAGTAGCATCTCCATC	
<i>cwp84</i> -F	TGGGCAACTGGTGGAAAATA	(Deneve <i>et al.</i> , 2008)
<i>cwp84</i> -R	TAGTTGCACCTTGTGCCTCA	
<i>luxS</i> -F	GTGTACTIONGATGGAGTAAAGGGAGA	(Yun, Oh, & Griffiths, 2014)
<i>luxS</i> -R	TTCTACATCCCATTGGAGATAAGTC	
<i>agrDI</i> -F	TTTGCTAGCTCATTGGCACTT	Primer 3 Plus
<i>agrDI</i> -R	GATTGCTGATTTCTTTGGGTACTT	

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las frecuencias de susceptibilidad reducida de cultivo planctónico y de biopelícula entre grupo ICD-R e ICD-NR fue analizado mediante la prueba de Chi cuadrada de Pearson y la prueba exacta de Fisher. Las diferencias entre las medias de expresión relativa entre aislamientos de ICD-R e ICD-NR fue analizado mediante la *t* de *Student*. Los datos no paramétricos fueron analizados con la prueba de Mann-Whitney y coeficiente de correlación de Spearman.

Todos los análisis fueron realizados mediante el programa estadístico SPSS versión 20.

Los valores de *p* menores a 0.05 fueron considerados estadísticamente significativos.

RESULTADOS

1. Población de estudio

Se confirmaron 254 pacientes con ICD mediante PCR, y fueron recuperados 110 aislamientos de *C. difficile* (35.29% de mujeres y 64.70% de hombres, rango de edad 15-85 años). La mayoría de los pacientes (96.30%) estuvo bajo tratamiento con antibióticos dentro de 12 semanas previas a la aparición de la diarrea asociada a ICD. Además, los pacientes con ICD-R tuvieron una mayor exposición a antibióticos previo a la ICD en comparación con pacientes ICD-NR ($p=0.037$). En contraste, el uso de macrólidos, fluoroquinolonas y vancomicina fue más frecuente en los pacientes con ICD-NR (Tabla 8).

Tabla 8. Características de pacientes con ICD-R e ICD- NR.

	ICD-R (n = 23)	ICD-NR (n = 31)	Valor <i>p</i>
Hospitalización			
Tiempo de estancia, días (media, rango)	29.55 (4–124)	20.86 (4–59)	0.181
Unidad de cuidados intensivos (UCI), n (%)	6 (26.09)	10 (32.26)	0.427
Tiempo de estancia en UCI, días (media, rango)	14.77 (2–48)	12.10 (2–48)	0.460
Antibióticos previos			
Antibióticos en general, n (%)	30 (96.77)	22 (95.65)	0.675
Tiempo de exposición, días (media, rango)	21.48 (1–100)	13.52 (1–52)	0.132
No. de antibióticos (media)	3.65	2.71	0.037*

Cefalosporinas	12 (54.54)	8 (27.59)	0.048*
Clindamicina	18 (81.82)	21 (72.41)	0.329
Macrólidos	21 (95.45)	27 (91.10)	0.605
Fluoroquinolonas	10 (45.45)	27 (91.10)	0.000*
Vancomicina	9 (40.91)	21 (72.41)	0.024*
Metronidazol	19 (86.36)	25 (86.21)	0.657
Carbapenémicos	14 (63.64)	17 (58.62)	0.472
<hr/>			
Tratamiento para la ICD			
Vancomicina	19 (86.36)	24 (80.00)	0.490
Metronidazol	13 (59.09)	19 (63.33)	0.415
Metronidazol/vancomicina	10 (45.45)	16 (56.33)	0.390

Los datos están representados como número de casos (%), a excepción en los que se indique tiempo en días. Diferencia significativa: valor de $p < 0.05$

2. Cultivo y ribotipificación

Setenta y cuatro (67.27%) fueron obtenidos de los pacientes con ICD-NR y 36 (32.73%) de los pacientes con ICD-R. La mayoría de los aislamientos fueron ribotipo 027 (89/110, 80.91%), seguido del ribotipo 003 y 002 (3/110, 2.72% cada uno), 001, 014, 078, 220, 076 (2/110, 1.82% cada uno), y 353 (1/110, 0.91%) (Tabla 9). No se encontró ninguna asociación en la distribución de ribotipos entre los grupos de pacientes con ICD-R e ICD-NR ($p=0.476$).

Tabla 9. Distribución de ribotipos entre el grupo de ICD-R e ICD-NR.

Genes	Ribotipo (n)
ICD-R (n = 36)	
<i>tcdA</i> ⁺ , <i>tcdB</i> ⁺ , <i>tcdC</i> Δ18 ⁺ , <i>cdtA</i> ⁺ / <i>cdtB</i> ⁺	027 (29)
<i>tcdA</i> ⁺ , <i>tcdB</i> ⁺ , <i>tcdC</i> Δ18 ⁻ , <i>cdtA</i> ⁻ / <i>cdtB</i> ⁻	003 (1), 001 (1), 076 (1), 002 (1), NT (2)
<i>tcdA</i> ⁺ , <i>tcdB</i> ⁺ , <i>tcdC</i> Δ18 ⁻ , <i>cdtA</i> ⁺ / <i>cdtB</i> ⁺	353 (1)
ICD-NR (n = 74)	
<i>tcdA</i> ⁺ , <i>tcdB</i> ⁺ , <i>tcdA</i> ⁺ , <i>tcdB</i> ⁺ , <i>tcdC</i> Δ18 ⁻ , <i>cdtA</i> ⁻ / <i>cdtB</i> ⁻	027 (60), 002 (2), 014 (2) 003 (2), 220 (2), 076 (1), NT (2), 001 (1)
<i>tcdA</i> ⁺ , <i>tcdB</i> ⁺ , <i>tcdC</i> Δ39 ⁺ , <i>cdtA</i> ⁺ / <i>cdtB</i> ⁺	078 (2)

3. Modelo de biopelícula de *C. difficile*

La mayoría de los aislamientos de *C. difficile* fueron productores de biopelícula (108/110, 98.18%), con el 86.11% de los aislamientos de ICD-R y 91.77% de los de ICD-NR fueron fuerte productores. No hubo diferencia en los BIs (OD₅₉₀) detectados entre los grupos ICD-R e ICD-NR (media geométrica, MG=53.87 y 54.06, respectivamente, p=0.579).

La esporulación fue mayor en los aislamientos de ICD-R en comparación con ICD-NR (50 Log₁₀⁴ UFC/biopelícula para ICD-R y 38.54 Log₁₀³ UFC/biopelícula para ICD-NR, p=0.015).

Tabla 10. Distribución de los aislamientos productores y no productores con los ribotipos de *C. difficile* obtenidos del grupo ICD-R e ICD-NR.

Grupo	Clasificación (n)	Ribotipo (n)
ICD-R	Productores fuertes (n=31)	027 (26), 003 (1), 076 (1), 002 (1), 353 (1), NT (1)
	Productores moderados (n=2)	027 (1), NT (1)
	Productores débiles (n=3)	027 (2), 001 (1)
	No productores (n=0)	-
ICD-NR	Productores fuertes (n=66)	027 (54), 003 (2), 078 (2), 003 (2), 001 (1), 014 (1), 076 (1), 220 (1), NT (2)
	Productores moderados (n=2)	027 (1), 220 (1)
	Productores débiles (n=4)	027 (3), 014 (1)
	No productores	027 (2)

NT: No tipificable

4. Modelo de biopelícula de *C. difficile* con microbiota

En el modelo de *C. difficile* con microbiota, la media de BI (OD₅₉₀) fue de 33.04 en cepas ICD-R y de 32.89 en cepas ICD-NR (p= 0.677).

La esporulación fue mayor en el grupo de aislamientos de ICD-R en comparación con el de ICD-NR (62.06 Log₁₀⁴ y 55.40 Log₁₀⁴ UFC/biopelícula, respectivamente, p=0.565).

5. CMIs

Se determinaron las CMIs por grupos de antibióticos. Primeramente, se determinó la susceptibilidad a antibióticos asociados con el desarrollo de la ICD (ciprofloxacino, moxifloxacino, eritromicina, clindamicina y rifampicina) en una selección de 65 aislamientos de *C. difficile* (26 del grupo ICD-R y 39 del grupo ICD-NR) y se observó susceptibilidad reducida en más del 70% de los aislamientos. Por otro lado, todos los

aislamientos fueron susceptibles a tetraciclina (CMI ≤ 8) en ambos grupos, ICD-R e ICD-NR.

Posteriormente se determinó la susceptibilidad a antibióticos utilizados para el tratamiento de la ICD (vancomicina, metronidazol, fidaxomicina, y linezolid) en todos los aislamientos. Los aislamientos de ICD-R mostraron mayor susceptibilidad reducida a vancomicina que los aislamientos de ICD-NR (27.78 y 9.09%, respectivamente). En contraste, todos los aislamientos presentaron susceptibilidad a metronidazol en ambos grupos.

La mayoría de los aislamientos fueron susceptibles a fidaxomicina; sin embargo, se observó una reducción en la susceptibilidad en los aislamientos de ICD-R a diferencia de los del grupo ICD-NR (11.11 y 0.00%, respectivamente). De manera similar, la mayoría de los aislamientos de ICD-R presentaron mayor susceptibilidad reducida a linezolid en comparación con los de ICD-NR (66.67 y 32.20%, respectivamente) (Tabla 11).

Tabla 11. Susceptibilidad antimicrobiana (mg/L) de aislamientos de ICD-R e ICD-NR.

Agente antimicrobiano	ICD-R	ICD-NR	Valor <i>p</i>
Ciprofloxacino MG	111.43	61.71	
Rango	8->128	1->128	
MIC ₉₀	>128	>128	
Resistencia (%)	96.15	89.74	0.342
Moxifloxacino MG	18.78	14.22	
Rango	1-32	1-32	
MIC ₉₀	32.00	32.00	

	Resistencia (%)	92.31	87.23	0.506
Eritromicina	MG	190.21	87.70	
	Rango	1->128	1->128	
	MIC ₉₀	>128	>128	
	Resistencia (%)	81.81	95.23	0.152
Clindamicina	MG	150.97	66.75	
	Rango	1->128	0.5->128	
	MIC ₉₀	>128	>128	
	Resistencia (%)	90.48	81.82	0.383
Vancomicina	MG	2.16	1.76	
	Rango	1-4	0.25-4	
	MIC ₉₀	4.00	2.00	
	Resistencia (%)	27.78	9.45	0.013*
Metronidazol	MG	1.17	1.44	
	Rango	0.125-4	0.125-8	
	MIC ₉₀	4.00	4.00	
	Resistencia (%)	0.00	0.00	NA
Linezolid	MG	3.92	4.00	
	Rango	0.5-32	0.03-32	
	MIC ₉₀	16.00	8.00	
	Resistencia (%)	66.67	32.20	0.404
Rifampicina	MG	13.55	16.02	
	Rango	0.001-	0.002->128	

		>128		
	MIC ₉₀	>128	128.00	
	Resistencia (%)	70.59	79.41	0.484
<hr/>				
Tetraciclina	MG	0.26	0.16	
	Rango	0.06–8	0.06–8	
	MIC ₉₀	4.00	0.13	
	Resistencia (%)	0.00	0.00	NA
<hr/>				
Fidaxomicina	MG	0.04	0.02	
	Rango	<0.03-2	<0.03-0.125	
	MIC ₉₀	0.6	0.06	
	Resistencia (%)	11.11	0.00	0.010*
<hr/>				

Adicionalmente, se obtuvo un grupo de aislamientos con multifarmacorresistencia a ciprofloxacino, moxifloxacino, eritromicina, clindamicina y vancomicina; todos corresponden al ribotipo 027 con mayor frecuencia en los aislamientos de ICD-R en comparación con los de ICD-NR (p=0.01).

6. CMIBs

El 93.52% (/108) de los aislamientos de *C. difficile* en biopelícula mostraron susceptibilidad reducida a vancomicina y el 90.74% (98/108) a linezolid.

Los CMIBs fueron 100 veces y 20 veces mayores que los CMI para vancomicina y linezolid, respectivamente. No se observaron diferencias entre los grupos de ICD-R e ICD-NR (Tabla 12).

Tabla 12. Distribución de CMI y CMIBs entre aislamientos obtenidos de ICD-R e ICD-NR.

		Vancomicina (mg/L)			Linezolid (mg/L)				
		Rango	MG	Resistencia (%)	Valor <i>p</i>	Rango	MG	Resistencia (%)	Valor <i>p</i>
ICD-R	CMI	1.00-4.00	1.88	10/36 (27.78)	0.000	0.50-32.0	3.92	3/36 (66.67)	0.000**
	CMIB	2.00-256	109.08	35/36 (97.22)		4.00-256.0	87.34	29/36 (80.55)	
ICD-NR	CMI	0.25-4.00	1.85	7/74 (9.45)	0.000	0.03-32.0	4.02	24/74 (32.20)	0.000**
	CMIB	2.00-256	108.35	66/72 (89.19)		2.00-256.0	89.63	69/72 (93.24)	

**Diferencia significativa $p < 0.01$

7. Expresión de *spo0A*, *sigH*, *slpA*, *cwp84*, *agrD1*, y *luxS*

La expresión relativa de los genes *spo0A*, *sigH*, *cwp84*, y *agrD1* fue mayor en los aislamientos seleccionados de pacientes con ICD-R en comparación con los pacientes con ICD-NR (Figura 3). Además, se observó la sobre expresión de *spo0A* (70%, 7/10), *sigH* (70%, 7/10), *cwp84* (40%, 4/10), y *agrD1* (70%, 7/10) en aislamientos del grupo ICD-R. No se detectaron diferencias en los niveles de expresión de *slpA* y *luxS* entre los aislamientos obtenidos de pacientes con ICD-R e ICD-NR (Figura 3).

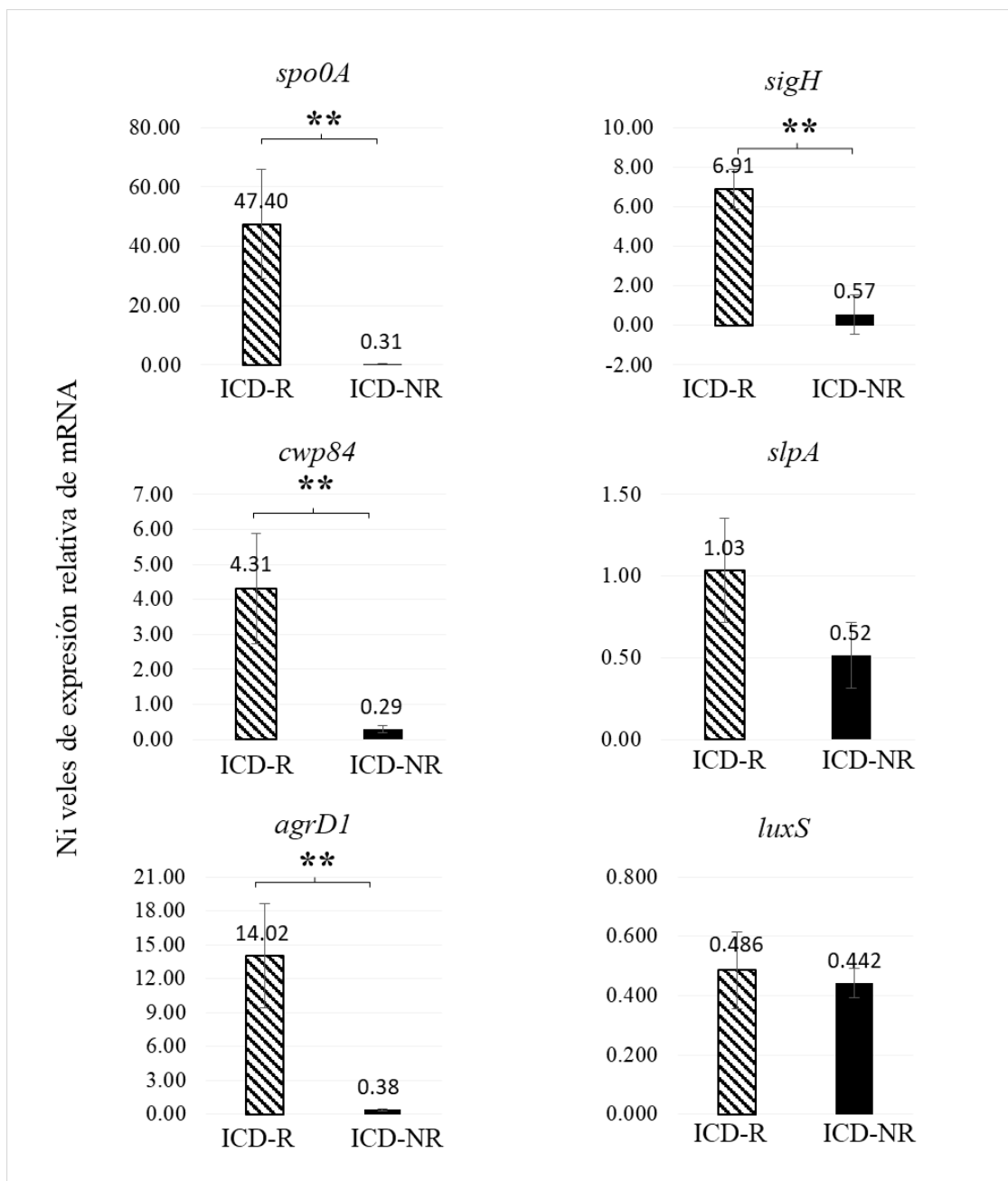


Figura 5. Niveles de expresión relativa media de transcritos de *spo0A*, *sigH*, *cwp84*, *slpA*, *agrD1*, y *luxS* entre aislamientos de ICD-R e ICD-NR.

**Diferencia significativa $p < 0.01$. (*spo0A* ($p = 0.003$), *sigH* ($p = 0.007$), *cwp84* ($p = 0.001$), *slpA* ($p = 0.066$), *agrD1* ($p = 0.001$) y *luxS* ($p = 0.400$)).

DISCUSIÓN

La propiedad de producir biopelícula *in vivo* e *in vitro* ha sido estudiada ampliamente en bacterias causantes de infecciones crónicas y recurrentes (Bjarnsholt, 2013), sin embargo hay pocos estudios sobre las características de la biopelícula producida por *C. difficile*. En el presente estudio, se evaluó la formación de biopelícula y la mayoría de los aislamientos fueron productores fuertes de biopelícula, independientemente del ribotipo, de la fuente de infección, y de si la infección era recurrente o no recurrente. Estos resultados son similares a los reportados anteriormente por otros autores, en los que no se encontró una correlación entre la capacidad de producir biopelícula con la virulencia y ribotipo de la cepa, así como con el desarrollo de recurrencia de la infección (Pantaleon *et al.*, 2015).

La expresión de los reguladores clave del mecanismo de quorum sensing y los factores asociados a la adhesión, fueron determinados en cultivos de biopelícula de *C. difficile*. Los genes *agrD1* y *cwp84* fueron sobre expresados en los aislamientos de pacientes con ICD-R, los cuales han mostrado tener un papel en la regulación en la etapa de colonización, en la virulencia y en el desarrollo de recurrencia en modelos *in vivo* (Darkoh *et al.*, 2015; Darkoh, Odo, & DuPont, 2016; Ethapa *et al.*, 2013; Martin *et al.*, 2013; Pantaleon *et al.*, 2015). En contraste, la expresión de *luxS* y *slpA* fue similar en los aislamientos de pacientes con ICD-R e ICD-NR.

Se han reportado diferencias en la formación de esporas en biopelícula de 7-10 días en comparación con el cultivo vegetativo, incluyendo el incremento de cuentas de

células viables, mayor termotolerancia, y la presentación de estructuras pleomórficas en biopelícula, entre ellas, diferencias en la morfología del exosporium que rodea a las esporas de la biopelícula (Lawley, Croucher, *et al.*, 2009; Pickering, Wilcox, & Chilton, 2018). En el presente estudio, se analizaron cultivos de biopelícula de 7 días y se encontraron mayores niveles de esporulación en las cepas de ICD-R que en las obtenidas de ICD-NR. Además, la esporulación se asoció con la sobreexpresión de los reguladores clave de las etapas tempranas de la vía de esporulación, *spo0A* y *sigH*, esto sugiere que tienen un papel importante en la sobreproducción de esporas dentro de la biopelícula de *C. difficile*. De acuerdo con estos resultados, la producción de esporas en biopelícula podría estar asociado con el desarrollo de ICD recurrente.

En el presente estudio, se detectó una alta frecuencia de resistencia a ciprofloxacino, moxifloxacino, eritromicina, clindamicina y rifampicina, y todos los aislamientos fueron susceptibles a tetraciclina y metronidazol. No se observaron diferencias en la susceptibilidad para estos antimicrobianos en aislamientos obtenidos de ICD-R e ICD-NR. En contraste, se observó menor susceptibilidad a linezolid en el grupo de aislamientos de ICD-R en comparación con los de ICD-NR. Este resultado es relevante debido a que este antimicrobiano es considerado como un agente potencial para el tratamiento de la ICD. De manera interesante, la población de estudio no presenta antecedentes de exposición a linezolid en las 12 semanas previas al diagnóstico de la ICD. Actualmente, se están estudiando los mecanismos moleculares responsables del desarrollo de resistencia a linezolid, hasta el momento la presencia del gen *cfr* se ha asociado con CMI's mayores a 16 mg/L en aislamientos de *C. difficile* (Marin *et al.*, 2015).

Además, los aislamientos del grupo ICD-R presentaron susceptibilidad reducida a fidaxomicina (2 mg/L) en comparación a los de ICD-NR, y a pesar de ser baja la frecuencia, cabe mencionar que este antibiótico no se encuentra disponible en México y los pacientes no tuvieron exposición previa al agente. Un estudio reciente detectó cincuenta aislamientos con resistencia a fidaxomicina (CMI >64mg/L), mediante estudios de mutación alélica, sugieren una asociación con una mutación de V1143D en el gen *rpoB* (Schwanbeck *et al.*, 2019), otras mutaciones en este gen se han reportado para la resistencia a rifampicina en esta población, (Martinez-Melendez *et al.*, 2018) .

De manera similar, los aislamientos de pacientes con ICD-R mostraron susceptibilidad reducida a vancomicina (>2 mg/L) con mayor frecuencia que en aislamientos de pacientes con ICD-NR (27.78 y 9.45%, respectivamente); este resultado es importante debido a que la vancomicina es un tratamiento de primera línea utilizado para el tratamiento de la ICD.

En estudios previos, se han reportado CMIs altos para moxifloxacino, rifampicina, vancomicina y clindamicina en los ribotipos 001, 017, 027, 176, 078 y 014 (Berger *et al.*, 2018; Freeman *et al.*, 2015). En este estudio, se detectaron CMIs altos para los mismos antibióticos, incluyendo para ciprofloxacino y eritromicina. La mayoría de los aislamientos de *C. difficile* analizados correspondieron al ribotipo 027. Anteriormente, se reportó en esta población una asociación entre el ribotipo 027 con un incremento en la tasa de mortalidad y mayor probabilidad de ICD-R (Camacho-Ortiz *et al.*, 2015).

Los aislamientos de *C. difficile* incluidos en el presente estudio, tuvieron una alta exposición a clindamicina, este factor ha sido asociado con una mayor excreción de esporas de *C. difficile* (Lawley, Clare, *et al.*, 2009). Por lo tanto, el uso frecuente de clindamicina en el sector hospitalario de México podría estar asociado con la alta esporulación detectada.

En un modelo de biopelícula de 3 días de *C. difficile* se realizaron ensayos de susceptibilidad a vancomicina, con valores de CMIBs 100 veces mayores en comparación con los CMIs que corresponden al cultivo planctónico (Ethapa *et al.*, 2013; James *et al.*, 2018; Mathur, Rea, Cotter, Hill, & Ross, 2016). En este estudio, se confirmó la susceptibilidad reducida a vancomicina en la mayoría de los aislamientos, con CMIBs 100 veces más altos que los CMIs para cada cepa.

Por otro lado, se ha reportado susceptibilidad reducida para metronidazol (Freeman *et al.*, 2005; Pelaez *et al.*, 2005), con CMIBs 6 veces mayores a los CMIs en *C. difficile* (Semenyuk *et al.*, 2014). A pesar, que los pacientes de esta población fueron tratados con metronidazol previo al diagnóstico de la ICD, no se encontraron aislamientos con susceptibilidad reducida a este agente antimicrobiano en células planctónicas ni en biopelícula.

Diversos factores de riesgo para el desarrollo de la ICD ha sido descritos en otros estudios (Abou Chakra, Pepin, Sirard, & Valiquette, 2014). En este estudio, el consumo de cefalosporinas y el consumo frecuente de antibióticos fueron un factor de riesgo para el desarrollo de la ICD-R. Además, los pacientes con ICD-NR presentaron con mayor

frecuencia consumo de fluoroquinolonas ($p = 0.000$) y vancomicina ($p = 0.024$) en comparación con pacientes con ICD-R.

La principal limitación de este estudio fue la obtención de cultivos a partir de muestras que no estaban frescas, se encontraron almacenadas en congelación a -20°C por dos años con al menos dos ciclos de descongelación y congelación, lo cual podría explicar el bajo nivel de detección de *C. difficile*.

CONCLUSIONES

1. La mayoría de los aislamientos obtenidos de esta población corresponden al ribotipo hipervirulento 027, y la mayoría fueron fuertes productores de biopelícula sin presentar ninguna asociación con el ribotipo.
2. Los aislamientos de ICD-R presentaron susceptibilidad reducida a vancomicina, linezolid y fidaxomicina en comparación con los aislamientos de ICD-NR en cultivo de células planctónicas.
3. Los aislamientos de ICD-R presentaron susceptibilidad reducida a vancomicina y linezolid en comparación con los aislamientos de ICD-NR en cultivo de biopelícula.
4. La esporulación y sobreexpresión de *sigH*, *spo0A*, y *agrD_I* fue mayor en los aislamientos obtenidos de pacientes con ICD-R en comparación con los aislamientos de ICD-NR.
5. El incremento en la esporulación en la biopelícula protegida puede dificultar la eliminación de esporas del intestino con una mayor persistencia de *C. difficile* al concluir con la terapia contra la ICD y por lo tanto influir en el desarrollo de la recurrencia.

PERSPECTIVAS

1. Determinar los genes de resistencia a vancomicina, linezolid y fidaxomicina en los aislamientos de ICD-R de esta población.
2. Evaluar los niveles de factores de virulencia producidos en un modelo *in vivo*.
3. Determinar los niveles de proteínas producidos de los genes sobre expresados en los aislamientos de ICD-R (SlpA, SigH, AgrD1 y Cwp84).
4. Determinar los niveles de producción de toxinas en cultivo celular de aislamientos de *C. difficile* de ICD-R e ICD-NR.
5. Evaluar el efecto de fidaxomicina y otras terapias alternativas en biopelícula y esporas procedentes de biopelícula de *C. difficile*.

BIBLIOGRAFÍA

- Abou Chakra, C. N., Pepin, J., Sirard, S., & Valiquette, L. (2014). Risk factors for recurrence, complications and mortality in *Clostridium difficile* infection: a systematic review. *PLoS One*, *9*(6), e98400. doi: 10.1371/journal.pone.0098400
- Akerlund, T., Persson, I., Unemo, M., Noren, T., Svenungsson, B., Wullt, M., & Burman, L. G. (2008). Increased sporulation rate of epidemic *Clostridium difficile* Type 027/NAP1. *J Clin Microbiol*, *46*(4), 1530-1533. doi: 10.1128/JCM.01964-07
- Awad, M. M., Johanesen, P. A., Carter, G. P., Rose, E., & Lyras, D. (2014). *Clostridium difficile* virulence factors: Insights into an anaerobic spore-forming pathogen. *Gut Microbes*, *5*(5), 579-593. doi: 10.4161/19490976.2014.969632
- Barbut, F., Richard, A., Hamadi, K., Chomette, V., Burghoffer, B., & Petit, J. C. (2000). Epidemiology of recurrences or reinfections of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *J Clin Microbiol*, *38*(6), 2386-2388.
- Bartlett, J. G., & Gerding, D. N. (2008). Clinical recognition and diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *Clin Infect Dis*, *46 Suppl 1*, S12-18. doi: 10.1086/521863
- Berger, F. K., Rasheed, S. S., Araj, G. F., Mahfouz, R., Rimmani, H. H., Karaoui, W. R., . . . Gartner, B. (2018). Molecular characterization, toxin detection and resistance testing of human clinical *Clostridium difficile* isolates from Lebanon. *International Journal of Medical Microbiology*, *308*(3), 358-363. doi: 10.1016/j.ijmm.2018.01.004
- Bidet, P., Barbut, F., Lalande, V., Burghoffer, B., & Petit, J. C. (1999). Development of a new PCR-ribotyping method for *Clostridium difficile* based on ribosomal RNA gene sequencing. *FEMS Microbiol Lett*, *175*(2), 261-266.
- Bjarnsholt, T. (2013). The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS Suppl*(136), 1-51. doi: 10.1111/apm.12099
- Brazier, J. S., Raybould, R., Patel, B., Duckworth, G., Pearson, A., Charlett, A., . . . Network, H. P. A. R. M. (2008). Distribution and antimicrobial susceptibility

- patterns of *Clostridium difficile* PCR ribotypes in English hospitals, 2007-08. *Euro Surveill*, 13(41).
- Camacho-Ortiz, A., Lopez-Barrera, D., Hernandez-Garcia, R., Galvan-De Los Santos, A. M., Flores-Trevino, S. M., Llaca-Diaz, J. M., . . . Garza-Gonzalez, E. (2015). First report of *Clostridium difficile* NAP1/027 in a Mexican hospital. *PLoS One*, 10(4), e0122627. doi: 10.1371/journal.pone.0122627
- Carter, G. P., Purdy, D., Williams, P., & Minton, N. P. (2005). Quorum sensing in *Clostridium difficile*: analysis of a luxS-type signalling system. *J Med Microbiol*, 54(Pt 2), 119-127.
- Cassir, N., Fahsi, N., Durand, G., Lagier, J. C., Raoult, D., & Fournier, P. E. (2017). Emergence of *Clostridium difficile* tcdC variant 078 in Marseille, France. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 36(10), 1971-1974. doi: 10.1007/s10096-017-3022-8
- Crowther, G. S., Chilton, C. H., Todhunter, S. L., Nicholson, S., Freeman, J., & Wilcox, M. H. (2015). Recurrence of dual-strain *Clostridium difficile* infection in an in vitro human gut model. *J Antimicrob Chemother*, 70(8), 2316-2321. doi: 10.1093/jac/dkv108
- Curry, S. R., Marsh, J. W., Muto, C. A., O'Leary, M. M., Pasculle, A. W., & Harrison, L. H. (2007). tcdC genotypes associated with severe TcdC truncation in an epidemic clone and other strains of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol*, 45(1), 215-221. doi: 10.1128/JCM.01599-06
- Chang, L. L., Chen, H. F., Chang, C. Y., Lee, T. M., & Wu, W. J. (2004). Contribution of integrons, and SmeABC and SmeDEF efflux pumps to multidrug resistance in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Antimicrob Chemother*, 53(3), 518-521. doi: 10.1093/jac/dkh094
- Darkoh, C., DuPont, H. L., Norris, S. J., & Kaplan, H. B. (2015). Toxin synthesis by *Clostridium difficile* is regulated through quorum signaling. *MBio*, 6(2), e02569. doi: 10.1128/mBio.02569-14
- Darkoh, C., Odo, C., & DuPont, H. L. (2016). Accessory Gene Regulator-1 Locus Is Essential for Virulence and Pathogenesis of *Clostridium difficile*. *MBio*, 7(4). doi: 10.1128/mBio.01237-16

- Dawson, L. F., Valiente, E., Faulds-Pain, A., Donahue, E. H., & Wren, B. W. (2012). Characterisation of *Clostridium difficile* biofilm formation, a role for Spo0A. *PLoS One*, 7(12), e50527. doi: 10.1371/journal.pone.0050527
- de la Riva, L., Willing, S. E., Tate, E. W., & Fairweather, N. F. (2011). Roles of cysteine proteases Cwp84 and Cwp13 in biogenesis of the cell wall of *Clostridium difficile*. *J Bacteriol*, 193(13), 3276-3285. doi: 10.1128/JB.00248-11
- Dembek, M., Barquist, L., Boinett, C. J., Cain, A. K., Mayho, M., Lawley, T. D., . . . Fagan, R. P. (2015). High-throughput analysis of gene essentiality and sporulation in *Clostridium difficile*. *MBio*, 6(2), e02383. doi: 10.1128/mBio.02383-14
- Deneve, C., Delomenie, C., Barc, M. C., Collignon, A., & Janoir, C. (2008). Antibiotics involved in *Clostridium difficile*-associated disease increase colonization factor gene expression. *J Med Microbiol*, 57(Pt 6), 732-738. doi: 10.1099/jmm.0.47676-0
- Deneve, C., Janoir, C., Poilane, I., Fantinato, C., & Collignon, A. (2009). New trends in *Clostridium difficile* virulence and pathogenesis. *Int J Antimicrob Agents*, 33 Suppl 1, S24-28. doi: 10.1016/S0924-8579(09)70012-3
- Depestel, D. D., & Aronoff, D. M. (2013). Epidemiology of *Clostridium difficile* infection. *J Pharm Pract*, 26(5), 464-475. doi: 10.1177/0897190013499521
- Dingle, K. E., Didelot, X., Quan, T. P., Eyre, D. W., Stoesser, N., Golubchik, T., . . . Modernising Medical Microbiology Informatics, G. (2017). Effects of control interventions on *Clostridium difficile* infection in England: an observational study. *Lancet Infectious Diseases*, 17(4), 411-421. doi: 10.1016/S1473-3099(16)30514-X
- Drago, L., De Vecchi, E., Torretta, S., Mattina, R., Marchisio, P., & Pignataro, L. (2012). Biofilm formation by bacteria isolated from upper respiratory tract before and after adenotonsillectomy. *APMIS*, 120(5), 410-416. doi: 10.1111/j.1600-0463.2011.02846.x
- Dubberke, E. R., & Olsen, M. A. (2012). Burden of *Clostridium difficile* on the healthcare system. *Clin Infect Dis*, 55 Suppl 2, S88-92. doi: 10.1093/cid/cis335

- Duerden, B. I. (2011). Contribution of a government target to controlling *Clostridium difficile* in the NHS in England. *Anaerobe*, *17*(4), 175-179. doi: 10.1016/j.anaerobe.2010.12.004
- Dupuy, B., Govind, R., Antunes, A., & Matamouros, S. (2008). *Clostridium difficile* toxin synthesis is negatively regulated by TcdC. *J Med Microbiol*, *57*(Pt 6), 685-689. doi: 10.1099/jmm.0.47775-0
- Edwards, A. N., Nawrocki, K. L., & McBride, S. M. (2014). Conserved oligopeptide permeases modulate sporulation initiation in *Clostridium difficile*. *Infect Immun*, *82*(10), 4276-4291. doi: 10.1128/IAI.02323-14
- Ethapa, T., Leuzzi, R., Ng, Y. K., Baban, S. T., Adamo, R., Kuehne, S. A., . . . Unnikrishnan, M. (2013). Multiple factors modulate biofilm formation by the anaerobic pathogen *Clostridium difficile*. *J Bacteriol*, *195*(3), 545-555. doi: 10.1128/JB.01980-12
- Freeman, J., Stott, J., Baines, S. D., Fawley, W. N., & Wilcox, M. H. (2005). Surveillance for resistance to metronidazole and vancomycin in genotypically distinct and UK epidemic *Clostridium difficile* isolates in a large teaching hospital. *J Antimicrob Chemother*, *56*(5), 988-989. doi: 10.1093/jac/dki357
- Freeman, J., Vernon, J., Morris, K., Nicholson, S., Todhunter, S., Longshaw, C., . . . Pan-European Longitudinal Surveillance of Antibiotic Resistance among Prevalent *Clostridium difficile* Ribotypes' Study, G. (2015). Pan-European longitudinal surveillance of antibiotic resistance among prevalent *Clostridium difficile* ribotypes. *Clin Microbiol Infect*, *21*(3), 248 e249-248 e216. doi: 10.1016/j.cmi.2014.09.017
- Freeman, J., Vernon, J., Pilling, S., Morris, K., Nicholson, S., Shearman, S., . . . Pan-European Longitudinal Surveillance of Antibiotic Resistance among Prevalent *Clostridium difficile* Ribotypes Study, G. (2018). The ClosER study: results from a three-year pan-European longitudinal surveillance of antibiotic resistance among prevalent *Clostridium difficile* ribotypes, 2011-2014. *Clin Microbiol Infect*, *24*(7), 724-731. doi: 10.1016/j.cmi.2017.10.008
- Hall-Stoodley, L., & Stoodley, P. (2009). Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol*, *11*(7), 1034-1043. doi: 10.1111/j.1462-5822.2009.01323.x

- Hammond, E. N., Donkor, E. S., & Brown, C. A. (2014). Biofilm formation of *Clostridium difficile* and susceptibility to Manuka honey. *BMC Complement Altern Med*, *14*, 329. doi: 10.1186/1472-6882-14-329
- Han, X., Liu, L., Fan, G., Zhang, Y., Xu, D., Zuo, J., . . . Yu, S. (2015). *Riemerella anatipestifer* lacks luxS, but can uptake exogenous autoinducer-2 to regulate biofilm formation. *Res Microbiol*, *166*(6), 486-493. doi: 10.1016/j.resmic.2015.06.004
- Hernandez-Rocha, C., Barra-Carrasco, J., Pizarro-Guajardo, M., Ibanez, P., Bueno, S. M., Sarker, M. R., . . . Paredes-Sabja, D. (2012). Epidemic *Clostridium difficile* ribotype 027 in Chile. *Emerg Infect Dis*, *18*(8), 1370-1372. doi: 10.3201/eid1808.120211
- Hubert, B., Loo, V. G., Bourgault, A. M., Poirier, L., Dascal, A., Fortin, E., . . . Lorange, M. (2007). A portrait of the geographic dissemination of the *Clostridium difficile* North American pulsed-field type 1 strain and the epidemiology of *C. difficile*-associated disease in Quebec. *Clin Infect Dis*, *44*(2), 238-244. doi: 10.1086/510391
- James, G. A., Chesnel, L., Boegli, L., deLancey Pulcini, E., Fisher, S., & Stewart, P. S. (2018). Analysis of *Clostridium difficile* biofilms: imaging and antimicrobial treatment. *J Antimicrob Chemother*, *73*(1), 102-108. doi: 10.1093/jac/dkx353
- Karlsson, S., Burman, L. G., & Akerlund, T. (2008). Induction of toxins in *Clostridium difficile* is associated with dramatic changes of its metabolism. *Microbiology*, *154*(Pt 11), 3430-3436. doi: 10.1099/mic.0.2008/019778-0
- Kuijper, E. J., van Dissel, J. T., & Wilcox, M. H. (2007). *Clostridium difficile*: changing epidemiology and new treatment options. *Curr Opin Infect Dis*, *20*(4), 376-383. doi: 10.1097/QCO.0b013e32818be71d
- Kyne, L., Warny, M., Qamar, A., & Kelly, C. P. (2000). Asymptomatic carriage of *Clostridium difficile* and serum levels of IgG antibody against toxin A. *N Engl J Med*, *342*(6), 390-397. doi: 10.1056/NEJM200002103420604
- Lawley, T. D., Clare, S., Walker, A. W., Goulding, D., Stabler, R. A., Croucher, N., . . . Dougan, G. (2009). Antibiotic treatment of *clostridium difficile* carrier mice triggers a supershedder state, spore-mediated transmission, and severe disease in

- immunocompromised hosts. *Infect Immun*, 77(9), 3661-3669. doi:
10.1128/IAI.00558-09
- Lawley, T. D., Croucher, N. J., Yu, L., Clare, S., Sebahia, M., Goulding, D., . . .
Dougan, G. (2009). Proteomic and genomic characterization of highly infectious
Clostridium difficile 630 spores. *J Bacteriol*, 191(17), 5377-5386. doi:
10.1128/JB.00597-09
- Lee, A. S., & Song, K. P. (2005). LuxS/autoinducer-2 quorum sensing molecule
regulates transcriptional virulence gene expression in *Clostridium difficile*.
Biochem Biophys Res Commun, 335(3), 659-666. doi:
10.1016/j.bbrc.2005.07.131
- Lemee, L., Dhalluin, A., Testelin, S., Mattrat, M. A., Maillard, K., Lemeland, J. F., &
Pons, J. L. (2004). Multiplex PCR targeting tpi (triose phosphate isomerase),
tcdA (Toxin A), and tcdB (Toxin B) genes for toxigenic culture of *Clostridium*
difficile. *J Clin Microbiol*, 42(12), 5710-5714. doi: 10.1128/JCM.42.12.5710-
5714.2004
- Lessa, F. C., Mu, Y., Bamberg, W. M., Beldavs, Z. G., Dumyati, G. K., Dunn, J. R., . . .
McDonald, L. C. (2015). Burden of *Clostridium difficile* infection in the United
States. *N Engl J Med*, 372(9), 825-834. doi: 10.1056/NEJMoa1408913
- Lessa, F. C., Winston, L. G., McDonald, L. C., & Emerging Infections Program, C. d. S.
T. (2015). Burden of *Clostridium difficile* infection in the United States. *N Engl*
J Med, 372(24), 2369-2370. doi: 10.1056/NEJMc1505190
- Loo, V. G., Poirier, L., Miller, M. A., Oughton, M., Libman, M. D., Michaud, S., . . .
Dascal, A. (2005). A predominantly clonal multi-institutional outbreak of
Clostridium difficile-associated diarrhea with high morbidity and mortality. *N*
Engl J Med, 353(23), 2442-2449. doi: 10.1056/NEJMoa051639
- Mac Aogain, M., Moloney, G., Kilkenny, S., Kelleher, M., Kelleghan, M., Boyle, B., &
Rogers, T. R. (2015). Whole-genome sequencing improves discrimination of
relapse from reinfection and identifies transmission events among patients with
recurrent *Clostridium difficile* infections. *J Hosp Infect*, 90(2), 108-116. doi:
10.1016/j.jhin.2015.01.021

- Marin, M., Martin, A., Alcalá, L., Cercenado, E., Iglesias, C., Reigadas, E., & Bouza, E. (2015). Clostridium difficile isolates with high linezolid MICs harbor the multiresistance gene cfr. *Antimicrob Agents Chemother*, 59(1), 586-589. doi: 10.1128/AAC.04082-14
- Martin, M. J., Clare, S., Goulding, D., Faulds-Pain, A., Barquist, L., Browne, H. P., . . . Wren, B. W. (2013). The agr locus regulates virulence and colonization genes in Clostridium difficile 027. *J Bacteriol*, 195(16), 3672-3681. doi: 10.1128/JB.00473-13
- Martinez-Melendez, A., Tijerina-Rodriguez, L., Morfin-Otero, R., Camacho-Ortiz, A., Villarreal-Trevino, L., Sanchez-Alanis, H., . . . Garza-Gonzalez, E. (2018). Circulation of Highly Drug-Resistant Clostridium difficile Ribotypes 027 and 001 in Two Tertiary-Care Hospitals in Mexico. *Microbial Drug Resistance*, 24(4), 386-392. doi: 10.1089/mdr.2017.0323
- Mathur, H., Rea, M. C., Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, R. P. (2016). The efficacy of thuricin CD, tigecycline, vancomycin, teicoplanin, rifampicin and nitazoxanide, independently and in paired combinations against Clostridium difficile biofilms and planktonic cells. *Gut Pathog*, 8, 20. doi: 10.1186/s13099-016-0102-8
- McDonald, L. C., Killgore, G. E., Thompson, A., Owens, R. C., Jr., Kazakova, S. V., Sambol, S. P., . . . Gerding, D. N. (2005). An epidemic, toxin gene-variant strain of Clostridium difficile. *N Engl J Med*, 353(23), 2433-2441. doi: 10.1056/NEJMoa051590
- McFarland, L. V., Brandmarker, S. A., & Guandalini, S. (2000). Pediatric Clostridium difficile: a phantom menace or clinical reality? *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 31(3), 220-231.
- Merrigan, M. M., Venugopal, A., Roxas, J. L., Anwar, F., Mallozzi, M. J., Roxas, B. A., . . . Vedantam, G. (2013). Surface-layer protein A (SlpA) is a major contributor to host-cell adherence of Clostridium difficile. *PLoS One*, 8(11), e78404. doi: 10.1371/journal.pone.0078404
- Miller, B. A., Chen, L. F., Sexton, D. J., & Anderson, D. J. (2011). Comparison of the burdens of hospital-onset, healthcare facility-associated Clostridium difficile Infection and of healthcare-associated infection due to methicillin-resistant

- Staphylococcus aureus in community hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 32(4), 387-390. doi: 10.1086/659156
- Mylonakis, E., Ryan, E. T., & Calderwood, S. B. (2001). Clostridium difficile--Associated diarrhea: A review. *Arch Intern Med*, 161(4), 525-533.
- Nyc, O., Krutova, M., Liskova, A., Matejkova, J., Drabek, J., & Kuijper, E. J. (2015). The emergence of Clostridium difficile PCR-ribotype 001 in Slovakia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 34(8), 1701-1708. doi: 10.1007/s10096-015-2407-9
- Owens, R. C., Jr., Donskey, C. J., Gaynes, R. P., Loo, V. G., & Muto, C. A. (2008). Antimicrobial-associated risk factors for Clostridium difficile infection. *Clin Infect Dis*, 46 Suppl 1, S19-31. doi: 10.1086/521859
- Pantaleon, V., Soavelomandroso, A. P., Bouttier, S., Briandet, R., Roxas, B., Chu, M., . . . Candela, T. (2015). The Clostridium difficile Protease Cwp84 Modulates both Biofilm Formation and Cell-Surface Properties. *PLoS One*, 10(4), e0124971. doi: 10.1371/journal.pone.0124971
- Pelaez, T., Alcalá, L., Alonso, R., Martín-López, A., García-Arias, V., Marin, M., & Bouza, E. (2005). In vitro activity of ramoplanin against Clostridium difficile, including strains with reduced susceptibility to vancomycin or with resistance to metronidazole. *Antimicrob Agents Chemother*, 49(3), 1157-1159. doi: 10.1128/AAC.49.3.1157-1159.2005
- Pelaez, T., Alonso, R., Perez, C., Alcalá, L., Cuevas, O., & Bouza, E. (2002). In vitro activity of linezolid against Clostridium difficile. *Antimicrob Agents Chemother*, 46(5), 1617-1618. doi: 10.1128/aac.46.5.1617-1618.2002
- Persson, S., Jensen, J. N., & Olsen, K. E. (2011). Multiplex PCR method for detection of Clostridium difficile tcdA, tcdB, cdtA, and cdtB and internal in-frame deletion of tcdC. *J Clin Microbiol*, 49(12), 4299-4300. doi: 10.1128/JCM.05161-11
- Persson, S., Torpdahl, M., & Olsen, K. E. (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. *Clin Microbiol Infect*, 14(11), 1057-1064. doi: 10.1111/j.1469-0691.2008.02092.x
- Pickering, D. S., Wilcox, M. H., & Chilton, C. H. (2018). Biofilm-derived spores of Clostridioides (Clostridium) difficile exhibit increased thermotolerance

- compared to planktonic spores. *Anaerobe*, 54, 169-171. doi: 10.1016/j.anaerobe.2018.10.003
- Pituch, H., Obuch-Woszczatynski, P., Lachowicz, D., Wultanska, D., Karpinski, P., Mlynarczyk, G., . . . Polish Clostridium difficile Study, G. (2015). Hospital-based Clostridium difficile infection surveillance reveals high proportions of PCR ribotypes 027 and 176 in different areas of Poland, 2011 to 2013. *Euro Surveill*, 20(38). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2015.20.38.30025
- Rebmann, T., Carrico, R. M., Association for Professionals in Infection, C., & Epidemiology. (2011). Preventing Clostridium difficile infections: an executive summary of the Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology's elimination guide. *Am J Infect Control*, 39(3), 239-242. doi: 10.1016/j.ajic.2010.10.011
- Richardson, C., Kim, P., Lee, C., Bersenas, A., & Weese, J. S. (2015). Comparison of Clostridium difficile isolates from individuals with recurrent and single episode of infection. *Anaerobe*, 33, 105-108. doi: 10.1016/j.anaerobe.2015.03.003
- Rupnik, M., Tambic Andrasevic, A., Trajkovska Dokic, E., Matas, I., Jovanovic, M., Pasic, S., . . . Janezic, S. (2016). Distribution of Clostridium difficile PCR ribotypes and high proportion of 027 and 176 in some hospitals in four South Eastern European countries. *Anaerobe*, 42, 142-144. doi: 10.1016/j.anaerobe.2016.10.005
- Rupnik, M., Wilcox, M. H., & Gerding, D. N. (2009). Clostridium difficile infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol*, 7(7), 526-536. doi: 10.1038/nrmicro2164
- Sammons, J. S., & Toltzis, P. (2015). Pitfalls in Diagnosis of Pediatric Clostridium difficile Infection. *Infect Dis Clin North Am*. doi: 10.1016/j.idc.2015.05.010
- Saujet, L., Monot, M., Dupuy, B., Soutourina, O., & Martin-Verstraete, I. (2011). The key sigma factor of transition phase, SigH, controls sporulation, metabolism, and virulence factor expression in Clostridium difficile. *J Bacteriol*, 193(13), 3186-3196. doi: 10.1128/JB.00272-11

- Saujet, L., Pereira, F. C., Henriques, A. O., & Martin-Verstraete, I. (2014). The regulatory network controlling spore formation in *Clostridium difficile*. *FEMS Microbiol Lett*, *358*(1), 1-10. doi: 10.1111/1574-6968.12540
- Schwanbeck, J., Riedel, T., Laukien, F., Schober, I., Oehmig, I., Zimmermann, O., . . . Bohne, W. (2019). Characterization of a clinical *Clostridioides difficile* isolate with markedly reduced fidaxomicin susceptibility and a V1143D mutation in *rpoB*. *J Antimicrob Chemother*, *74*(1), 6-10. doi: 10.1093/jac/dky375
- Semenyuk, E. G., Laning, M. L., Foley, J., Johnston, P. F., Knight, K. L., Gerding, D. N., & Driks, A. (2014). Spore formation and toxin production in *Clostridium difficile* biofilms. *PLoS One*, *9*(1), e87757. doi: 10.1371/journal.pone.0087757
- Stepanovic, S., Vukovic, D., Hola, V., Di Bonaventura, G., Djukic, S., Cirkovic, I., & Ruzicka, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*, *115*(8), 891-899. doi: 10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x
- Stewart, D. B., Berg, A. S., & Hegarty, J. P. (2014). Single nucleotide polymorphisms of the *tcdC* gene and presence of the binary toxin gene predict recurrent episodes of *Clostridium difficile* infection. *Ann Surg*, *260*(2), 299-304. doi: 10.1097/SLA.0000000000000469
- Surawicz, C. M., Brandt, L. J., Binion, D. G., Ananthakrishnan, A. N., Curry, S. R., Gilligan, P. H., . . . Zuckerbraun, B. S. (2013). Guidelines for diagnosis, treatment, and prevention of *Clostridium difficile* infections. *Am J Gastroenterol*, *108*(4), 478-498; quiz 499. doi: 10.1038/ajg.2013.4
- Tapiainen, T., Hanni, A. M., Salo, J., Ikaheimo, I., & Uhari, M. (2014). *Escherichia coli* biofilm formation and recurrences of urinary tract infections in children. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, *33*(1), 111-115. doi: 10.1007/s10096-013-1935-4
- Voth, D. E., & Ballard, J. D. (2005). *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. *Clin Microbiol Rev*, *18*(2), 247-263. doi: 10.1128/CMR.18.2.247-263.2005
- Warny, M., Pepin, J., Fang, A., Killgore, G., Thompson, A., Brazier, J., . . . McDonald, L. C. (2005). Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile*

- associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. *Lancet*, 366(9491), 1079-1084. doi: 10.1016/S0140-6736(05)67420-X
- Wilcox, M. H., Shetty, N., Fawley, W. N., Shemko, M., Coen, P., Birtles, A., . . . Wren, M. W. (2012). Changing epidemiology of *Clostridium difficile* infection following the introduction of a national ribotyping-based surveillance scheme in England. *Clin Infect Dis*, 55(8), 1056-1063. doi: 10.1093/cid/cis614
- Woo, J. H., Kim, S. T., Kang, I. G., Lee, J. H., Cha, H. E., & Kim, D. Y. (2013). [Comparison of tonsillar biofilms between patients with recurrent tonsillitis and a control group]. *Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*, 27(11), 598-601.
- Yun, B., Oh, S., & Griffiths, M. W. (2014). *Lactobacillus acidophilus* modulates the virulence of *Clostridium difficile*. *J Dairy Sci*, 97(8), 4745-4758. doi: 10.3168/jds.2014-7921

ANEXO I

Ribotipos de *C. difficile* y presencia de genes por aislamiento

Aislamiento	Procedencia	Grupo	Ribotipo	<i>tcdA</i>	<i>tcdB</i>	<i>cdtA/cdtB</i>	Delección <i>tcdC</i> (pb)
2	HU	ICD-NR	027	+	+	+	18
3	HU	ICD-NR	027	+	+	+	18
4	HU	ICD-R	027	+	+	+	18
5	HU	ICD-NR	027	+	+	+	18
6	HU	ICD-R	027	+	+	+	18
7	HU	ICD-NR	027	+	+	+	18
8	HU	ICD-NR	027	+	+	+	18
9	HU	ICD-R	353	+	+	+	0
10	HU	ICD-R	003	+	+	neg	0
11	HU	ICD-NR	027	+	+	+	18
13	HU	ICD-NR	220	+	+	neg	0
14	HU	ICD-NR	078	+	+	+	39
15	HU	ICD-NR	027	+	+	+	18
16	HU	ICD-NR	220	+	+	neg	0
17	HU	ICD-NR	027	+	+	+	18
19	HU	ICD-NR	027	+	+	+	18
21	HU	ICD-NR	027	+	+	+	18
24	HU	ICD-NR	027	+	+	+	18
26	HU	ICD-R	027	+	+	+	18
28	HU	ICD-NR	027	+	+	+	18
30	HU	ICD-R	027	+	+	+	18
31	HU	ICD-NR	027	+	+	+	18
32	HU	ICD-NR	003	+	+	neg	0
33	HU	ICD-NR	027	+	+	+	18
34	HU	ICD-NR	027	+	+	+	18
38	HU	ICD-NR	NT	+	+	neg	0
39	HU	ICD-NR	027	+	+	+	18
40	HU	ICD-NR	027	+	+	+	18
43	HU	ICD-NR	002	+	+	neg	0
44	HU	ICD-NR	027	+	+	+	18
48	HU	ICD-NR	027	+	+	+	18
49	HU	ICD-NR	027	+	+	+	18
51	HU	ICD-R	027	+	+	+	18
52	HU	ICD-NR	027	+	+	+	18

Continuación

Aislamiento	Procedencia	Grupo	Ribotipo	<i>tcdA</i>	<i>tcdB</i>	<i>cdtA/cdtB</i>	Delección <i>tcdC</i> (pb)
54	HU	ICD-R	027	+	+	+	18
56	HU	ICD-R	027	+	+	+	18
57	HU	ICD-R	027	+	+	+	18
58	HU	ICD-NR	027	+	+	+	18
60	HU	ICD-NR	027	+	+	+	18
61	HU	ICD-R	027	+	+	+	18
62	HU	ICD-R	NT	+	+	neg	18
63	HU	ICD-NR	027	+	+	+	18
64	HU	ICD-R	027	+	+	+	18
65	HU	ICD-NR	027	+	+	+	18
71	HU	ICD-R	027	+	+	+	18
75	HU	ICD-NR	NT	+	+	neg	0
77	HU	ICD-NR	027	+	+	+	18
79	HU	ICD-NR	027	+	+	+	18
80	HU	ICD-NR	027	+	+	+	18
81	HU	ICD-R	027	+	+	+	18
96	HU	ICD-NR	027	+	+	+	18
100	HU	ICD-R	027	+	+	+	18
101	HU	ICD-NR	027	+	+	+	18
102	HU	ICD-NR	027	+	+	+	18
104	HU	ICD-NR	027	+	+	+	18
111	HU	ICD-NR	027	+	+	+	18
153	HU	ICD-R	027	+	+	+	18
175	HU	ICD-NR	027	+	+	+	18
200	HU	ICD-NR	027	+	+	+	18
204	HU	ICD-NR	027	+	+	+	18
209	HU	ICD-NR	027	+	+	+	18
219	HU	ICD-NR	027	+	+	+	18
228	HU	ICD-NR	027	+	+	+	18
295	HU	ICD-R	027	+	+	+	18
306	HU	ICD-NR	027	+	+	+	18
311	HU	ICD-NR	014	+	+	neg	0
312	HU	ICD-NR	027	+	+	+	18
314	HU	ICD-R	027	+	+	+	18
315	HU	ICD-NR	027	+	+	+	18
320	HU	ICD-NR	027	+	+	+	18
347	HU	ICD-NR	027	+	+	+	18

Continuación

Aislamiento	Procedencia	Grupo	Ribotipo	<i>tcdA</i>	<i>tcdB</i>	<i>cdtA/cdtB</i>	Delección <i>tcdC</i> (pb)
348	HU	ICD-NR	027	+	+	+	18
356	HU	ICD-NR	027	+	+	+	18
15-004	GDL	ICD-R	027	+	+	+	18
15-006	GDL	ICD-R	027	+	+	+	18
15-009	GDL	ICD-R	027	+	+	+	18
15-011	GDL	ICD-R	027	+	+	+	18
15-049	GDL	ICD-R	027	+	+	+	18
15-063	GDL	ICD-R	027	+	+	+	18
15-072	GDL	ICD-R	001	+	+	neg	0
15-085	GDL	ICD-R	027	+	+	+	18
15-105	GDL	ICD-R	027	+	+	+	18
16-193	GDL	ICD-NR	002	+	+	neg	0
16-196	GDL	ICD-NR	027	+	+	+	18
16-197	GDL	ICD-NR	014	+	+	neg	0
16-198	GDL	ICD-R	NT	+	+	neg	0
16-200	GDL	ICD-NR	003	+	+	neg	0
16-201	GDL	ICD-R	002	+	+	+	0
16-204	GDL	ICD-NR	027	+	+	+	18
16-206	GDL	ICD-NR	076	+	+	neg	0
16-207	GDL	ICD-R	076	+	+	neg	0
16-209	GDL	ICD-NR	027	+	+	+	18
16-210	GDL	ICD-NR	027	+	+	+	18
16-211A	GDL	ICD-NR	027	+	+	+	18
16-211B	GDL	ICD-NR	078	+	+	+	39
16-212	GDL	ICD-NR	027	+	+	+	18
16-213	GDL	ICD-R	027	+	+	+	18
17-002	GDL	ICD-NR	027	+	+	+	18
17-003	GDL	ICD-NR	001	+	+	neg	0
17-006	GDL	ICD-NR	027	+	+	+	18
17-008	GDL	ICD-R	027	+	+	+	18
17-009	GDL	ICD-R	027	+	+	+	18
17-012	GDL	ICD-NR	027	+	+	+	18
17-014	GDL	ICD-NR	027	+	+	+	18
17-016	GDL	ICD-NR	027	+	+	+	18
17-020	GDL	ICD-NR	027	+	+	+	18
17-021	GDL	ICD-NR	027	+	+	+	18
17-022	GDL	ICD-NR	027	+	+	+	18

Continuación

Aislamiento	Procedencia	Grupo	Ribotipo	<i>tcdA</i>	<i>tcdB</i>	<i>cdtA/cdtB</i>	Delección <i>tcdC</i> (pb)
A4	GDL	ICD-R	027	+	+	+	18
A5	GDL	ICD-R	027	+	+	+	18

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

ANEXO II

Concentraciones mínimas inhibitorias a antibióticos asociados a la ICD.

Aislamiento	Grupo	CIP	MOX	ERI	CLIN	RIF	TET
3	ICD-NR	64	16	>128	128	64	0.125
5	ICD-NR	>128	32	16	8	32	0.125
6	ICD-R	8	8	1	1	0.001	0.125
7	ICD-NR	128	32	>128	>128	128	0.125
9	ICD-R	64	16	>128	128.000	128	0.125
10	ICD-R	16	1	>128	>128	64	0.060
11	ICD-NR	2	32	2.000	4.000	0.060	0.060
13	ICD-NR	32	1	64	8	0.03	0.125
14	ICD-NR	64	8	>128	>128	128	0.125
17	ICD-NR	64	16	>128	>128	64	0.125
21	ICD-NR	2	16	>128	8	0.016	0.125
24	ICD-NR	>128	32	64	16	32	0.060
26	ICD-R	64	32	>128	>128	128	0.125
28	ICD-NR	>128	32	>128	>128	0.002	0.125
30	ICD-R	128	8	>128	>128	>128	0.060
31	ICD-NR	2	8	1	0.500	128	0.125
32	ICD-NR	8	8	2	2	64	0.060
34	ICD-NR	>128	32	>128	>128	128	0.125
44	ICD-NR	64	32	2.000	0.500	64	4
49	ICD-NR	>128	32	64	16	32	0.060
51	ICD-R	>128	32	>128	>128	128	2
52	ICD-NR	16	8	1	1	64	0.060
56	ICD-R	>128	16	>128	>128	128	0.125
57	ICD-R	>128	32	>128	>128	128	0.125
60	ICD-NR	64	32	>128	>128	>128	0.125
61	ICD-R	32	32	>128	>128	>128	0.060
62	ICD-R	64	32	128	4	128	8
63	ICD-NR	32	8	>128	>128	128	0.125
64	ICD-R	64	32	>128	>128	0.125	2
71	ICD-R	>128	32	>128	>128	0.060	0.060
75	ICD-NR	16	16	1.000	0.500	0.004	0.125
77	ICD-NR	1	32	64.000	8	128	0.125
79	ICD-NR	128	32	>128	>128	>128	0.060
100	ICD-R	128	32	>128	>128	0.125	0.060

Continuación

Aislamiento	Grupo	CIP	MOX	ERI	CLIN	RIF	TET
102	ICD-NR	>128	32	32	8	16	0.060
104	ICD-NR	8	32	>128	>128	64	0.125
111	ICD-NR	16	2	64	128	0.016	8.000
175	ICD-NR	>128	32	>128	>128	64	0.125
228	ICD-NR	128	32	>128	>128	64.000	0.060
314	ICD-R	64	16	>128	>128	>128	0.125
347	ICD-NR	128	32	>128	>128	128	0.125
348	ICD-NR	0.125	16	>128	0.5	64.000	0.125
356	ICD-NR	16	16	64	64	0.016	4.000
15-006	ICD-R	16	1	>128	128.000	0.030	8.000
15-009	ICD-R	64	16	128	128	128	0.060
15-011	ICD-R	>128	32	128	>128	128	0.125
15-049	ICD-R	>128	32	>128	>128	64.000	0.125
15-063	ICD-R	64	32	>128	>128	128.000	0.060
15-072	ICD-R	>128	16	>128	>128	>128	2.000
15-105	ICD-R	>128	32	128	128	64	0.060
16-193	ICD-NR	>128	16	>128	128	64	0.125
16-198	ICD-R	>128	16	>128	>128	128	0.125
16-200	ICD-NR	>128	16	64	64	128	0.125
16-204	ICD-NR	64	16	>128	>128	>128	0.125
16-206	ICD-NR	8	16	>128	>128	128	0.125
16-207	ICD-R	>128	32	128	>128	128	0.060
16-209	ICD-NR	>128	16	>128	>128	64	0.125
16-211A	ICD-NR	>128	16	>128	>128	128	0.125
16-213	ICD-R	>128	16	>128	>128	>128	0.125
17-006	ICD-NR	8	16	>128	>128	128	0.125
17-008	ICD-R	>128	16	>128	>128	128	0.125
17-020	ICD-NR	128	16	>128	>128	64	0.125
17-021	ICD-NR	64	16	>128	>128	64	0.125
17-022	ICD-NR	128	16	>128	>128	>128	0.125
A4	ICD-R	>128	32	>128	>128	>128	0.060

CIP: ciprofloxacino; MOX: moxifloxacino; ERI: eritromicina; CLIN: clindamicina; RIF: rifampicina; TET: tetraciclina.

ANEXO III

Concentraciones mínimas inhibitorias a antibióticos para el tratamiento de la ICD.

Aislamiento	Grupo	VAN	MET	FDX	LIN
2	ICD-NR	2.00	2.00	<0.03	16.00
3	ICD-NR	2.00	4.00	<0.03	2.00
5	ICD-NR	1.00	0.50	<0.03	0.50
6	ICD-R	1.00	0.50	0.06	0.50
7	ICD-NR	4.00	2.00	0.06	2.00
9	ICD-R	2.00	4.00	<0.03	8.00
8	ICD-NR	2.00	8.00	<0.03	16.00
10	ICD-R	2.00	0.25	0.06	1.00
11	ICD-NR	1.00	0.25	0.06	1.00
13	ICD-NR	2.00	0.25	0.06	1.00
14	ICD-NR	2.00	4.00	0.06	2.00
17	ICD-NR	2.00	4.00	<0.03	2.00
15	ICD-NR	0.25	4.00	0.13	1.00
16	ICD-NR	2.00	1.00	0.06	8.00
21	ICD-NR	2.00	4.00	0.06	1.00
19	ICD-NR	2.00	4.00	<0.03	16.00
24	ICD-NR	2.00	4.00	0.06	2.00
26	ICD-R	2.00	1.00	0.03	4.00
28	ICD-NR	2.00	1.00	<0.03	2.00
30	ICD-R	4.00	2.00	0.03	4.00
31	ICD-NR	1.00	1.00	0.00	0.03
32	ICD-NR	1.00	0.50	0.06	0.50
34	ICD-NR	2.00	4.00	<0.03	8.00
33	ICD-NR	2.00	4.00	<0.03	16.00
44	ICD-NR	1.00	1.00	0.00	1.00
38	ICD-NR	1.00	1.00	0.06	2.00
39	ICD-NR	2.00	1.00	0.06	2.00
40	ICD-NR	2.00	2.00	<0.03	2.00
43	ICD-NR	1.00	0.25	<0.03	1.00
49	ICD-NR	2.00	1.00	<0.03	2.00
48	ICD-NR	4.00	1.00	0.06	16.00
51	ICD-R	2.00	2.00	2.00	4.00
52	ICD-NR	1.00	0.25	0.13	1.00
56	ICD-R	2.00	2.00	0.13	4.00

Continuación

Aislamiento	Grupo	VAN	MET	FDX	LIN
57	ICD-R	2.00	2.00	0.13	8.00
60	ICD-NR	4.00	2.00	<0.03	2.00
61	ICD-R	4.00	2.00	0.60	4.00
58	ICD-NR	2.00	4.00	<0.03	16.00
62	ICD-R	1.00	0.50	2.00	1.00
63	ICD-NR	2.00	4.00	<0.03	1.00
64	ICD-R	4.00	2.00	2.00	2.00
71	ICD-R	4.00	1.00	0.03	4.00
75	ICD-NR	2.00	0.50	0.06	2.00
65	ICD-NR	2.00	4.00	<0.03	16.00
77	ICD-NR	2.00	4.00	<0.03	8.00
79	ICD-NR	4.00	1.00	0.06	2.00
100	ICD-R	4.00	0.25	0.03	4.00
102	ICD-NR	2.00	2.00	<0.03	2.00
80	ICD-NR	0.50	1.00	<0.03	1.00
104	ICD-NR	2.00	1.00	<0.03	2.00
96	ICD-NR	2.00	1.00	<0.03	8.00
111	ICD-NR	1.00	2.00	0.06	2.00
101	ICD-NR	2.00	1.00	<0.03	8.00
175	ICD-NR	2.00	1.00	<0.03	2.00
228	ICD-NR	2.00	1.00	0.06	2.00
314	ICD-R	1.00	4.00	0.06	2.00
347	ICD-NR	4.00	2.00	0.06	8.00
348	ICD-NR	4.00	0.50	<0.03	2.00
200	ICD-NR	2.00	1.00	<0.03	2.00
204	ICD-NR	2.00	1.00	<0.03	2.00
209	ICD-NR	2.00	1.00	<0.03	16.00
219	ICD-NR	2.00	1.00	<0.03	2.00
356	ICD-NR	2.00	4.00	0.13	2.00
4	ICD-R	2.00	1.00	<0.03	4.00
306	ICD-NR	2.00	4.00	<0.03	8.00
311	ICD-NR	1.00	0.50	0.06	1.00
312	ICD-NR	2.00	4.00	0.06	2.00
15-006	ICD-R	2.00	2.00	<0.03	8.00
315	ICD-NR	2.00	4.00	0.13	2.00
320	ICD-NR	2.00	4.00	0.06	32.00
15-009	ICD-R	2.00	1.00	<0.03	8.00

Continuación

Aislamiento	Grupo	VAN	MET	FDX	LIN
15-011	ICD-R	1.00	1.00	0.06	1.00
15-049	ICD-R	4.00	2.00	0.06	4.00
15-063	ICD-R	4.00	1.00	2.00	4.00
54	ICD-R	2.00	1.00	<0.03	8.00
15-072	ICD-R	2.00	2.00	<0.03	32.00
15-105	ICD-R	2.00	1.00	<0.03	8.00
81	ICD-R	2.00	2.00	<0.03	8.00
153	ICD-R	1.00	2.00	<0.03	0.50
295	ICD-R	2.00	2.00	<0.03	8.00
15-004	ICD-R	2.00	1.00	<0.03	8.00
16-193	ICD-NR	2.00	2.00	<0.03	16.00
16-198	ICD-R	2.00	0.13	<0.03	8.00
16-196	ICD-NR	2.00	1.00	0.06	2.00
16-197	ICD-NR	1.00	0.50	0.06	0.50
16-200	ICD-NR	4.00	0.13	0.06	16.00
16-204	ICD-NR	2.00	4.00	<0.03	8.00
16-206	ICD-NR	1.00	0.13	0.06	2.00
16-207	ICD-R	2.00	0.13	0.06	8.00
16-209	ICD-NR	1.00	2.00	<0.03	2.00
15-085	ICD-R	2.00	1.00	<0.03	16.00
16-211A	ICD-NR	2.00	0.13	0.06	8.00
16-210	ICD-NR	2.00	0.50	<0.03	2.00
16-213	ICD-R	2.00	4.00	<0.03	2.00
16-211B	ICD-NR	1.00	0.13	<0.03	2.00
16-212	ICD-NR	1.00	1.00	<0.03	2.00
17-006	ICD-NR	2.00	2.00	0.06	2.00
17-002	ICD-NR	2.00	0.50	<0.03	2.00
17-003	ICD-NR	2.00	0.13	<0.03	16.00
17-008	ICD-R	2.00	4.00	<0.03	2.00
16-201	ICD-R	1.00	4.00	0.13	2.00
17-020	ICD-NR	2.00	2.00	<0.03	2.00
17-012	ICD-NR	2.00	4.00	<0.03	2.00
17-014	ICD-NR	1.00	4.00	<0.03	8.00
17-016	ICD-NR	2.00	2.00	<0.03	2.00
17-021	ICD-NR	2.00	2.00	0.06	8.00
17-022	ICD-NR	2.00	2.00	<0.03	8.00
17-009	ICD-R	4.00	4.00	<0.03	16.00

Continuación

Aislamiento	Grupo	VAN	MET	FDX	LIN
A4	ICD-R	4.00	2.00	0.06	1.00
A5	ICD-R	4.00	2.00	0.06	4.00

VAN: vancomicina; MET: metronidazol; FDX: fidaxomicina; LIN: linezolid. CMIs expresados en mg/L.

ANEXO IV

Concentraciones mínimas inhibitorias de biopelícula.

Aislamiento	Grupo	VAN	LZD
2	ICD-NR	64.00	128.00
3	ICD-NR	32.00	256.00
4	ICD-R	8.00	16.00
5	ICD-NR	16.00	256.00
6	ICD-R	64.00	32.00
7	ICD-NR	128.00	2.00
8	ICD-NR	256.00	128.00
9	ICD-R	16.00	256.00
10	ICD-R	256.00	64.00
11	ICD-NR	256.00	16.00
13	ICD-NR	256.00	256.00
14	ICD-NR	256.00	128.00
15	ICD-NR	8.00	256.00
16	ICD-NR	256.00	8.00
17	ICD-NR	256.00	256.00
19	ICD-NR	256.00	256.00
21	ICD-NR	256.00	16.00
24	ICD-NR	256.00	4.00
26	ICD-R	256.00	256.00
28	ICD-NR	256.00	64.00
30	ICD-R	256.00	256.00
31	ICD-NR	256.00	64.00
32	ICD-NR	256.00	256.00
33	ICD-NR	256.00	16.00
34	ICD-NR	16.00	128.00
38	ICD-NR	32.00	64.00
39	ICD-NR	256.00	256.00
40	ICD-NR	8.00	256.00
43	ICD-NR	256.00	64.00
44	ICD-NR	64.00	256.00
48	ICD-NR	256.00	32.00
49	ICD-NR	16.00	8.00
51	ICD-R	256.00	256.00
52	ICD-NR	16.00	256.00

Continuación

Aislamiento	Grupo	VAN	LZD
54	ICD-R	64.00	256.00
56	ICD-R	64.00	8.00
57	ICD-R	256.00	256.00
58	ICD-NR	256.00	32.00
60	ICD-NR	8.00	128.00
61	ICD-R	256.00	64.00
62	ICD-R	256.00	256.00
63	ICD-NR	256.00	64.00
64	ICD-R	256.00	128.00
65	ICD-NR	8.00	64.00
71	ICD-R	16.00	256.00
75	ICD-NR	256.00	64.00
77	ICD-NR	256.00	64.00
79	ICD-NR	256.00	128.00
80	ICD-NR	256.00	8.00
81	ICD-R	8.00	128.00
96	ICD-NR	256.00	32.00
100	ICD-R	256.00	128.00
101	ICD-NR	256.00	256.00
102	ICD-NR	256.00	16.00
104	ICD-NR	256.00	32.00
111	ICD-NR	64.00	64.00
153	ICD-R	16.00	256.00
175	ICD-NR	256.00	128.00
200	ICD-NR	8.00	256.00
204	ICD-NR	16.00	128.00
209	ICD-NR	256.00	256.00
219	ICD-NR	256.00	256.00
228	ICD-NR	32.00	128.00
295	ICD-R	256.00	128.00
306	ICD-NR	256.00	256.00
311	ICD-NR	256.00	256.00
312	ICD-NR	256.00	256.00
314	ICD-R	16.00	16.00
315	ICD-NR	64.00	32.00
320	ICD-NR	32.00	128.00
347	ICD-NR	32.00	256.00

Continuación

Aislamiento	Grupo	VAN	LZD
348	ICD-NR	64.00	256.00
356	ICD-NR	256.00	256.00
15-004	ICD-R	256.00	256.00
15-006	ICD-R	256.00	64.00
15-009	ICD-R	256.00	8.00
15-011	ICD-R	256.00	64.00
15-049	ICD-R	256.00	128.00
15-063	ICD-R	256.00	16.00
15-072	ICD-R	256.00	256.00
15-085	ICD-R	256.00	4.00
15-105	ICD-R	256.00	8.00
16-193	ICD-NR	2.00	128.00
16-196	ICD-NR	256.00	256.00
16-197	ICD-NR	32.00	64.00
16-198	ICD-R	2.00	256.00
16-200	ICD-NR	256.00	256.00
16-201	ICD-R	256.00	64.00
16-204	ICD-NR	256.00	256.00
16-206	ICD-NR	256.00	256.00
16-207	ICD-R	256.00	128.00
16-209	ICD-NR	16.00	64.00
16-210	ICD-NR	32.00	256.00
16-211A	ICD-NR	256.00	256.00
16-211B	ICD-NR	256.00	64.00
16-212	ICD-NR	8.00	256.00
16-213	ICD-R	32.00	256.00
17-002	ICD-NR	32.00	64.00
17-003	ICD-NR	32.00	128.00
17-006	ICD-NR	32.00	32.00
17-008	ICD-R	256.00	256.00
17-009	ICD-R	256.00	32.00
17-012	ICD-NR	256.00	256.00
17-014	ICD-NR	256.00	128.00
17-016	ICD-NR	256.00	32.00
17-020	ICD-NR	256.00	64.00
17-021	ICD-NR	64.00	64.00
17-022	ICD-NR	256.00	64.00

Continuación

Aislamiento	Grupo	VAN	LZD
A4	ICD-R	16.00	32.00
A5	ICD-R	256.00	64.00

VAN: vancomicina; LIN: linezolid. CMIBs expresados en mg/L.

ANEXO V

Producción de biopelícula con y sin microbiota y su clasificación de acuerdo al índice de biopelícula.

Aislamiento	Grupo	Clasificación	BP sin microbiota (IB)	BP con microbiota (IB)
2	ICD-NR	productor fuerte	1.38	35.91
3	ICD-NR	productor fuerte	2.62	20.89
4	ICD-R	productor fuerte	84.27	15.84
5	ICD-NR	no productor	0.18	NA
6	ICD-R	productor fuerte	39.57	15.33
7	ICD-NR	productor fuerte	32.41	371.43
8	ICD-NR	productor fuerte	12.08	11.98
9	ICD-R	productor fuerte	3.17	11.75
10	ICD-R	productor fuerte	1.32	206.38
11	ICD-NR	productor fuerte	4.24	16.60
13	ICD-NR	productor fuerte	3.38	17.36
14	ICD-NR	productor fuerte	87.42	25.35
15	ICD-NR	productor fuerte	8.45	3.39
16	ICD-NR	productor moderado	0.90	16.60
17	ICD-NR	productor fuerte	93.13	6.34
19	ICD-NR	productor fuerte	19.23	37.67
21	ICD-NR	productor fuerte	3.35	10.50
24	ICD-NR	productor fuerte	1.81	13.56
26	ICD-R	productor fuerte	94.94	9.81
28	ICD-NR	productor fuerte	1.83	11.10
30	ICD-R	productor fuerte	29.82	8.22
31	ICD-NR	productor fuerte	1.30	3.56
32	ICD-NR	productor fuerte	1.47	10.94
33	ICD-NR	productor fuerte	11.42	25.35
34	ICD-NR	productor fuerte	11.56	9.96
38	ICD-NR	productor fuerte	10.26	3.39
39	ICD-NR	productor fuerte	9.79	NC
40	ICD-NR	productor fuerte	2.82	10.59
43	ICD-NR	productor fuerte	1.34	3.78
44	ICD-NR	productor fuerte	10.73	4.97
48	ICD-NR	productor fuerte	3.64	14.73
49	ICD-NR	productor fuerte	10.34	5.57
51	ICD-R	productor fuerte	53.75	27.91

Continuación

Aislamiento	Grupo	Clasificación	BP sin microbiota (IB)	BP con microbiota (IB)
52	ICD-NR	productor fuerte	6.61	18.46
54	ICD-R	productor fuerte	15.15	11.10
56	ICD-R	productor fuerte	7.07	9.96
57	ICD-R	productor fuerte	9.88	3.39
58	ICD-NR	productor fuerte	3.19	6.34
60	ICD-NR	productor fuerte	9.42	22.80
61	ICD-R	productor moderado	1.08	20.32
62	ICD-R	productor moderado	1.03	9.47
63	ICD-NR	productor fuerte	4.52	9.34
64	ICD-R	productor fuerte	4.11	3.96
65	ICD-NR	productor fuerte	3.97	19.03
71	ICD-R	productor fuerte	28.06	23.45
75	ICD-NR	productor fuerte	1.56	17.86
77	ICD-NR	productor fuerte	7.91	11.10
79	ICD-NR	productor fuerte	11.16	10.76
80	ICD-NR	productor fuerte	2.14	NC
81	ICD-R	productor fuerte	2.35	18.66
96	ICD-NR	productor fuerte	3.45	73.34
100	ICD-R	productor fuerte	16.61	9.28
101	ICD-NR	productor fuerte	4.12	19.90
102	ICD-NR	productor fuerte	6.35	27.64
104	ICD-NR	productor fuerte	3.50	NC
111	ICD-NR	productor fuerte	66.79	20.30
153	ICD-R	productor débil	0.74	16.02
175	ICD-NR	productor fuerte	3.07	18.81
200	ICD-NR	productor fuerte	4.52	12.49
204	ICD-NR	productor fuerte	2.31	NC
209	ICD-NR	productor fuerte	22.67	14.59
219	ICD-NR	productor fuerte	1.27	11.00
228	ICD-NR	productor fuerte	11.47	NC
295	ICD-R	productor fuerte	38.95	13.04
306	ICD-NR	productor fuerte	1.91	8.57
311	ICD-NR	productor débil	0.50	2.39
312	ICD-NR	productor fuerte	4.12	19.90
314	ICD-R	productor fuerte	5.02	5.50
315	ICD-NR	productor fuerte	4.52	3.68

Continuación

Aislamiento	Grupo	Clasificación	BP sin microbiota (IB)	BP con microbiota (IB)
320	ICD-NR	productor fuerte	4.52	12.06
347	ICD-NR	productor fuerte	17.57	9.81
348	ICD-NR	no productor	0.20	NA
356	ICD-NR	productor fuerte	6.29	19.90
15-004	ICD-R	productor fuerte	7.28	15.66
15-006	ICD-R	productor fuerte	22.67	1.39
15-009	ICD-R	productor débil	0.42	3.50
15-011	ICD-R	productor fuerte	1.54	7.20
15-049	ICD-R	productor fuerte	3.97	5.00
15-063	ICD-R	productor fuerte	6.29	7.50
15-072	ICD-R	productor débil	0.88	5.84
15-085	ICD-R	productor fuerte	6.96	3.97
15-105	ICD-R	productor fuerte	9.56	9.25
16-193	ICD-NR	productor fuerte	7.84	NC
16-196	ICD-NR	productor débil	0.83	3.01
16-197	ICD-NR	productor fuerte	22.77	4.04
16-198	ICD-R	productor fuerte	2.20	NC
16-200	ICD-NR	productor fuerte	1.31	27.42
16-201	ICD-R	productor fuerte	38.19	NC
16-204	ICD-NR	productor fuerte	3.24	1.67
16-206	ICD-NR	productor fuerte	1.44	1.62
16-207	ICD-R	productor fuerte	2.19	68.60
16-209	ICD-NR	productor fuerte	6.45	2.53
16-210	ICD-NR	productor fuerte	1.40	37.25
16-211A	ICD-NR	productor fuerte	3.37	1.49
16-211B	ICD-NR	productor fuerte	2.82	44.68
16-212	ICD-NR	productor débil	0.89	4.04
16-213	ICD-R	productor fuerte	1.22	5.74
17-002	ICD-NR	productor moderado	1.09	5.31
17-003	ICD-NR	productor fuerte	2.09	1.20
17-006	ICD-NR	productor fuerte	10.55	8.49
17-008	ICD-R	productor fuerte	24.71	NC
17-009	ICD-R	productor fuerte	3.98	18.59
17-012	ICD-NR	productor fuerte	5.65	NC
17-014	ICD-NR	productor fuerte	20.37	56.41
17-016	ICD-NR	productor débil	0.85	1.60

Continuación

Aislamiento	Grupo	Clasificación	BP sin microbiota (IB)	BP con microbiota (IB)
17-020	ICD-NR	productor fuerte	3.14	42.48
17-021	ICD-NR	productor fuerte	7.95	38.34
17-022	ICD-NR	productor fuerte	7.11	2.32
A4	ICD-R	productor fuerte	10.70	42.48
A5	ICD-R	productor fuerte	9.32	29.11

IB: Índice de biopelícula y sus valores se encuentran expresados como la absorbancia a 595 nm. BP: biopelícula. NC: Aislamientos de *C. difficile* que no presentaron crecimiento en biopelícula con microbiota.

ANEXO VI

Cuantificación de esporas en biopelícula con y sin microbiota.

Aislamiento	Grupo	Esporas en BP sin microbiota	Esporas en BP con microbiota
2	ICD-NR	2.06E+04	2.00E+03
3	ICD-NR	7.50E+03	1.00E+03
4	ICD-R	7.50E+03	1.00E+05
6	ICD-R	2.75E+06	6.00E+05
7	ICD-NR	6.25E+04	3.00E+01
8	ICD-NR	2.00E+04	3.00E+05
9	ICD-R	8.25E+03	3.00E+04
10	ICD-R	6.00E+02	2.00E+01
11	ICD-NR	1.05E+05	2.00E+04
13	ICD-NR	1.00E+02	6.60E+02
14	ICD-NR	4.58E+04	1.50E+03
15	ICD-NR	2.83E+05	2.00E+05
16	ICD-NR	3.25E+04	3.00E+05
17	ICD-NR	1.01E+04	3.00E+05
19	ICD-NR	3.00E+04	2.00E+04
21	ICD-NR	5.00E+05	1.00E+04
24	ICD-NR	1.10E+03	1.20E+03
26	ICD-R	1.50E+06	1.00E+05
28	ICD-NR	5.00E+03	1.00E+06
30	ICD-R	6.88E+03	1.00E+04
31	ICD-NR	7.17E+04	2.00E+05
32	ICD-NR	1.00E+04	1.00E+05
33	ICD-NR	2.84E+04	1.00E+05
34	ICD-NR	1.00E+04	2.00E+04
38	ICD-NR	5.00E+04	1.00E+04
39	ICD-NR	1.00E+04	NC
40	ICD-NR	2.00E+05	1.00E+06
43	ICD-NR	4.75E+04	1.00E+05
44	ICD-NR	1.00E+04	1.00E+05
48	ICD-NR	7.00E+04	1.00E+04
49	ICD-NR	8.00E+03	1.00E+06
51	ICD-R	5.00E+02	4.00E+05
52	ICD-NR	1.00E+04	4.00E+02
54	ICD-R	1.00E+04	1.00E+04

Continuación

Aislamiento	Grupo	Esporas en BP sin microbiota	Esporas en BP con microbiota
56	ICD-R	2.10E+04	3.00E+03
57	ICD-R	3.00E+04	1.00E+04
58	ICD-NR	3.00E+04	1.00E+04
60	ICD-NR	2.40E+04	1.00E+01
61	ICD-R	6.00E+04	1.40E+04
62	ICD-R	8.50E+04	1.00E+02
63	ICD-NR	2.00E+04	4.00E+04
64	ICD-R	6.00E+04	1.20E+02
65	ICD-NR	3.50E+04	1.50E+05
71	ICD-R	7.50E+03	3.90E+03
75	ICD-NR	1.18E+04	2.00E+03
77	ICD-NR	1.00E+02	4.00E+06
79	ICD-NR	3.00E+04	7.00E+03
80	ICD-NR	2.50E+04	NC
81	ICD-R	2.00E+05	2.70E+02
96	ICD-NR	2.00E+03	1.50E+02
100	ICD-R	2.50E+02	1.00E+05
101	ICD-NR	1.42E+05	1.00E+05
102	ICD-NR	4.50E+03	8.00E+02
104	ICD-NR	7.25E+03	NC
111	ICD-NR	1.18E+03	3.00E+05
153	ICD-R	5.00E+04	1.13E+03
175	ICD-NR	5.00E+03	1.00E+02
200	ICD-NR	1.00E+04	9.00E+01
204	ICD-NR	2.00E+04	NC
209	ICD-NR	1.90E+03	1.00E+03
219	ICD-NR	5.25E+03	1.00E+05
228	ICD-NR	6.17E+05	NC
295	ICD-R	5.00E+02	1.15E+03
306	ICD-NR	1.00E+04	2.00E+04
311	ICD-NR	4.50E+03	7.00E+03
312	ICD-NR	2.00E+04	1.00E+02
314	ICD-R	3.00E+03	3.00E+01
315	ICD-NR	2.00E+04	8.00E+02
320	ICD-NR	3.40E+03	1.00E+06
347	ICD-NR	2.00E+05	2.00E+04

Continuación

Aislamiento	Grupo	Esporas en BP sin microbiota	Esporas en BP con microbiota
356	ICD-NR	4.63E+06	4.00E+03
15-004	ICD-R	1.11E+04	1.00E+03
15-006	ICD-R	1.50E+04	2.80E+02
15-009	ICD-R	2.00E+04	4.00E+03
15-011	ICD-R	5.00E+04	2.00E+04
15-049	ICD-R	6.20E+03	1.10E+03
15-063	ICD-R	8.33E+04	3.00E+01
15-072	ICD-R	1.75E+04	3.80E+02
15-085	ICD-R	1.00E+05	1.00E+02
15-105	ICD-R	2.20E+03	4.00E+02
16-193	ICD-NR	1.00E+02	NC
16-196	ICD-NR	3.00E+03	1.00E+06
16-197	ICD-NR	1.30E+04	1.50E+03
16-198	ICD-R	6.90E+03	NC
16-200	ICD-NR	1.00E+04	1.00E+04
16-201	ICD-R	4.00E+03	NC
16-204	ICD-NR	1.00E+04	2.00E+03
16-206	ICD-NR	5.38E+06	2.00E+03
16-207	ICD-R	1.80E+03	1.00E+04
16-209	ICD-NR	3.90E+03	1.50E+03
16-210	ICD-NR	6.25E+03	1.00E+04
16-211A	ICD-NR	2.50E+04	2.00E+04
16-211B	ICD-NR	5.05E+04	1.00E+05
16-212	ICD-NR	1.00E+05	1.00E+04
16-213	ICD-R	1.00E+04	2.60E+04
17-002	ICD-NR	3.00E+04	1.00E+04
17-003	ICD-NR	4.50E+03	2.20E+03
17-006	ICD-NR	2.00E+04	1.00E+04
17-008	ICD-R	1.25E+07	NC
17-009	ICD-R	4.38E+03	4.00E+03
17-012	ICD-NR	7.63E+04	NC
17-014	ICD-NR	4.50E+03	3.80E+02
17-016	ICD-NR	5.60E+03	1.00E+06
17-020	ICD-NR	4.00E+03	1.15E+03
17-021	ICD-NR	6.00E+05	1.00E+04
17-022	ICD-NR	1.00E+03	4.00E+02

Continuación

Aislamiento	Grupo	Esporas en BP sin microbiota	Esporas en BP con microbiota
A4	ICD-R	1.00E+02	3.30E+03
A5	ICD-R	5.00E+01	1.40E+03

Los valores de esporas corresponden a UFC por biopelícula. BP: biopelícula. NC: Aislamientos de *C. difficile* que no presentaron crecimiento en biopelícula con microbiota.

ANEXO VII

Expresión relativa (ER) de *sigH*, *spo0A*, *slpA*, *luxS*, *cwp84* y *agrD* de cada aislamiento.

Aislam.	<i>rrs</i>	<i>sigH</i>	ER	<i>rrs</i>	<i>spo0A</i>	ER	<i>rrs</i>	<i>slpA</i>	ER	<i>Rrs</i>	<i>luxS</i>	ER	<i>rrs</i>	<i>cwp84</i>	ER	<i>rrs</i>	<i>agrD</i>	ER
ATCC 9689	6.3	15.7	1	6.3	14.9	1	6.3	17.98	1	6.3	18.26	1	6.3	16.49	1	6.3	15.14	1
4	5.65	25	0.001	5.65	15.56	0.42	5.65	17.95	0.97	5.65	18.25	0.46	5.65	14.16	0.92	5.65	15.4	0.3
6	5.6	17.7	0.16	5.6	21.82	0.01	5.6	16.47	1.58	5.6	26.6	0.1	5.6	15.49	0.96	5.6	14.39	0.52
16	5.3	13.77	1.78	5.3	15.1	0.43	5.3	30.47	0	5.3	16.5	0.52	5.3	16.5	0.24	5.3	15.3	0.25
17	5.2	13.19	2.44	5.2	14.5	0.58	5.2	17.82	0.76	5.2	15.3	0.63	5.2	14	0.72	5.2	14.5	0.37
26	7.7	14.43	2.38	7.7	15.73	5.25	7.7	16	0.83	7.7	16.7	0.52	7.7	17	1.09	7.7	15.36	5.86
30	11.5	15.87	13.84	11.5	15.11	117.41	11.5	20.65	0.56	11.5	22	0.23	11.5	17.2	16.54	11.5	17.53	24.64
57	8.1	15.48	4.21	8.1	14.24	5.47	8.1	18.94	1.98	8.1	24.5	0.95	8.1	15	7.22	8.1	13.67	4.8
58	5.3	22.5	0.003	5.3	15.26	0.39	5.3	19.35	0.31	5.3	16.5	0.52	5.3	15.83	0.33	5.3	15.8	0.18
75	5.8	24.0	0.02	5.8	15.32	0.54	5.8	16.87	2.13	5.8	16.9	0.69	5.8	16	0.44	5.8	16.2	0.21
102	4.4	14.43	0.22	4.4	19.08	0.06	4.4	19.07	0.19	4.4	18.65	0.25	4.4	18.25	0.06	4.4	13.74	0.59
104	4.62	13.97	0.36	4.62	20.27	0.03	4.62	18.6	0.31	4.62	18.72	0.28	4.62	18.91	0.05	4.62	14	0.59
175	4.16	13.7	0.31	4.16	18.7	0.21	4.16	19.18	0.15	4.16	17.85	0.35	4.16	19.08	0.03	4.16	14	0.42
200	4.03	14.04	0.22	4.03	23.39	0.003	4.03	20.68	0.05	4.03	17.85	0.32	4.03	20.9	0.01	4.03	14.13	0.36
204	4.66	14.01	0.36	4.66	18.02	0.45	4.66	18.8	0.28	4.66	18.3	0.38	4.66	19	0.05	4.66	14.05	0.59
15-011	5.0	15	0.63	5.0	13.53	0.92	5.0	17.9	0.41	5.0	18.66	0.36	5.00	18	0.2	5.0	13.05	0.75
15-049	9.83	14.34	11.65	9.83	14.58	49.24	9.83	17.4	1.5	9.83	20.15	0.24	9.83	19.25	1.77	9.83	17	10.2
15-063	10.33	14.82	12.09	10.33	14.45	76.36	10.33	17.9	1.54	10.33	18.8	0.84	10.33	17	7.15	10.33	15.24	41.49
15-072	12.5	16.69	16.37	12.5	15.55	183.13	12.5	21	0.91	12.5	23.71	0.15	12.5	18.67	4.3	12.5	18.46	29.05
15-085	10.2	15	9.76	10.2	14.2	81.21	10.2	18.5	0.94	10.2	18.5	0.94	10.2	17.74	4.63	10.2	15.4	34.37
16-198	5.75	17.43	0.21	5.75	15.23	0.55	5.75	18.8	0.4	5.75	16.31	1.02	5.75	15.99	0.85	5.75	14.62	0.51
16-201	6.37	13.47	4.68	6.37	14	1.84	6.37	18.4	0.81	6.37	24	0.01	6.37	14.45	2.69	6.37	13	2.07

Los valores se encuentran expresados como la media de las ct. Gen endógeno normalizador: *rrs* (RNA 16S).

ANEXO VIII

Constancias de presentación en congresos y premios.

- **Congreso Nacional de Infectología y Microbiología Clínica, AMIMC. 2017, Puebla.**

Título: “Características moleculares y susceptibilidad antimicrobiana de *C. difficile* aislado de pacientes con infección inicial-resuelta e infección recurrente”

Premio 3er. Lugar

Modalidad cartel y sesión de Discusión de Trabajos Orales de Microbiología

- **Congreso Nacional de Infectología y Microbiología Clínica, AMIMC. 2018- Mérida**

Título: “Factores de virulencia de *C. difficile* asociados a la infección recurrente”

Premio 1er. Lugar.

Modalidad cartel

- **ID-Week, Infectious Diseases Society of America (IDSA). 2018- San Francisco, California**

Título: “Enhanced Sporulation and Vancomycin Resistance Associated with *Clostridium difficile* from Recurrent Infections”

Modalidad cartel

- **Congreso Nacional de Infectología y Microbiología Clínica, AMIMC. 2019 – Guanajuato**

Título: “Sobreexpresión de genes reguladores de esporulación y biopelícula en infecciones por *C. difficile* recurrente”

Premio 1er. Lugar,

Modalidad cartel



Asociación Mexicana de Infectología
y Microbiología Clínica, A.C.

Otorga la presente

CONSTANCIA

por su presentación de Trabajo Libre

Cartel **D20**

Título FACTORES DE VIRULENCIA DE CLOSTRIDIUM DIFFICILE ASOCIADOS A LA INFECCIÓN RECURRENTE

Autores

TIJERINA-RODRIGUEZ L1, MARTINEZ-MELENDEZ A1, MORFIN-OTERO R2, VILLARREAL-TREVIÑO L1, CAMACHO-ORTIZ A3, RODRIGUEZ-NORIEGA E2, BAINES-S4, **GARZA-GONZALEZ E5, (1) FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS UANL, MÉXICO; (2) HOSPITAL CIVIL DE GUADALAJARA FRAY ANTONIO ALCALDE, MÉXICO; (3) HOSPITAL UNIVERSITARIO DR JOSÉ ELEUTERIO GONZÁLEZ, MÉXICO; (4) UNIVERSITY OF HERTFORDSHIRE, REINO UNIDO; (5) HOSPITAL UNIVERSITARIO DR JOSÉ ELEUTERIO GONZALEZ, MÉXICO.

Durante el **XLIII Congreso Nacional de Infectología y Microbiología Clínica** del 23 al 27 de Mayo del 2018 en el Centro Internacional de Congresos de Yucatán, Mérida, Yucatán, México.

Noris M. Pavía Ruz.

Dra. Noris Marlene Pavía Ruz
Presidente AMIMC A.C.

Dra. Patricia Cornejo Juárez
Secretario Académico

October 3-7 • San Francisco, CA • www.idweek.org



Certificate of Attendance

Date: October 7, 2018

This is to certify that Laura Tijerina attended IDWeek 2018™, held October 3 - 7, 2018 in San Francisco, CA, USA.

Ashley Cavell
Scientific Coordinator, Scientific Program



Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica, A.C.

Otorga la presente

Constancia

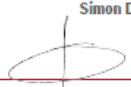
a

LAURA ESTHER TIJERINA RODRÍGUEZ

Por haber participado como PONENTE con el trabajo titulado "SOBREEXPRESIÓN DE GENES REGULADORES DE ESPORULACIÓN Y BIOPELÍCULA EN INFECCIONES POR CLOSTRIDIODES DIFFICILE RECURRENTE." dentro de la sesión de carteles, durante el XLIV CONGRESO NACIONAL DE INFECTOLOGÍA Y MICROBIOLOGÍA CLÍNICA celebrado en León, Guanajuato, México, del 22 al 25 de mayo de 2019.

Autores:

Laura Esther Tijerina Rodríguez, Rayo Morfín Otero, Licet Villarreal Treviño, Adrián Camacho Ortiz, Eduardo Rodríguez Noriega, Simon D. D. Baines, Elvira Garza González



Dr. José Juan Donís Hernández
Presidente de la AMIMC A.C.



Dra. Patricia Comejo Juárez
Secretaría Académica, AMIMC A.C.



ASOCIACIÓN MEXICANA DE INFECTOLOGÍA Y
MICROBIOLOGÍA CLÍNICA, A.C.

Ciudad de México, Lunes 12 de junio 2017

MESA DIRECTIVA

Presidente

Dra. Noris Marlene Pavía Ruz

Vicepresidente

Dr. José Juan Donis Hernández

Secretario General

Dr. Esteban González Díaz

Secretario Académico

Dra. Patricia Cornejo Juárez

Tesorero

Dra. Claudia del Carmen López
Enríquez

Estimado (a) Dra. Laura Tijerina Rodriguez

Considerando que su trabajo titulado "**Características moleculares y susceptibilidad antimicrobiana de Clostridium difficile aislado de pacientes con infección inicial-resuelta e infección recurrente**" presentado en el XLII Congreso de la Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica, A.C. en Puebla, fue acreedor al premio de Tercer Lugar en la Categoría A-Microbiología Clínica, lo invitamos a que envíe el resumen en extenso para su publicación en la revista de la Asociación.

Esto permitirá la difusión de su excelente trabajo.

Esperando contar con su apoyo, le enviamos un cordial saludo.

VOCALES

Microbiología

QFB. Fernando Tuz Dzib

VIH

Dra. Brenda Crabtree MD

Infecciones Nosocomiales

Dra. Alethse de la Torre Rosas

Antibióticos

Dr. Alfredo Ponce de León

Garduño

Educación Continua

Dra. Rita Delia Díaz Ramos

Salud Pública

Dr. Hugo López-Gatell Ramírez

Dra. Noris Pavía Ruz
Presidenta AMIMC AC

COMITÉ EJECUTIVO

Dra. Celia M. Alpuche Aranda

Dr. José Sifuentes Osornio

Dr. Eduardo Rodríguez Noriega

Dr. Guillermo Ruiz-Palacios

Dr. José I. Santos Preciado

Dr. Fortino Solórzano Santos

Revista de Infectología y

Microbiología Clínica

Dr. Fortino Solórzano Santos

Dra. Patricia Cornejo
Secretaria Académica

Dr. Fortino Solórzano

Editor en jefe de la Revista

Oficina Administrativa:

Tel./Fax: 90 00 09 01

Center

Pág. Web: www.amimc.org.mx

38

E-mail: amimc.ac@gmail.com

World Trade

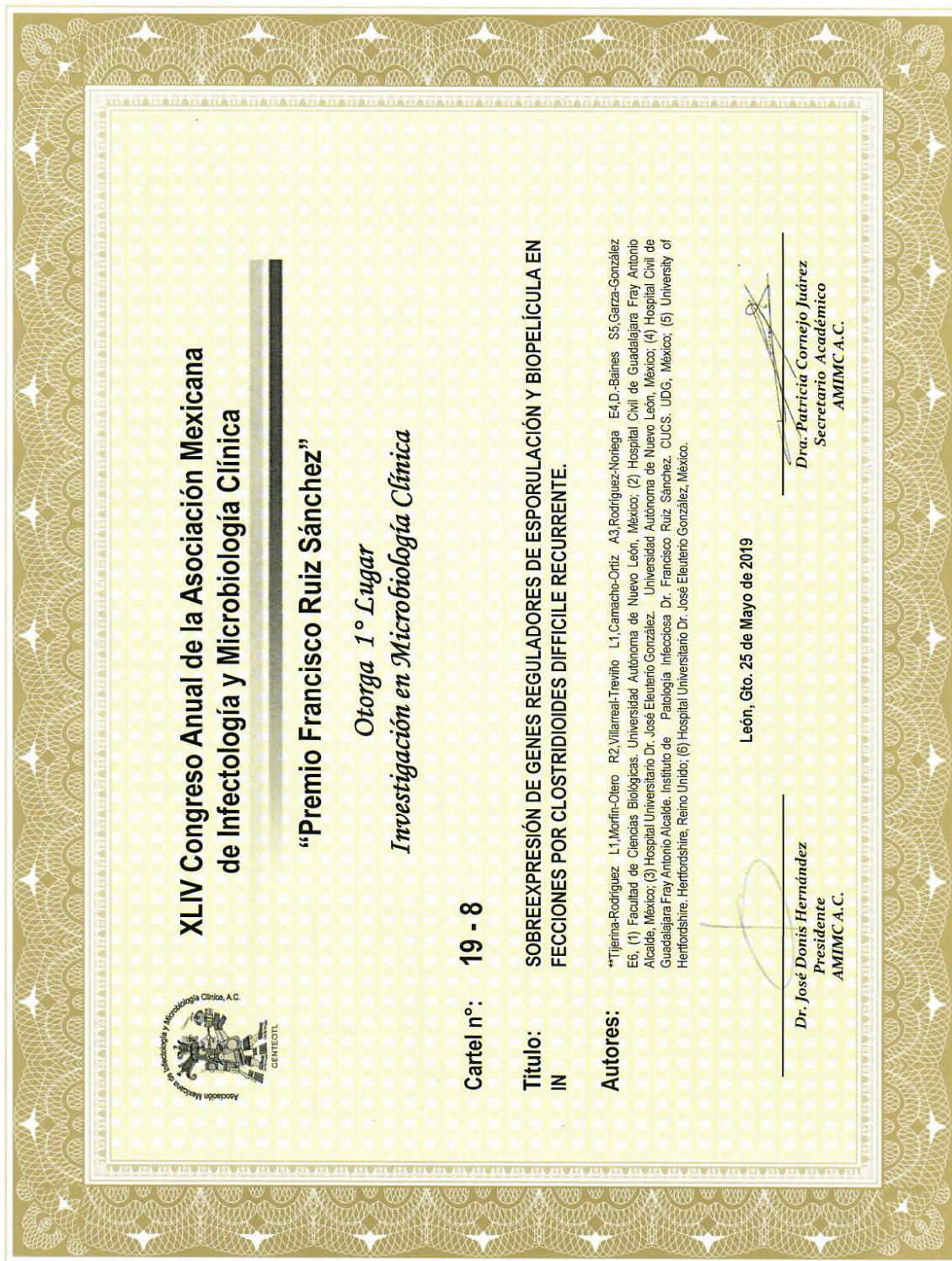
Montecito No.

Piso 24 Oficina 20 y37
Col. Nápoles, Del. Benito Juárez
C.P. 03810, México, D.F.

Premio Jesús Kumate, 2018



Premio Francisco Ruiz Sánchez, 2019



XLIV Congreso Anual de la Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica

“Premio Francisco Ruiz Sánchez”

Otorga 1º Lugar

Investigación en Microbiología Clínica

Cartel n°: 19 - 8

Título: SOBREEXPRESIÓN DE GENES REGULADORES DE ESPORULACIÓN Y BIOPELÍCULA EN INFECCIONES POR CLOSTRIDIOS DIFFICILE RECURRENTE.

Autores: *Tijerina-Rodríguez L1, Morfin-Otero R2, Villarreal-Treviño L1, Camacho-Ortiz A3, Rodríguez-Noriega E4, D.-Baines S5, Garza-González E6, (1) Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, México; (2) Hospital Civil de Guadaluajara Fray Antonio Alcalde, México; (3) Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González, Universidad Autónoma de Nuevo León, México; (4) Hospital Civil de Guadaluajara Fray Antonio Alcalde, Instituto de Patología Infecciosa Dr. Francisco Ruiz Sánchez, CUCS, JDG, México; (5) University of Hertfordshire, Hertfordshire, Reino Unido; (6) Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González, México.

León, Gto. 25 de Mayo de 2019

Dr. José Donis Hernández
Presidente
AMIMC A.C.

Dra. Patricia Cornejo Juárez
Secretario Académico
AMIMC A.C.

ANEXO IX

ARTÍCULOS

1. Artículos publicados

- **Título:** High sporulation and overexpression of virulence factors in biofilms and reduced susceptibility to vancomycin and linezolid in recurrent *Clostridium* [*Clostridioides*] *difficile* infection isolates.

Revista: Plos One, 2019

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

Revista: Microbial Drug Resistance, 2017

2. Artículos enviados

- **Título:** Clinical characteristics associated with the severity of *Clostridium difficile* infection in a tertiary teaching hospital from Mexico.

Revista: Biomedical Journal

Estatus: Enviado en Noviembre 2018, respuesta a las primeras observaciones y actualmente en revisión.

- **Título:** Virulence factors of *Clostridioides* [*Clostridium*] *difficile* linked to recurrent infections

Revista: Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology

Estatus: Enviado en Julio, 2019, actualmente en revisión.

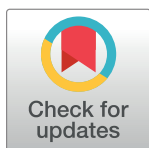
RESEARCH ARTICLE

High sporulation and overexpression of virulence factors in biofilms and reduced susceptibility to vancomycin and linezolid in recurrent *Clostridium* [*Clostridioides*] *difficile* infection isolates

Laura Tijerina-Rodríguez¹, Licet Villarreal-Treviño¹, Simon D. Baines², Rayo Morfín-Otero³, Adrián Camacho-Ortíz⁴, Samantha Flores-Treviño⁴, Héctor Maldonado-Garza⁴, Eduardo Rodríguez-Noriega³, Elvira Garza-González^{4*}

1 Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Mexico, **2** Department of Biological and Environmental Sciences, School of Life and Medical Sciences, University of Hertfordshire, Hatfield, United Kingdom, **3** Instituto de Patología Infecciosa y Experimental, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara, Hospital Civil de Guadalajara "Fray Antonio Alcalde", Guadalajara, Mexico, **4** Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González", Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Mexico

* elvira_garza_gzz@yahoo.com



OPEN ACCESS

Citation: Tijerina-Rodríguez L, Villarreal-Treviño L, Baines SD, Morfín-Otero R, Camacho-Ortíz A, Flores-Treviño S, et al. (2019) High sporulation and overexpression of virulence factors in biofilms and reduced susceptibility to vancomycin and linezolid in recurrent *Clostridium* [*Clostridioides*] *difficile* infection isolates. PLoS ONE 14(7): e0220671. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220671>

Editor: Yung-Fu Chang, Cornell University, UNITED STATES

Received: May 30, 2019

Accepted: July 20, 2019

Published: July 31, 2019

Peer Review History: PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220671>

Copyright: © 2019 Tijerina-Rodríguez et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Abstract

Clostridium [*Clostridioides*] *difficile* infection (CDI) is one of the leading causes of diarrhea associated with medical care worldwide, and up to 60% of patients with CDI can develop a recurrent infection (R-CDI). A multi-species microbiota biofilm model of *C. difficile* was designed to evaluate the differences in the production of biofilms, sporulation, susceptibility to drugs, expression of sporulating (*sigH*, *spo0A*), quorum sensing (*agrD*₁, and *luxS*), and adhesion-associated (*slpA* and *cwp84*) pathway genes between selected *C. difficile* isolates from R-CDI and non-recurrent patients (NR-CDI). We obtained 102 *C. difficile* isolates from 254 patients with confirmed CDI (66 from NR-CDI and 36 from R-CDI). Most of the isolates were biofilm producers, and most of the strains were ribotype 027 (81.374%, 83/102). Most *C. difficile* isolates were producers of biofilm (100/102), and most were strongly adherent. Sporulation was higher in the R-CDI than in the NR-CDI isolates ($p = 0.015$). The isolates from R-CDI patients more frequently demonstrated reduced susceptibility to vancomycin than isolates of NR-CDI patients (27.78% [10/36] and 9.09% [6/66], respectively, $p = 0.013$). The minimum inhibitory concentrations for vancomycin and linezolid against biofilms (BMIC) were up to 100 times and 20 times higher, respectively, than the corresponding planktonic MICs. Expression of *sigH*, *spo0A*, *cwp84*, and *agrD*₁ was higher in R-CDI than in NR-CDI isolates. Most of the *C. difficile* isolates were producers of biofilms with no correlation with the ribotype. Sporulation was greater in R-CDI than in NR-CDI isolates in the biofilm model of *C. difficile*. The R-CDI isolates more frequently demonstrated reduced susceptibility to vancomycin and linezolid than the NR-CDI isolates in both planktonic cells and biofilm isolates. A higher expression of sporulating pathway (*sigH*, *spo0A*), quorum sensing (*agrD*₁),

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was partially supported by Mexico's National Council for Science and Technology, CONACYT, grant 284042. The funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

and adhesion-associated (*cwp84*) genes was found in R-CDI than in NR-CDI isolates. All of these factors can have effect on the recurrence of the infection.

Introduction

Clostridium [*Clostridioides*] *difficile* is one of the leading causes of healthcare-associated diarrhea worldwide. Since 2011, cases of *C. difficile* infection (CDI) have increased in the United States, with 453,000 infections and 29,000 deaths [1].

An estimated 20–35% of patients with CDI can develop a recurrent infection (R-CDI) within eight weeks of the first episode, with an incidence of 1,846–37,620 cases/year [2]. The development of R-CDI has been associated with the germination of spores of the strain that produced the initial infection in the colon or with the acquisition of a new strain [3–5].

The pathogenicity of chronic and recurrent infections has been associated with the production of biofilm in some bacterial species [6], and *C. difficile* has been shown to produce organized biofilm communities on abiotic surfaces *in vitro* [7–9]. Furthermore, *C. difficile* has shown to produce biofilms in the presence of other bacteria such as *Finnegoldia magna* *in vitro* and participate in complex gut microbiota biofilms *in vitro* and during infection *in vivo* in a mouse model [10, 11]. Such biofilm formation could protect bacteria from cellular immune responses associated with toxin production and from antibiotics used for the treatment of CDI [10].

C. difficile spores have been found within the biofilms in a simulated chemostat gut model [11, 12], suggesting that the accumulation of spores within the biofilm of *C. difficile* could play a role in the development of R-CDI [13]. Lower spore germination rates have been reported in *C. difficile* biofilms than in vegetative cultures [14, 15], which may affect the persistence of infection.

The development of biofilms has been associated with the ability of bacteria to resist antimicrobial agents because they act as a physical barrier and decrease the effective concentration of antimicrobials [8, 10]. Indeed, the biofilms of *C. difficile* have shown 100 times greater resistance to metronidazole and 10 times greater resistance to vancomycin than cells cultured in liquid media [14].

Several factors have been described to have a key role in the formation of *C. difficile* biofilm, such as surface factors like S-layer protein, SlpA (encoded by *slpA*), the cell wall protein Cwp84 (encoded by *cwp84*), and the putative quorum sensing regulator LuxS (encoded by *luxS*) [8, 10, 16]. In addition, the master regulator of sporulation, Spo0A, has shown to determine the biofilm-producing phenotype [7, 14]. Recently, the sigma factor of sporulation, SigH, and the *agr* quorum sensing system, have been shown to regulate metabolism and virulence potential in *C. difficile* [17–20]. Nevertheless, their contributory role in R-CDI development remains unknown.

Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of biofilm production in a range of *C. difficile* ribotypes, their sporulation, antimicrobial susceptibilities, and expression of genes involved in sporulation and biofilm formation in isolates from recurrent and non-recurrent CDI patients.

Material and methods

Setting

Patients were recruited for this study who were treated at the following two hospitals in Mexico: The Civil Hospital of Guadalajara, "Fray Antonio Alcalde" a tertiary hospital with

1000 beds in Guadalajara; and the University Hospital "Dr. José Eleuterio González," a tertiary teaching hospital with 500 beds in Monterrey.

Ethics statement

The local ethics committee (Comité de Ética en Investigación del Antiguo Hospital Civil de Guadalajara "Fray Antonio Alcalde," Jalisco, Mexico) approved this study with reference number 047/16. Informed consent was waived by the Ethics Committee because no intervention was involved and no patients identifying information was included.

Study population, CDI diagnosis, and classification of CDI

Patients with unexplained diarrhea (≥ 3 unformed stools, Bristol scale 5–7) within 24 h were included. For the diagnosis of CDI, fecal samples were collected, and *C. difficile* was investigated by real-time PCR (Cepheid Xpert *C. difficile*/Epi test, Cepheid, Sunnyvale CA). Patients were defined with CDI when patients were diarrheal and PCR was positive.

R-CDI was defined by the reappearance of diarrhea associated with CDI within eight weeks after the completion of antibiotic therapy or the resolution of the initial episode [21]. CDI was classified as NR-CDI when no new episode occurred within eight weeks. Data collected from patients with R-CDI and NR-CDI included epidemiological and clinical data, prior antibiotic therapy, and treatment for CDI. The study was reviewed and approved by the Local Ethics Committee (Approval: 047/16).

Culture of *C. difficile* and typing of isolates

Fecal specimens were cultured on *C. difficile* agar (Neogen Corporation, MI) with cefoxitin (16 mg/L) and incubated in an anaerobic chamber (10% CO₂, 10% H₂, and 80% N₂) at 37°C for 48 h. Isolates were identified by polymerase chain reaction (PCR) with amplification of the triose phosphate isomerase (*tpi*) gene [22] and by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). All isolates were stored at –80°C. The *tcdA*, *tcdB*, *cdtA*, and *cdtB* genes were amplified using a multiplex PCR method [22], and the ribotyping-PCR was performed as previously described [23].

Selected isolates were subjected to ribotyping by capillary electrophoresis at the *C. difficile* Ribotyping Network Reference Laboratory (CDRN) at Leeds Teaching Hospitals NHS Trust (Leeds, United Kingdom).

C. difficile biofilm model

The biofilm of *C. difficile* formation was conducted as reported previously with some modifications. [7, 24] Briefly, each isolate was cultured in brain heart infusion (BHI) broth supplemented with 0.5% yeast extract and 0.1% L-cysteine (BHIS) in 96-well microtiter plates and incubated in anaerobic conditions at 37°C for 7 days. The planktonic cells were removed, and absorbance of planktonic cultures was read at 590 nm using a microtiter plate spectrometer iMarK (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The biofilm was washed with sterile phosphate-buffered saline (PBS) (200 μ l), fixed with 2% glutaraldehyde, and washed again with PBS. Then, 1% crystal violet was added and the biofilm was washed six more times with sterile water and destained with 30% acetic acid. The optical density was read at 590 nm. The adherence index (AI) was calculated, and the isolates were classified as strong adherents (AI > 1.20), moderate adherents (0.90 < AI < 1.20), weak adherents (AI between 0.2 and 0.90) and non-adherents (AI < 0.2) [25]. The assays were performed in triplicate, and only the results with a variation coefficient greater than 20% were accepted.

Microbiota–*C. difficile* biofilm model

For this study, we designed a biofilm model containing *C. difficile* and species from the intestinal microbiota (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *E. faecium*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, and *Lactobacillus acidophilus* strains obtained from clinical specimens). Each strain was cultured in BHIS at 37°C in an anaerobic chamber for 24–48 h and subsequently diluted 1:10 in BHIS broth. A 200- μ l mixture of microbiota and *C. difficile* (1:1:1:1:1 of each species) were added to each well of a microtiter plate, and the plates were incubated in an anaerobic chamber at 37°C for 7 days. The determination of the biofilm was carried out according to the biofilm model of *C. difficile* only.

Strains ATCC BAA-1805 (ribotype 027, strong adherent) and ATCC 9689 (ribotype 001, weak adherent) were used as controls in the biofilm assays.

Antimicrobial susceptibility testing

Antimicrobial susceptibilities were determined by the agar dilution method in selected isolates [26]. Antibiotics used to treat CDI infections, as well as those associated with the development of CDI, were included. The minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined for metronidazole (ICN Biomedical, Costa Mesa, CA), vancomycin, linezolid, ciprofloxacin, moxifloxacin, erythromycin, clindamycin, rifampicin, and tetracycline (Sigma-Aldrich). The antimicrobial diluents used and the ranges tested were recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2019, M100-S28). An overnight culture in Schaedler broth (Neogen Corporation) of each isolate was inoculated using a multipoint inoculator (10^4 colony-forming units (CFU)/spot) on Wilkins-Chalgren agar (Neogen Corporation) [27]. The ATCC 700057 (ribotype 038) was used as a control strain.

Resistance breakpoints were defined according to the CLSI guidelines as follows: moxifloxacin and clindamycin ≥ 8 mg/L, tetracycline ≥ 16 mg/L, metronidazole ≥ 32 mg/L, (CLSI, 2019). The breakpoint for vancomycin was defined according to the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, 2019) as greater than 2 mg/L. For antimicrobial agents of which no standard breakpoints to *C. difficile* have yet to be defined, breakpoints were considered as follows: erythromycin ≥ 8 mg/L (CLSI, 2013), ciprofloxacin, ≥ 8 mg/L, [28] linezolid ≥ 16 mg/L [29], and rifampicin ≥ 32 mg/L [30].

Biofilm minimum inhibitory concentration

The BMIC was determined for vancomycin and linezolid. Briefly, the planktonic phase of a 7-day-old biofilm was removed, and the antibiotics were prepared in fresh BHIS. Each concentration (from 512 mg/L to 0.5 mg/L) was aliquoted into microtiter plates (one per concentration), and 200 μ l per well were added. The biofilm was resuspended, and the plates were incubated at 37°C for 48 h in anaerobiosis.

The BMIC was defined as the lowest concentration of an antimicrobial that prevents growth. The ATCC 700057 *C. difficile* strain (ribotype 038) was used as a control.

Spore count in the biofilm

The 7-day-old biofilm was disrupted with a pipette and resuspended in 100 μ l PBS. Serial ten-fold dilutions (10^{-1} – 10^{-7}) were incubated at 65°C for 20 min to kill the vegetative cells. Both untreated and heat-treated suspensions were streaked on *Clostridium difficile* agar (Neogen Corporation, MI, USA) and incubated at 37°C for 48 h in anaerobic conditions. Total viable cells and spore counts were determined as CFU/biofilm.

Quantitative RT-PCR for *spo0A*, *sigH*, *slpA*, *cwp84*, *agrD₁*, and *luxS*

Twenty selected strains (10 from R-CDI patients and 10 from NR-CDI patients) were analyzed. The biofilms incubated for 48 h were washed twice, then the pellet was resuspended in DEPC water (200 μ l) and treated with lysozyme (10 mg/ml) (Bio-basic, Ontario, Canada) and proteinase K (Bio-basic). Total RNA was isolated using the Qiagen QIAamp DSP Viral RNA mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany). The quantity and quality of the RNA were assessed using a NanoDrop spectrophotometer. The relative quantification of the expression of the RNA transcripts of the *spo0A*, *sigH*, *slpA*, *cwp84*, *agrD₁*, and *luxS* genes normalized to 16S rRNA (*rrs*) was analyzed using the SuperScript III Platinum One-Step kit (Invitrogen, CA, USA).

Standard curves were generated using 5-fold dilutions of ATCC 9689 RNA for each gene to determine the efficiency of the reactions. RNA and diethyl pyrocarbonate (DEPC) water controls were also included. The real-time RT-PCRs were performed in two biological samples in duplicate; 200 ng RNA and 0.5 μ l specific primers at 100 nM (listed on [Table 1](#)) in a 25- μ L reaction volume were used. The Smart Cycler real-time PCR system (Cepheid) was used with cycling conditions as follows: 94°C for 8 min, then 45 cycles of 94°C for 30 s; 60°C for *spo0A*, *sigH* and *cwp84*; 54°C for *slpA*, *agrD₁* and 30 s for *luxS* and an extension cycle of 72°C for 25 s. Melting curves were determined to assure that only the expected PCR products had been generated. Relative expression ≥ 3 was classified as overexpression. Data were normalized and analyzed using the method described by Chang *et al.*, and the ATCC 9689 was used as a calibrator [31].

Statistical analysis

Reduced susceptibility frequencies from planktonic and biofilm R-CDI cultures were compared with NR-CDI cultures using Pearson's chi-square test and Fisher's Exact test.

Differences in relative expression ratios mean of biofilm cultures from R-CDI and NR-CDI were analyzed using Student's t-test. Non-parametric data were analyzed using the Mann-Whitney test and Spearman rank correlation test.

All statistical analysis were performed using the SPSS software package. A *p* value less than 0.05 was considered to be statistically significant.

Results

Study population

In total, 254 patients with CDI (35.29% female and 64.70% male; age range, 15–85) were confirmed by PCR, with 102 isolates of *C. difficile* recovered. Patients with R-CDI had more significant exposure to antibiotics before CDI ($p = 0.037$) than patients with NR-CDI. Fluoroquinolones and vancomycin were more frequently used in patients with NR-CDI than in those with R-CDI ($p = 0.000$ and 0.024 , respectively). Cephalosporins were more frequently used in patients with R-CDI than in NR-CDI ($p = 0.048$) ([Table 2](#)).

Culture and ribotyping

Sixty-six isolates (64.70%) of patients with NR-CDI and 36 (35.29%) of patients with R-CDI were obtained. Most of the isolates were found to be ribotype 027 (83/102, 81.37%). The other isolates were found to be ribotypes 003 and 002 (3/102, 2.94% each); 001, 014, 078, 220, and 076 (2/102, 1.96% each one); and 353 (1/102, 0.98%) ([Table 3](#)). No significant differences in ribotype distribution between the R-CDI and NR-CDI groups was detected ($p = 0.476$).

Table 1. Primer pairs used to amplify the genes studied by real-time RT-PCR.

Target gene	5' primer	3' primer	Source
<i>rrs</i>	GGGAGACTTGAGTGCAGGAG	GTGCTCAGCGTCAGTTACA	[43]
<i>spoA</i>	CTCAAAGCGCAATAAAATCTAGGAGC	TTGAGTCTCTTGAAC TGGTCTAGG	[44]
<i>sigH</i>	GTTGGTAGCAAAAAGAAAAAGTTATGAG	GTACTCTAGTGCTATTTTATCCCCTTAC	[45]
<i>slpA</i>	AATGATAAAGCATTTGTAGTTGGTG	TATTGGAGTAGCATCTCCATC	[43]
<i>cwp84</i>	TGGGCAACTGGTGGAAAATA	TAGTTGCACCTTGTGCCTCA	[43]
<i>luxS</i>	GTGACTTGATGGAGTAAAGGGAGA	TTCTACATCCCATTGGAGATAAGTC	[46]
<i>agrDI</i>	TTTGCTAGCTCATTTGGCACTT	GATTGCTGATTTCTTTGGGTACTT	Primer3 software

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220671.t001>

C. difficile biofilm sporulation

In the *C. difficile* biofilm model, the majority of *C. difficile* isolates were producers of biofilm (100/102), with 80.55% of R-CDI isolates and 90.90% of NR-CDI isolates being strongly adherent. No differences were detected in biofilm production among the isolates of R-CDI and NR-CDI (AIs geometric mean [GM], 53.87 and 54.06, respectively; $p = 0.579$).

Sporulation was higher in R-CDI than in NR-CDI isolates (5 log₁₀ CFU/biofilm vs. 3.85 log₁₀ CFU/biofilm; $p = 0.015$).

C. difficile–microbiota biofilm and sporulation

In the biofilm of *C. difficile*–microbiota, no difference was detected in biofilm production among the isolates of R-CDI and NR-CDI (AIs GM, 33.04 and 32.89, respectively; $p = 0.677$).

Table 2. Clinical characteristics of patients with R-CDI and NR-CDI.

	R-CDI (n = 23)	NR-CDI (n = 31)	p value
Hospitalization			
Length of stay (mean days, range)	29.55 (4–124)	20.86 (4–59)	0.181
Intensive care unit, n (%)	6 (26.09)	10 (32.26)	0.427
Length of stay in ICU (mean days, range)	14.77 (2–48)	12.10 (2–48)	0.460
Prior antibiotics			
Any antibiotic, n (%)	30 (96.77)	22 (95.65)	0.675
Length of exposure (mean days, range)	21.48 (1–100)	13.52 (1–52)	0.132
No. of antibiotics (mean)	3.65	2.71	0.037*
Cephalosporins	12 (54.54)	8 (27.59)	0.048*
Clindamycin	18 (81.82)	21 (72.41)	0.329
Macrolides	21 (95.45)	27 (91.10)	0.605
Fluoroquinolones	10 (45.45)	27 (91.10)	0.000*
Vancomycin	9 (40.91)	21 (72.41)	0.024*
Metronidazole	19 (86.36)	25 (86.21)	0.657
Carbapenems	14 (63.64)	17 (58.62)	0.472
CDI treatment			
Vancomycin	19 (86.36)	24 (80.00)	0.490
Metronidazole	13 (59.09)	19 (63.33)	0.415
Metronidazole/vancomycin	10 (45.45)	16 (56.33)	0.390

Data are no. (%) of patients, unless otherwise noted.

*Significant difference p value <0.05

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220671.t002>

Table 3. Ribotype distribution between R-CDI and NR-CDI strains.

	Genotype	PCR-Ribotype (n)
R-CDI (n = 36)	<i>tcdA</i> ⁺ , <i>tcdB</i> ⁺ , <i>tcdC</i> Δ18+, <i>cdtA</i> ⁺ / <i>cdtB</i> ⁺	027 (30)
	<i>tcdA</i> ⁺ , <i>tcdB</i> ⁺ , <i>tcdC</i> Δ18–, <i>cdtA</i> ⁺ / <i>cdtB</i> ⁺	003 (1), 001 (1), 076 (1), NT (2)
	<i>tcdA</i> ⁺ , <i>tcdB</i> ⁺ , <i>tcdC</i> Δ18–, <i>cdtA</i> ⁺ / <i>cdtB</i> ⁺	353 (1)
NR-CDI (n = 66)	<i>tcdA</i> ⁺ , <i>tcdB</i> ⁺ , <i>tcdC</i> Δ18+, <i>cdtA</i> ⁺ / <i>cdtB</i> ⁺ <i>tcdA</i> ⁺ , <i>tcdB</i> ⁺ ,	027 (53),
	<i>tcdA</i> ⁺ , <i>tcdB</i> ⁺ , <i>tcdC</i> Δ18–, <i>cdtA</i> ⁺ / <i>cdtB</i> ⁺	002 (3), 014 (2) 003 (2), 220 (2), 076 (1), NT (1)
	<i>tcdA</i> ⁺ , <i>tcdB</i> ⁺ , <i>tcdC</i> Δ39+, <i>cdtA</i> ⁺ / <i>cdtB</i> ⁺	078 (2)

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220671.t003>

No significant difference was detected in sporulation between the R-CDI and NR-CDI isolates (6.21 log₁₀ and 5.54 log₁₀ CFU/biofilm, respectively; p = 0.565).

Minimum inhibitory concentrations

Drug susceptibility was evaluated on a selection of 65 isolates (26, R-CDI; 39, NR-CDI), and more than 70% of the isolates were resistant to ciprofloxacin (≥8 mg/L), moxifloxacin (≥8 mg/L), erythromycin (≥8 mg/L), clindamycin (≥8), and rifampin (≥32 mg/L). All isolates were susceptible to tetracycline (≤4 mg/L) and metronidazole (≤8 mg/L).

The isolates from R-CDI patients showed a greater reduced susceptibility to vancomycin (>2 mg/L) than the isolates from NR-CDI patients (27.78 and 9.09%, respectively). No other difference was observed between the R-CDI and NR-CDI isolates (Table 4).

Minimum inhibitory concentrations of the biofilm

In *C. difficile* biofilm isolates without microbiota, a reduced susceptibility to vancomycin was observed in 91.0% (101/102) of isolates and to linezolid in 89.21% (91/102) of isolates.

The BMICs were up to 100-fold higher for vancomycin and 20-fold higher for linezolid than the corresponding MICs. No differences between R-CDI and NR-CDI isolates were observed (Table 5).

Expression of *spo0A*, *sigH*, *slpA*, *cwp84*, *agrD1*, and *luxS*

The relative expression of *spo0A*, *sigH*, *cwp84*, and *agrD1* was higher in R-CDI than in NR-CDI isolates (Fig 1). Overexpression of *spo0A* (70%, 7/10), *sigH* (70%, 7/10), *cwp84* (40%, 4/10), and *agrD1* (70%, 7/10) was higher in R-CDI than in NR-CDI isolates. No significant difference was detected in the expression levels of *slpA* and *luxS* between R-CDI and NR-CDI isolates (Fig 1).

Discussion

Although some bacterial species that cause recurrent or chronic infections have been studied for their ability to form biofilms *in vivo* and *in vitro* [6], *C. difficile* biofilms have not been widely studied. In the present study, we evaluated biofilm formation by *C. difficile* and detected that most isolates were biofilm producers (strong adherent), independent of the ribotype or whether the strains were isolated from R-CDI or NR-CDI patients. These results reflect those of other previous studies that found no correlation between the ribotype, the strain virulence, or relapse of infection [16].

The expression of quorum sensing regulators and adhesion-associated factors were determined from biofilm culture. *agrD1* and *cwp84* were overexpressed in R-CDI isolates, both of

Table 4. Antimicrobial susceptibility (mg/L) from R-CDI and NR-CDI strains.

Antimicrobial agent		R-CDI	NR-CDI	p value
Ciprofloxacin	GM	111.43	61.71	
	Range	8->128	1->128	
	MIC ₉₀	>128	>128	
	Resistant (%)	96.15	89.74	0.342
Moxifloxacin	GM	18.78	14.22	
	Range	1-32	1-32	
	MIC ₉₀	32.00	32.00	
	Resistant (%)	92.31	87.23	0.506
Erythromycin	GM	190.21	87.70	
	Range	1->128	1->128	
	MIC ₉₀	>128	>128	
	Resistant (%)	81.81	95.23	0.152
Clindamycin	GM	150.97	66.75	
	Range	1->128	0.5->128	
	MIC ₉₀	>128	>128	
	Resistant (%)	90.48	81.82	0.383
Vancomycin	GM	2.16	1.76	
	Range	1-4	0.25-4	
	MIC ₉₀	4.00	2.00	
	Resistant (%)	27.78	9.09	0.013*
Metronidazole	GM	1.59	1.39	
	Range	0.25-4	0.25-4	
	MIC ₉₀	4.00	2.00	
	Resistant (%)	0.00	0.00	NA
Linezolid	GM	3.92	4.00	
	Range	0.5-32	0.03-32	
	MIC ₉₀	16.00	16.00	
	Resistant (%)	38.89	19.70	0.036*
Rifampin	GM	13.55	16.02	
	Range	0.001->128	0.002->128	
	MIC ₉₀	>128	128.00	
	Resistant (%)	70.59	79.41	0.484
Tetracycline	GM	0.26	0.16	
	Range	0.06-8	0.06-8	
	MIC ₉₀	4.00	0.13	
	Resistant (%)	0.00	0.00	NA

Breakpoints were as follows: moxifloxacin and clindamycin ≥ 8 mg/L, tetracycline ≥ 16 mg/L, metronidazole ≥ 32 mg/L according to CLSI (2019); vancomycin > 2 mg/L according to EUCAST (2019), erythromycin ≥ 8 mg/L according to CLSI (2013); ciprofloxacin, ≥ 8 mg/L [28], linezolid ≥ 16 mg/L [29] and rifampicin ≥ 32 mg/L [30].

*Significant difference p value < 0.05

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220671.t004>

which were previously shown to regulate colonization, virulence, and relapses in *in vivo* models [8, 16, 18–20]. By contrast, *luxS* and *slpA* expression was similar in R-CDI and NR-CDI isolates. It would be valuable in the future, to analyze the transcription of toxins A and B involving isolates overexpressing *agrD1* and *cwp84* from R-CDI and NR-CDI isolates.

Differences in spore formation in biofilms aged 7–10 days compared to vegetative cultures have been reported previously, including higher viable counts, higher temperature tolerance,

Table 5. Distribution of MICs and BMICs between R-CDI and NR-CDI strains.

		Vancomycin				Linezolid			
		Range	GM	Resistant (%)	p value	Range	GM	Resistant (%)	p value
R-CDI	MIC	1.00–4.00	1.88	10/36 (27.78)	0.000	0.50–32.0	3.92	3/36 (8.33)	0.000**
	BMIC	2.00–256	109.08	35/36 (97.22)		4.00–256.0	87.34	29/36 (80.55)	
NR-CDI	MIC	0.25–4.00	1.85	6/66 (9.09)	0.000	0.03–32.0	4.02	13/66 (20.0)	0.000**
	BMIC	2.00–256	108.35	66/66 (100)		2.00–256.0	89.63	62/66 (95.38)	

Data are mg/L of an antimicrobial agent unless otherwise noted.

**Significant difference p value <0.01

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220671.t005>

and pleiomorphic biofilm structures (thin, thick exosporium surrounding the spores in the biofilm) [32, 33]. Further studies to compare germination efficiency with co-germinants in this biofilm model need to be done. In the present study, we analyzed 7-day old biofilms and found that sporulation was greater in the R-CDI strains than in the NR-CDI strains. In addition, sporulation was associated with overexpression of the key regulators of the initial steps of the sporulation pathway, *spo0A* and *sigH*, suggesting their involvement in the overproduction of spores in the biofilm. According to our results, the production of spores can be associated with recurrent CDI isolates.

In the present study, a high proportion of resistance was detected against ciprofloxacin, moxifloxacin, erythromycin, clindamycin, and rifampin, and all isolates were susceptible to tetracycline and metronidazole. No differences were detected between NR-CDI and R-CDI strains for these antimicrobial susceptibilities.

Conversely, lower susceptibility to linezolid was observed in R-CDI strains than in NR-CDI strains, and this result is relevant because linezolid is considered to be a possible drug for treatment with CDI. Interestingly, our study population has no records of exposure to this antimicrobial agent in the 12 weeks before the diagnosis of CDI. The *cfr* gene has been associated with resistance to linezolid and has been detected in *C. difficile* with a MIC up to 16 mg/L [34]. Further studies are underway to clarify the molecular mechanisms associated with this drug resistance.

In our study, the isolates from R-CDI patients showed lower susceptibility to vancomycin (MIC > 2 mg/L) more frequently than isolates from NR-CDI patients (27.78 and 9.09%, respectively); and this result is important given the wide use of vancomycin for treatment of CDI.

High MICs have been reported for moxifloxacin, rifampicin, vancomycin, and clindamycin in ribotypes 001, 017, 027, 176, 078, and 014 [35, 36]. In the present study, high MICs were detected for the same antibiotics in addition to ciprofloxacin and erythromycin. Most of the isolates obtained were ribotype 027. No difference in ribotype was found between the R-CDI and NR-CDI groups. In our population, 027 strains are associated with higher mortality rates and greater probability of R-CDI [37].

C. difficile isolates from the present study had high exposure to clindamycin, and this exposure has been associated in prior studies with a high excretion of *C. difficile* spores [38]. Therefore, the high use of clindamycin in our clinical setting of Mexico may be associated with the high sporulation detected.

In a 3-day biofilm model of *C. difficile*, the susceptibility to vancomycin has been reported, with BMICs up to 100 times higher than the corresponding planktonic MICs [8, 39, 40]. In the present study, we confirmed a reduced susceptibility to vancomycin in most strains, with BMICs up to 100 times higher than MICs. Reduced susceptibility of *C. difficile* [27, 41] and

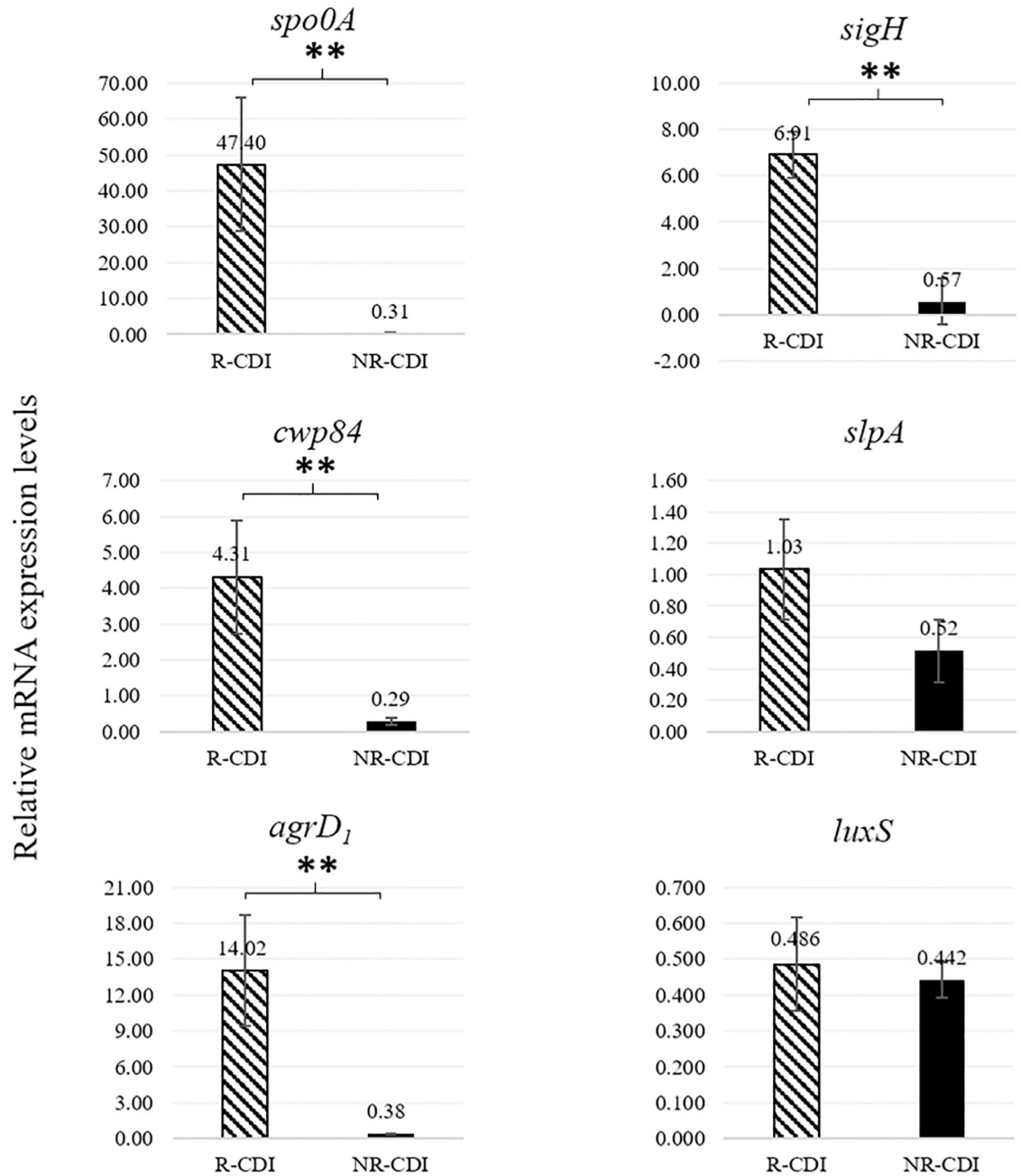


Fig 1. Expression levels of *spo0A*, *sigH*, *cwp84*, *slpA*, *agrD₁*, and *luxS* transcripts between R-CDI and NR-CDI strains. Relative mRNA transcripts expression means of *spo0A* ($p = 0.003$), *sigH* ($p = 0.007$), *cwp84* ($p = 0.001$), *slpA* ($p = 0.066$), *agrD₁* ($p = 0.001$) and *luxS* ($p = 0.400$) from R-CDI and NR-CDI strains. **Significant difference p value < 0.01.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220671.g001>

BMIC values six times higher than MIC have been reported for metronidazole [14]. Despite our patients having been treated with metronidazole before the diagnosis of CDI, we did not find isolates with reduced susceptibility to this antimicrobial agent in either planktonic or biofilm MIC experiments.

Several risk factors have been described for the development of CDI [42]. In our study, the consumption of cephalosporins and a greater number of previous antibiotics were risk

factors for R-CDI. In addition, patients with NR-CDI more frequently used fluoroquinolones ($p = 0.000$) and vancomycin ($p = 0.024$) than those with R-CDI.

The primary limitation of this study was that cultures were not performed on fresh samples. Instead, they were frozen and stored at -20°C for up to two years with at least two freeze-thaw cycles, which could explain the low recovery of *C. difficile*.

In conclusion, the sporulation and overexpression of *sigH*, *spo0A*, and *agrD₁* were greater in R-CDI than in NR-CDI isolates. The R-CDI isolates had more reduced susceptibility to vancomycin and linezolid than the NR-CDI isolates in both planktonic cells and biofilm isolates. These factors may affect the recurrence of the infection because a greater sporulation in the protected biofilm may facilitate less spore washout from the gut and a higher likelihood of *C. difficile* remaining after CDI therapy has ceased.

Author Contributions

Conceptualization: Laura Tijerina-Rodríguez, Licet Villarreal-Treviño, Simon D. Baines, Adrián Camacho-Ortíz, Elvira Garza-González.

Data curation: Laura Tijerina-Rodríguez, Rayo Morfín-Otero, Adrián Camacho-Ortíz, Eduardo Rodríguez-Noriega, Elvira Garza-González.

Formal analysis: Laura Tijerina-Rodríguez, Simon D. Baines, Elvira Garza-González.

Funding acquisition: Laura Tijerina-Rodríguez, Licet Villarreal-Treviño, Rayo Morfín-Otero, Adrián Camacho-Ortíz, Samantha Flores-Treviño, Héctor Maldonado-Garza, Eduardo Rodríguez-Noriega, Elvira Garza-González.

Investigation: Laura Tijerina-Rodríguez, Simon D. Baines, Rayo Morfín-Otero, Adrián Camacho-Ortíz, Eduardo Rodríguez-Noriega, Elvira Garza-González.

Methodology: Laura Tijerina-Rodríguez, Simon D. Baines, Elvira Garza-González.

Project administration: Laura Tijerina-Rodríguez, Licet Villarreal-Treviño, Rayo Morfín-Otero, Adrián Camacho-Ortíz, Samantha Flores-Treviño, Elvira Garza-González.

Resources: Licet Villarreal-Treviño, Rayo Morfín-Otero, Adrián Camacho-Ortíz, Samantha Flores-Treviño, Héctor Maldonado-Garza, Eduardo Rodríguez-Noriega, Elvira Garza-González.

Software: Samantha Flores-Treviño.

Supervision: Simon D. Baines, Elvira Garza-González.

Validation: Laura Tijerina-Rodríguez.

Visualization: Laura Tijerina-Rodríguez.

Writing – original draft: Laura Tijerina-Rodríguez, Elvira Garza-González.

Writing – review & editing: Laura Tijerina-Rodríguez, Licet Villarreal-Treviño, Simon D. Baines, Rayo Morfín-Otero, Adrián Camacho-Ortíz, Samantha Flores-Treviño, Héctor Maldonado-Garza, Eduardo Rodríguez-Noriega, Elvira Garza-González.

References

1. Lessa FC, Mu Y, Bamberg WM, Beldavs ZG, Dumyati GK, Dunn JR, et al. Burden of *Clostridium difficile* infection in the United States. *N Engl J Med*. 2015; 372(9):825–34. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1408913> PMID: 25714160
2. McFarland LV, Elmer GW, Surawicz CM. Breaking the cycle: treatment strategies for 163 cases of recurrent *Clostridium difficile* disease. *Am J Gastroenterol*. 2002; 97(7):1769–75. PMID: 12135033

3. Mac Aogain M, Moloney G, Kilkenny S, Kelleher M, Kelleghan M, Boyle B, et al. Whole-genome sequencing improves discrimination of relapse from reinfection and identifies transmission events among patients with recurrent *Clostridium difficile* infections. *J Hosp Infect*. 2015; 90(2):108–16. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2015.01.021> PMID: 25935700
4. Figueroa I, Johnson S, Sambol SP, Goldstein EJ, Citron DM, Gerding DN. Relapse versus reinfection: recurrent *Clostridium difficile* infection following treatment with fidaxomicin or vancomycin. *Clin Infect Dis*. 2012; 55 Suppl 2:S104–9. <https://doi.org/10.1093/cid/cis357> PMID: 22752857
5. Gil F, Pizarro-Guajardo M, Alvarez R, Garavaglia M, Paredes-Sabja D. *Clostridium difficile* recurrent infection: possible implication of TA systems. *Future Microbiol*. 2015; 10(10):1649–57. <https://doi.org/10.2217/fmb.15.94> PMID: 26439907
6. Bjarnsholt T. The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS Suppl*. 2013;(136):1–51. <https://doi.org/10.1111/apm.12099> PMID: 23635385
7. Dawson LF, Valiente E, Faulds-Pain A, Donahue EH, Wren BW. Characterisation of *Clostridium difficile* biofilm formation, a role for Spo0A. *PLoS One*. 2012; 7(12):e50527. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050527> PMID: 23236376
8. Ethapa T, Leuzzi R, Ng YK, Baban ST, Adamo R, Kuehne SA, et al. Multiple factors modulate biofilm formation by the anaerobic pathogen *Clostridium difficile*. *J Bacteriol*. 2013; 195(3):545–55. <https://doi.org/10.1128/JB.01980-12> PMID: 23175653
9. Donelli G, Vuotto C, Cardines R, Mastrantonio P. Biofilm-growing intestinal anaerobic bacteria. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2012; 65(2):318–25. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2012.00962.x> PMID: 22444687
10. Dapa T, Unnikrishnan M. Biofilm formation by *Clostridium difficile*. *Gut Microbes*. 2013; 4(5):397–402. <https://doi.org/10.4161/gmic.25862> PMID: 23892245
11. Crowther GS, Chilton CH, Todhunter SL, Nicholson S, Freeman J, Baines SD, et al. Development and validation of a chemostat gut model to study both planktonic and biofilm modes of growth of *Clostridium difficile* and human microbiota. *PLoS One*. 2014; 9(2):e88396. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088396> PMID: 24516647
12. Deakin LJ, Clare S, Fagan RP, Dawson LF, Pickard DJ, West MR, et al. The *Clostridium difficile* *spo0A* gene is a persistence and transmission factor. *Infect Immun*. 2012; 80(8):2704–11. <https://doi.org/10.1128/IAI.00147-12> PMID: 22615253
13. Paredes-Sabja D, Cofre-Araneda G, Brito-Silva C, Pizarro-Guajardo M, Sarker MR. *Clostridium difficile* spore-macrophage interactions: spore survival. *PLoS One*. 2012; 7(8):e43635. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043635> PMID: 22952726
14. Semenyuk EG, Laning ML, Foley J, Johnston PF, Knight KL, Gerding DN, et al. Spore formation and toxin production in *Clostridium difficile* biofilms. *PLoS One*. 2014; 9(1):e87757. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087757> PMID: 24498186
15. Mora-Urbe P, Miranda-Cardenas C, Castro-Cordova P, Gil F, Calderon I, Fuentes JA, et al. Characterization of the Adherence of *Clostridium difficile* Spores: The Integrity of the Outermost Layer Affects Adherence Properties of Spores of the Epidemic Strain R20291 to Components of the Intestinal Mucosa. *Front Cell Infect Microbiol*. 2016; 6:99. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00099> PMID: 27713865
16. Pantaleon V, Soavelomandroso AP, Bouttier S, Briandet R, Roxas B, Chu M, et al. The *Clostridium difficile* Protease Cwp84 Modulates both Biofilm Formation and Cell-Surface Properties. *PLoS One*. 2015; 10(4):e0124971. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124971> PMID: 25922949
17. Saujet L, Monot M, Dupuy B, Soutourina O, Martin-Verstraete I. The key sigma factor of transition phase, SigH, controls sporulation, metabolism, and virulence factor expression in *Clostridium difficile*. *J Bacteriol*. 2011; 193(13):3186–96. <https://doi.org/10.1128/JB.00272-11> PMID: 21572003
18. Martin MJ, Clare S, Goulding D, Faulds-Pain A, Barquist L, Browne HP, et al. The *agr* locus regulates virulence and colonization genes in *Clostridium difficile* 027. *J Bacteriol*. 2013; 195(16):3672–81. <https://doi.org/10.1128/JB.00473-13> PMID: 23772065
19. Darkoh C, Odo C, DuPont HL. Accessory Gene Regulator-1 Locus Is Essential for Virulence and Pathogenesis of *Clostridium difficile*. *MBio*. 2016; 7(4). <https://doi.org/10.1128/mBio.01237-16> PMID: 27531912
20. Darkoh C, DuPont HL, Norris SJ, Kaplan HB. Toxin synthesis by *Clostridium difficile* is regulated through quorum signaling. *MBio*. 2015; 6(2):e02569. <https://doi.org/10.1128/mBio.02569-14> PMID: 25714717
21. Surawicz CM, Brandt LJ, Binion DG, Ananthakrishnan AN, Curry SR, Gilligan PH, et al. Guidelines for diagnosis, treatment, and prevention of *Clostridium difficile* infections. *Am J Gastroenterol*. 2013; 108(4):478–98; quiz 99. <https://doi.org/10.1038/ajg.2013.4> PMID: 23439232

22. Lemee L, Dhalluin A, Testelin S, Matrat MA, Maillard K, Lemeland JF, et al. Multiplex PCR targeting *tpi* (triose phosphate isomerase), *tcdA* (Toxin A), and *tcdB* (Toxin B) genes for toxigenic culture of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol*. 2004; 42(12):5710–4. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.12.5710-5714.2004> PMID: 15583303
23. Bidet P, Barbut F, Lalande V, Burghoffer B, Petit JC. Development of a new PCR-ribotyping method for *Clostridium difficile* based on ribosomal RNA gene sequencing. *FEMS Microbiol Lett*. 1999; 175(2):261–6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10386377>. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13629.x>
24. Hammond EN, Donkor ES, Brown CA. Biofilm formation of *Clostridium difficile* and susceptibility to Manuka honey. *BMC Complement Altern Med*. 2014; 14:329. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-329> PMID: 25181951
25. Stepanovic S, Vukovic D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukic S, Cirkovic I, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*. 2007; 115(8):891–9. https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x PMID: 17696944
26. Baines SD, O'Connor R, Freeman J, Fawley WN, Harmanus C, Mastrantonio P, et al. Emergence of reduced susceptibility to metronidazole in *Clostridium difficile*. *J Antimicrob Chemother*. 2008; 62(5):1046–52. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn313> PMID: 18693234
27. Freeman J, Stott J, Baines SD, Fawley WN, Wilcox MH. Surveillance for resistance to metronidazole and vancomycin in genotypically distinct and UK epidemic *Clostridium difficile* isolates in a large teaching hospital. *J Antimicrob Chemother*. 2005; 56(5):988–9. <https://doi.org/10.1093/jac/dki357> PMID: 16195254
28. Buchler AC, Rampini SK, Stelling S, Ledergerber B, Peter S, Schweiger A, et al. Antibiotic susceptibility of *Clostridium difficile* is similar worldwide over two decades despite widespread use of broad-spectrum antibiotics: an analysis done at the University Hospital of Zurich. *BMC Infect Dis*. 2014; 14:607. <https://doi.org/10.1186/s12879-014-0607-z> PMID: 25425433
29. Goldstein EJ, Citron DM, Merriam CV, Warren YA, Tyrrell KL, Fernandez HT. In vitro activities of daptomycin, vancomycin, quinupristin-dalfopristin, linezolid, and five other antimicrobials against 307 gram-positive anaerobic and 31 *Corynebacterium* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; 47(1):337–41. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12499210>. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.1.337-341.2003>
30. O'Connor JR, Galang MA, Sambol SP, Hecht DW, Vedantam G, Gerding DN, et al. Rifampin and rifaximin resistance in clinical isolates of *Clostridium difficile*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008; 52(8):2813–7. <https://doi.org/10.1128/AAC.00342-08> PMID: 18559647
31. Chang LL, Chen HF, Chang CY, Lee TM, Wu WJ. Contribution of integrons, and SmeABC and SmeDEF efflux pumps to multidrug resistance in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Antimicrob Chemother*. 2004; 53(3):518–21. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh094> PMID: 14749340
32. Pickering DS, Wilcox MH, Chilton CH. Biofilm-derived spores of *Clostridioides (Clostridium) difficile* exhibit increased thermotolerance compared to planktonic spores. *Anaerobe*. 2018; 54:169–71. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.10.003> PMID: 30292821
33. Lawley TD, Croucher NJ, Yu L, Clare S, Sebahia M, Goulding D, et al. Proteomic and genomic characterization of highly infectious *Clostridium difficile* 630 spores. *J Bacteriol*. 2009; 191(17):5377–86. <https://doi.org/10.1128/JB.00597-09> PMID: 19542279
34. Marin M, Martin A, Alcalá L, Cercenado E, Iglesias C, Reigadas E, et al. *Clostridium difficile* isolates with high linezolid MICs harbor the multiresistance gene *cfr*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015; 59(1):586–9. <https://doi.org/10.1128/AAC.04082-14> PMID: 25385106
35. Berger FK, Rasheed SS, Araj GF, Mahfouz R, Rimmani HH, Karaoui WR, et al. Molecular characterization, toxin detection and resistance testing of human clinical *Clostridium difficile* isolates from Lebanon. *Int J Med Microbiol*. 2018; 308(3):358–63. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2018.01.004> PMID: 29478838
36. Freeman J, Vernon J, Morris K, Nicholson S, Todhunter S, Longshaw C, et al. Pan-European longitudinal surveillance of antibiotic resistance among prevalent *Clostridium difficile* ribotypes. *Clin Microbiol Infect*. 2015; 21(3):248 e9–e16. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2014.09.017> PMID: 25701178
37. Camacho-Ortiz A, Lopez-Barrera D, Hernandez-Garcia R, Galvan-De Los Santos AM, Flores-Trevino SM, Llaca-Diaz JM, et al. First report of *Clostridium difficile* NAP1/027 in a Mexican hospital. *PLoS One*. 2015; 10(4):e0122627. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122627> PMID: 25915544
38. Lawley TD, Clare S, Walker AW, Goulding D, Stabler RA, Croucher N, et al. Antibiotic treatment of *Clostridium difficile* carrier mice triggers a supershedder state, spore-mediated transmission, and severe disease in immunocompromised hosts. *Infect Immun*. 2009; 77(9):3661–9. <https://doi.org/10.1128/IAI.00558-09> PMID: 19564382

39. Mathur H, Rea MC, Cotter PD, Hill C, Ross RP. The efficacy of thuricin CD, tigecycline, vancomycin, teicoplanin, rifampicin and nitazoxanide, independently and in paired combinations against *Clostridium difficile* biofilms and planktonic cells. *Gut Pathog*. 2016; 8:20. <https://doi.org/10.1186/s13099-016-0102-8> PMID: [27257437](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27257437/)
40. James GA, Chesnel L, Boegli L, deLancey Pulcini E, Fisher S, Stewart PS. Analysis of *Clostridium difficile* biofilms: imaging and antimicrobial treatment. *J Antimicrob Chemother*. 2018; 73(1):102–8. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx353> PMID: [29029221](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29029221/)
41. Pelaez T, Alcalá L, Alonso R, Martín-López A, García-Arias V, Marin M, et al. In vitro activity of ramoplanin against *Clostridium difficile*, including strains with reduced susceptibility to vancomycin or with resistance to metronidazole. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49(3):1157–9. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.3.1157-1159.2005> PMID: [15728918](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15728918/)
42. Abou Chakra CN, Pepin J, Sirard S, Valiquette L. Risk factors for recurrence, complications and mortality in *Clostridium difficile* infection: a systematic review. *PLoS One*. 2014; 9(6):e98400. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098400> PMID: [24897375](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24897375/)
43. Deneve C, Delomenie C, Barc MC, Collignon A, Janoir C. Antibiotics involved in *Clostridium difficile*-associated disease increase colonization factor gene expression. *J Med Microbiol*. 2008; 57(Pt 6):732–8. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47676-0> PMID: [18480330](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18480330/)
44. Edwards AN, Nawrocki KL, McBride SM. Conserved oligopeptide permeases modulate sporulation initiation in *Clostridium difficile*. *Infect Immun*. 2014; 82(10):4276–91. <https://doi.org/10.1128/IAI.02323-14> PMID: [25069979](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25069979/)
45. Karlsson S, Burman LG, Akerlund T. Induction of toxins in *Clostridium difficile* is associated with dramatic changes of its metabolism. *Microbiology*. 2008; 154(Pt 11):3430–6. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/019778-0> PMID: [18957596](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18957596/)
46. Yun B, Oh S, Griffiths MW. *Lactobacillus acidophilus* modulates the virulence of *Clostridium difficile*. *J Dairy Sci*. 2014; 97(8):4745–58. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-7921> PMID: [24856984](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24856984/)

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

Adrián Martínez-Meléndez,¹ Laura Tijerina-Rodríguez,¹ Rayo Morfin-Otero,² Adrián Camacho-Ortiz,³ Licet Villarreal-Treviño,¹ Hugo Sánchez-Alanís,¹ Eduardo Rodríguez-Noriega,² Simon D. Baines,⁴ Samantha Flores-Treviño,⁵ Héctor Jesús Maldonado-Garza,⁵ and Elvira Garza-González⁵

Objective: To assess drug susceptibility and characterize *Clostridium difficile* ribotypes in isolates from two tertiary-care hospitals in Mexico.

Methods: Isolates were evaluated for genotyping, antimicrobial susceptibility testing and detection of mutations associated with drug resistance. PCR ribotyping was performed using a combination of gel-based and capillary electrophoresis-based approaches.

Results: MIC₅₀ and MIC₉₀ were ≥ 128 mg/L for ciprofloxacin, erythromycin, clindamycin, and rifampicin. There was no reduced susceptibility to metronidazole or tetracycline; however, reduced susceptibility to vancomycin (≥ 4 mg/L) and fidaxomicin (≥ 2 mg/L) was detected in 50 (40.3%) and 4 (3.2%) isolates, respectively. Furthermore, the *rpoB* Arg505Lys mutation was more frequently detected in isolates with high minimum inhibitory concentration (MIC) to rifampicin (≥ 32 mg/L) (OR = 52.5; 95% CI = 5.17–532.6; $p < 0.000$). Of the 124 *C. difficile* isolates recovered, 84 (66.7%) were of ribotype 027, 18 (14.5%) of ribotype 001, and the remainder were other ribotypes (353, 255, 220, 208, 176, 106, 076, 020, 019, 017, 014, 012, 003, and 002).

Conclusion: Ribotypes 027 and 001 were the most frequent *C. difficile* isolates recovered in this study, and demonstrated higher MICs. Furthermore, we found four isolates with reduced susceptibility to fidaxomicin, raising a concern since this drug is currently unavailable in Mexican Hospitals.

Keywords: drug resistance, ribotypes, fidaxomicin, ribotype 001, *Clostridium difficile*

Introduction

CLOSTRIDIUM DIFFICILE INFECTION (CDI) symptoms may range from mild diarrhea to life-threatening complications. Apart from NAP1/BI/027, other *C. difficile* ribotypes have been associated with severe disease, for example, ribotype 078 affects younger patients and is a frequent causative agent of community-associated disease¹; ribotype 001 is the dominant strain in eastern Europe and has higher antimicrobial resistance than other ribotypes.²

First-line treatment for mild to moderate CDI is based on oral administration of metronidazole or vancomycin, with a therapeutic efficacy $>70\%$.³ In some patients, however, di-

arrheal symptoms may reappear within days or weeks after having stopped the treatment. Fidaxomicin is a relatively new narrow-spectrum macrocyclic antibiotic drug that is noninferior to vancomycin in the management of CDI and associated with lower recurrence rates than vancomycin.⁴ However, fidaxomicin is currently unavailable in Mexico, thus, vancomycin and metronidazole are still the standard treatments for CDI as recommended in the Clinical Practice Guidelines for CDI in Adults of the Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA) and the Infectious Diseases Society of America (IDSA). Other therapeutic options that have been proposed in recent years are rifamycins (good *in vitro* activity against *C. difficile*) including rifaximin (for

¹Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Mexico.

²Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara, Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde” e Instituto de Patología Infecciosa y Experimental, Guadalajara, Mexico.

³Servicio de Infectología, Universidad Autónoma de Nuevo León, Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González,” Monterrey, Mexico.

⁴Department of Biological and Environmental Sciences, School of Life and Medical Sciences, University of Hertfordshire, Hatfield, United Kingdom.

⁵Servicio de Gastroenterología, Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González,” Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Mexico.

relapsing CDI),⁵ and linezolid (protective rather than curative activity).⁶

Resistance to erythromycin may be due to any of more than 20 classes of erythromycin ribosomal methylase (*erm*) genes, including *ermB*,⁷ which is also related to clindamycin resistance. In *C. difficile*, resistance to fluoroquinolones is usually due to altered DNA gyrase because of nucleotide substitutions in *gyrA* or *gyrB* genes.⁵ Resistance to rifamycins and/or fidaxomicin is mediated by mutations that lead to reduced binding to the β subunit of RNA polymerase (RpoB).^{7,8} Finally, resistance to linezolid has been related to the presence of the phenicol and lincosamide resistance gene (*cfr*), as described for staphylococci.⁹

Although *C. difficile* is an important nosocomial pathogen, little is known about the epidemiology of this microorganism in Mexico. The aims of this study were to determine the drug susceptibility of Mexican *C. difficile* isolates, particularly to the recently licensed CDI treatment, fidaxomicin, and to study circulating ribotypes in two tertiary-care hospitals in Mexico.

Methods

Settings and study population

We designed an observational study of circulating *C. difficile* ribotypes, drug susceptibility, and drug resistance genes from two hospitals in Mexico: The Hospital Civil of Guadalajara “Fray Antonio Alcalde,” is a 1000-bed tertiary-care teaching hospital, in Guadalajara; and the Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González,” is a 450-bed tertiary-care teaching hospital in Monterrey.

All patients with confirmed CDI from February 2011 through January 2016 were included in the study. Recurrences were defined as patients with a reappearance of symptoms after resolution of the previous diarrheal episode within 8 weeks or less. As patient information was anonymized and only microbiological data were analyzed, informed consent was not required. The study was reviewed and approved by the Local Ethics Committee (Approval: 047/16).

Diagnosis of CDI

Clinical diagnosis of CDI was suspected when patients were hospitalized for more than 48 hr and had >3 loose stools in the previous 24 hr. In the Hospital Civil of Guadalajara, CDI was confirmed by real-time PCR using the Xpert[®] *C. difficile*/Epi assay (Cepheid, Sunny Vale, CA) and in the Hospital Universitario, the diagnosis was confirmed by the use of the Meridian ImmunoCard[®] Toxins A&B (Meridian Bioscience, Inc., Memphis, TN). Some patients were additionally diagnosed by the Xpert *C. difficile*/Epi assay in Hospital Universitario only at physicians' request.

Culture

Fecal samples from all confirmed CDI cases were treated with absolute ethanol and cultured on *C. difficile* agar (Neogen Corporation, MI) with cefoxitin (16 mg/L) in anaerobic conditions for up to 72 hr. Plates were cultured in either an anaerobic jar or anaerobic chamber. Identification was performed by PCR as described.¹⁰ Only one isolate per patient was included in the study.

Antimicrobial susceptibility testing

We tested antimicrobial agents used for CDI treatment such as vancomycin, metronidazole (range from 0.03 to 128 mg/L), fidaxomicin (range from 0.002 to 8 mg/L), and rifampicin (range from 0.0001 to 128 mg/L); and also antimicrobials with potential therapeutic use such as linezolid (range from 0.03 to 128 mg/L). Furthermore, we tested antimicrobials that may be associated with induction of CDI, including ciprofloxacin, moxifloxacin, erythromycin, clindamycin (range from 0.03 to 128 mg/L), and tetracycline (range from 0.008 to 128 mg/L).

Susceptibility testing was performed by the agar dilution method using Wilkins-Chalgren agar (Oxoid Limited, Basingstoke, Hampshire, England) and Schaedler's anaerobe broth (Oxoid Limited).¹¹ Briefly, overnight cultures in 5 ml of pre-reduced Schaedler's broth were spotted onto plates of Wilkins-Chalgren agar with different concentrations of antibiotics, using a multipoint inoculator (10⁴ colony-forming units/spot). An agar plate without an antimicrobial agent was included as a growth control in both aerobic and anaerobic atmosphere and the plates were read after 48 hr of incubation at 37°C in an anaerobic environment. *C. difficile* ATCC 700057 was used as quality control.

A stock solution of fidaxomicin (800 mg/L) was prepared in DMSO, then 1 ml of stock was diluted in 5 ml of DMSO and 4 ml of 10% DMSO (final concentrations 80 mg/L); further dilutions were made in 10% DMSO. Stock solutions of remaining antibiotics (2560 mg/L) and dilutions were dissolved accordingly to recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) document M100–S27.

Mutations associated with drug resistance

To detect mutations associated with resistance to rifampicin or fidaxomicin, two regions of the *rpoB* gene were amplified; for rifampicin, we used previously reported primers,⁹ and for fidaxomicin, we designed the primers CdrpoB-FD-F (5'-TCATGGAAAATGGAAACACCA-3') and CdrpoB-FD-R (5'-CCAAACCTCCATCTCTCCAA-3'). We designed the primers CdrpoC-VAN-F (5'-GAATGGGTGC TGAAGCTGTA-3) and CdrpoC-VAN-R (5'-GACGGAAA CGACCTTGCTTA -3') to amplify a region in the *rpoC* gene that has been linked to vancomycin resistance.¹² Furthermore, the presence of the *cfr* gene was investigated by PCR in selected strains as previously described.¹³

Sequencing of PCR-purified products was performed by Macrogen, Inc. (Seoul, Korea). The sequences were analyzed using the NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

Typing of isolates

All isolates were typed for *tcdA*, *tcdB*, *cdtA*, *cdtB*, and for deletions in *tcdC* by PCR as previously described.^{14,15} For ribotyping, amplification of the 16S-23S rRNA intergenic spacer region was conducted by PCR as described.¹⁶ The ATCC strain BAA-1805 (ribotype 027) was used as a control. Selected isolates were ribotyped by capillary electrophoresis at the *C. difficile* Ribotyping Network Reference Laboratory (CDRN) at Leeds Teaching Hospitals NHS Trust, Leeds, United Kingdom.

Results

Culture

Samples were cultured in anaerobic jars ($n=196$, 57.1%) or in anaerobic chamber ($n=147$, 42.9%). In total, we cultured 343 samples, of which 124 (36.1%) yielded a positive *C. difficile* culture (one isolate per patient). Most of the cases were from the Hospital Civil of Guadalajara ($n=76$, 61.3%); the Hospital Universitario accounted for 48 of the cases (38.7%).

Antimicrobial susceptibility profiles

Four isolates (3.2%) had reduced susceptibility to fidaxomicin (MIC = 2 mg/L), whereas no isolate was resistant to either tetracycline or metronidazole. MIC₅₀ and MIC₉₀ were ≥ 128 mg/L to ciprofloxacin, erythromycin, clindamycin, and rifampicin (Table 1). MIC distributions of CDI treatment drugs (vancomycin, metronidazole, and fidaxomicin) are shown in Figure 1.

Molecular analysis of drug resistance

When analyzing a region of *rpoB* in fidaxomicin-susceptible isolates ($n=18$) and isolates with reduced susceptibility ($n=3$), we found seven mutations; one of these caused an amino acid change that was not associated to reduced susceptibility strains (Table 2). Furthermore, the *rpoB* gene was amplified and partially sequenced in 14 rifampicin-susceptible and 22 rifampicin-resistant isolates. We detected three mutations that generated amino acid changes in both susceptible and resistant isolates; the Arg505Lys mutation was more frequently detected in resistant isolates (21/22, 95.4%) than in susceptible isolates (4/14, 28.5%) (OR = 52.5; 95% CI = 5.17–532.6; $p < 0.000$) (Table 2).

We also analyzed the *rpoC* gene in 14 vancomycin-susceptible isolates and 12 isolates with reduced susceptibility to vancomycin and detected 22 mutations; two of them were associated with an amino acid change (Table 2). The presence of drug resistance genes was analyzed in se-

lected isolates (i.e., isolates with the highest and lowest MIC values). The *cfr* gene was not amplified in any of the linezolid-susceptible ($n=17$) or linezolid-resistant ($n=9$) *C. difficile* isolates evaluated.

Ribotypes

Toxin A and toxin B genes were detected in all isolates. The binary toxin gene was detected in 89 isolates (71.8%), of which 87 (97.8%) contained the *tcdC* 18-bp deletion (Table 3).

Eighty-four isolates (67.7%) demonstrated the same ribotype banding patterns of the control strain BAA-1805 (ribotype 027) (Table 2) and we randomly selected twelve strains that were all confirmed to be ribotype 027 by the CDRN (Leeds, United Kingdom). Similarly, of 18 isolates (14.5%) that demonstrated similar banding pattern to ribotype 001 (90% of similarity), four randomly selected isolates were confirmed to be ribotype 001 by the CDRN. The ribotypes and presence of toxin genes of the other isolates are summarized in Table 3.

Discussion

In our study, ribotype 027 was the predominant strain, accounting for 67.7% of the cases; this ribotype is considered epidemic and has been reported worldwide.¹⁷ In previous publications we have found 027 strain as the predominant ribotype in our settings,^{18,19} the latter is in contrast to diverse studies where there is a high diversity of ribotypes and 027 stains account for less than 30%.^{20–22} The second most frequent ribotype was 001, accounting for 14.5% of the cases; this ribotype is the main ribotype circulating in Korea,²³ Czech Republic,² Croatia,²⁴ and Slovakia,²⁵ however, this is the first report on ribotype 001 circulation in Mexico. This strain has been associated with high drug resistance, including resistance to ciprofloxacin, erythromycin, and clindamycin.²⁴

Fidaxomicin is an FDA-approved antibiotic for the treatment of CDI.⁸ A previous study that included 1,323 isolates showed an MIC₉₀ of 0.5 mg/L against *C. difficile*²⁶;

TABLE 1. ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITIES OF MEXICAN *C. DIFFICILE* ISOLATES

Antimicrobial agent	All strains (n=124)			Ribotype 027 (n=84)			Ribotype 001 (n=18)		
	MIC ₅₀ (mg/L)	MIC ₉₀ (mg/L)	Geometric mean (mg/L)	MIC ₅₀ (mg/L)	MIC ₉₀ (mg/L)	Geometric mean (mg/L)	MIC ₅₀ (mg/L)	MIC ₉₀ (mg/L)	Geometric mean (mg/L)
CDI-associated									
Ciprofloxacin	>128	>128	120.4	>128	>128	164	>128	>128	159.1
Moxifloxacin	32	64	30.6	32	64	39.3	64	64	38.4
Erythromycin	>128	>128	85.6	>128	>128	184	>128	>128	175
Clindamycin	>128	>128	89.5	>128	>128	185.6	>128	>128	176.2
Tetracycline	0.06	0.125	0.07	0.03	0.125	0.06	0.125	4	0.07
CDI treatment									
Vancomycin	2	4	2.3	2	4	2.8	2	4	2.7
Metronidazole	1	2	0.9	2	2	1.4	0.25	0.5	1
Fidaxomicin	0.015	0.06	0.025	0.015	0.06	0.027	0.015	0.03	0.023
Rifampicin	>128	>128	25.2	>128	>128	99.1	>128	>128	77
Potentially therapeutic									
Linezolid	4	8	3.7	4	8	4.1	8	32	4.5

CDI, *Clostridium difficile* infection; MIC, minimum inhibitory concentration.

FIG. 1. MIC distribution. MIC distribution and ranges of drugs used for CDI-treatment. CDI, *Clostridium difficile* infection; MIC, minimum inhibitory concentration.

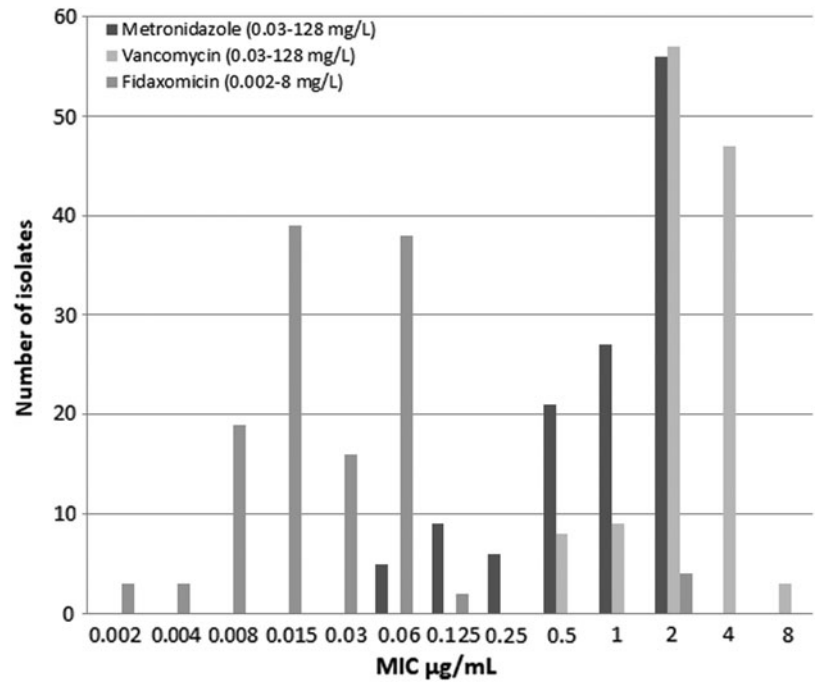


TABLE 2. DISTRIBUTION OF MUTATIONS ASSOCIATED TO DRUG RESISTANCE DETECTED IN SUSCEPTIBLE AND RESISTANT *C. DIFFICILE* ISOLATES

Antibiotic	Gene	Polymorphism	Codon	Amino acid change	Susceptible	Resistant	OR (95% CI), p
Rifampicin	<i>rpoB</i>	<u>AGA</u> → <u>AAA</u>	505	Arg505Lys	4/14 (28.5)	21/22 (95.4)	52.5 (5.17–532.6), 0.000
		<u>CAT</u> → <u>AAT</u>	502	His502Asn	0/14 (0.0)	8/22 (36.3)	NC
		<u>ATA</u> → <u>ATG</u>	548	Ile548Met	4/14 (28.5)	13/22 (59.0)	3.6 (0.85–15.10), 0.074
		Wild type			10/14 (71.5)	1/22 (4.5)	
Fidaxomicin	<i>rpoB</i>	<u>GAG</u> → <u>CAC</u>	1036	Glu1036Gln	15/18 (83.3)	2/3 (66.7)	0.4 (0.027–5.9), 0.489
		<u>GGG</u> → <u>GGA</u>	1020	None	15/18 (83.3)	2/3 (66.7)	0.4 (0.027–5.9), 0.489
		<u>CTA</u> → <u>TTA</u>	965	None	15/18 (83.3)	2/3 (66.7)	0.4 (0.027–5.9), 0.489
		<u>GAC</u> → <u>GAT</u>	966	None	15/18 (83.3)	2/3 (66.7)	0.4 (0.027–5.9), 0.489
		<u>AAC</u> → <u>AAT</u>	1040	None	15/18 (83.3)	2/3 (66.7)	0.4 (0.027–5.9), 0.489
		<u>TAC</u> → <u>TAT</u>	1048	None	15/18 (83.3)	2/3 (66.7)	0.4 (0.027–5.9), 0.489
		<u>ATT</u> → <u>ATC</u>	980	None	15/18 (83.3)	2/3 (66.7)	0.4 (0.027–5.9), 0.489
		Wild type			3/18 (16.7)	1/3 (33.3)	
Vancomycin	<i>rpoC</i>	<u>AAG</u> → <u>AAT</u>	265	Lys266Asn	1/14 (7.1)	0/12 (0.0)	NC
		<u>TTC</u> → <u>TTA</u>	294	Phe295Leu	1/14 (7.1)	0/12 (0.0)	NC
		<u>AAG</u> → <u>AAA</u>	175	None	5/14 (35.7)	11/12 (91.7)	19.8 (1.94–201.63) 0.004
		<u>AAG</u> → <u>AAA</u>	217	None	4/14 (28.5)	11/12 (91.7)	27.5 (2.61–289.14), 0.004
		<u>GAG</u> → <u>GAA</u>	184	None	4/14 (28.5)	11/12 (91.7)	27.5 (2.61–289.14), 0.004
		<u>GAG</u> → <u>GAA</u>	193	None	4/14 (28.5)	11/12 (91.7)	27.5 (2.61–289.14), 0.004
		<u>GAG</u> → <u>GAA</u>	213	None	4/14 (28.5)	11/12 (91.7)	27.5 (2.61–289.14), 0.004
		<u>GGG</u> → <u>GGA</u>	199	None	4/14 (28.5)	11/12 (91.7)	27.5 (2.61–289.14), 0.004
		<u>GCG</u> → <u>GTC</u>	192	None	2/14 (14.2)	0/12 (0.0)	NC
		<u>GCG</u> → <u>GCA</u>	249	None	4/14 (28.5)	11/12 (91.7)	27.5 (2.61–289.14), 0.004
		<u>CCA</u> → <u>CCG</u>	234	None	4/14 (28.5)	11/12 (91.7)	27.5 (2.61–289.14), 0.004
		<u>CAA</u> → <u>CAG</u>	200	None	2/14 (14.2)	0/12 (0.0)	NC
		<u>GCA</u> → <u>GCG</u>	293	None	1/14 (7.1)	0/12 (0.0)	NC
		<u>CTA</u> → <u>TTA</u>	190	None	4/14 (28.5)	11/12 (91.7)	27.5 (2.61–289.14), 0.004
		<u>AAC</u> → <u>AAT</u>	264	None	4/14 (28.5)	11/12 (91.7)	27.5 (2.61–289.14), 0.004
		<u>GTT</u> → <u>GTA</u>	203	None	4/14 (28.5)	11/12 (91.7)	27.5 (2.61–289.14), 0.004

NC, not calculated.

TABLE 3. DISTRIBUTION OF RIBOTYPES AMONG *C. DIFFICILE* STRAINS (N=124)

N	Genotype	Ribotype
84	<i>tcdA+</i> , <i>tcdB+</i> , <i>cdtA+</i> , <i>cdtB+</i> , <i>tcdCA18+</i>	027
18	<i>tcdA+</i> , <i>tcdB+</i> , <i>cdtA-</i> , <i>cdtB-</i> , <i>tcdCA18-</i>	001
5	<i>tcdA+</i> , <i>tcdB+</i> , <i>cdtA-</i> , <i>cdtB-</i> , <i>tcdCA18-</i>	106
3	<i>tcdA+</i> , <i>tcdB+</i> , <i>cdtA+</i> , <i>cdtB+</i> , <i>tcdCA18</i>	176
3	<i>tcdA+</i> , <i>tcdB+</i> , <i>cdtA-</i> , <i>cdtB-</i> , <i>tcdCA18-</i>	003
1 from each ribotype	<i>tcdA+</i> , <i>tcdB+</i> , <i>cdtA+</i> , <i>cdtB+</i> , <i>tcdCA18-</i>	019, 208
1 from each ribotype	<i>tcdA+</i> , <i>tcdB+</i> , <i>cdtA-</i> , <i>cdtB-</i> , <i>tcdCA18-</i>	002, 012, 014, 017, 020, 076, 220, 255, 353

similarly, Snyderman *et al.* reported 925 isolates that were inhibited at a fidaxomicin concentration ≤ 1 mg/L, and the MIC₉₀ was 0.5 mg/L.²⁰ In the present study, we observed an MIC₉₀ of 0.06 mg/L; however, we detected four ribotype 027 isolates with a fidaxomicin MIC of 2 mg/L; these isolates were recovered from patients with recurrent CDI. This finding is of interest since fidaxomicin is unavailable in Mexican hospitals and none of the patients included in the study were exposed to this drug. However, we performed susceptibility testing only once; nevertheless, the MIC of control strain were reproducible and the four strains with MIC = 2 mg/L were detected in a batch of 36 isolates being tested at the same time. MICs of the remaining 32 isolates were ≤ 0.125 mg/L.

Reduced susceptibility to fidaxomicin may be due to point mutations in the *rpoB* gene (RNA polymerase subunit β).¹² We detected one point mutation (Glu1036Gln) in *RpoB*, but it was not associated with drug resistance ($p=0.489$). Leeds *et al.* identified two mutations in *rpoB* that were associated with reduced susceptibility to fidaxomicin; one of them coded a Gln1073Arg substitution and the second was a frameshift after amino acid 117 of a homolog of the MarR family of transcriptional regulators¹²; however, we did not detect these mutations in our strains. Other mutations associated with fidaxomicin reduced susceptibility have been reported, but all of them have been obtained through the serial passage of strains into media containing fidaxomicin.²⁷ Goldstein *et al.* isolated a strain with an MIC of 16 mg/L to fidaxomicin from a patient with an episode of recurrence during a clinical trial²⁸; this isolate harbored a Val1143Gly substitution in *rpoB*. However, the authors did not consider that resistance had developed during the clinical trial and did not explain the clinical relevance of this finding. To our knowledge, there is no report of clinical resistance to fidaxomicin. It is widely known that fidaxomicin reaches high levels in the gut (1,000 μ g/g of faeces)²⁸; thus, the actual implication of the high MIC in the strains is unknown, considering the lack of reports on clinical resistance and particularly in Mexico, where this drug is not available.

In our study, we detected reduced susceptibility to vancomycin of 40.3% with 48.8% of reduced susceptibility in 027 strains and 33.3% in 001 strains; proportions as high as 87.7% have been reported in ribotype 027 strains.²⁹ Similarly, to fidaxomicin, it is unlikely that reduced susceptibility impacts on clinical response, due to the high levels of vancomycin reached in the gut ($>2,000$ mg/L); however, among patients from whom we recovered isolates with reduced susceptibility (50 patients), nine died because of CDI and five of these patients received vancomycin. Nevertheless, other factors may have acted in these patients' response to treatment.

Although this bacterial species has a *vanG* homolog inducible by vancomycin, it does not promote vancomycin resistance.³⁰ Leeds *et al.* identified an Asp244Tyr substitution in *rpoC* that was associated with reduced susceptibility to vancomycin.¹² Despite our efforts to detect this mutation, it was not found. Leeds *et al.* reported additional mutations: a Pro108Leu substitution in a transferase encoded by *murG/CD2725*, a stop codon after amino acid 326 in an exonuclease encoded by *CD3659*, and a single amino acid deletion in an L-serine dehydrogenase (*sdaB*). Therefore, it seems that diverse mechanisms are responsible for reduced susceptibility to vancomycin, particularly those involved in cell wall biosynthesis.

On the other hand, we observed no reduced susceptibility to metronidazole; similar findings have been reported in other studies.^{21,31} Clinical failures with metronidazole treatments have been attributed to the development of heteroresistance and deficiencies in the pharmacokinetics of the drug resulting in low luminal concentrations following oral administration. Reduced susceptibility to metronidazole is known to be unstable, with the loss of levels of resistance due to laboratory manipulation.⁵

High MICs to linezolid have been occasionally described in *C. difficile*.^{9,32} Interestingly, the isolates of ribotype 001 showed higher MICs (8–32 mg/L) than 027 isolates (8 mg/L). Although linezolid is not used for the treatment of CDI, linezolid is widely used in the Hospital Civil of Guadalajara for the treatment of nosocomial pneumonia, surgical wound infections, and bloodstream infections not associated with a catheter. Marin *et al.* found nine isolates resistant to linezolid and *cfr*-positive that belonged to the same clonal cluster, suggesting possible horizontal transmission of these strains among patients in their hospital setting.⁹ However, we did not detect the *cfr* gene in any of the selected *C. difficile* isolates.

We also found a high proportion of isolates with elevated MICs to rifampicin in 027 strains (95.2%) and 001 strains (83.3%). In contrast, Tenover *et al.* found lower proportions (27.5%) of isolates with high MIC to rifampicin.²¹ For this antimicrobial agent, a bimodal distribution of MICs has been reported; Noren *et al.* found 80% of strains with low MIC (>0.016 mg/L) or high MIC (>256 mg/L).³³ In our isolates, we detected three previously reported amino acid substitutions in RpoB associated with rifampicin resistance: Arg505Lys, His502Asn, and Ile548Met. Curry *et al.*¹³ reported all three changes, including Arg505Lys, which was present in isolates with MICs >32 mg/L. We also confirmed the importance of this mutation in rifampicin-resistant isolates (OR = 52.5, CI 5.17–532.6, $p=0.000$). Similarly, the authors reported an Ile548Met change in isolates with MICs >32 mg/L, however, in the *C. difficile* strains evaluated in

the present study, this change was not associated with rifampicin resistance ($p=0.074$).

Our study has some limitations. First, we were unable to recover all isolates from all samples, in fact, the recovery rate was low. The low recuperation can be attributed to the medium used, which does not incorporate sodium taurocholate as spore germinant; and the use of ethanol to eliminate any vegetative organisms that survived freezing. Consequently, the isolates are not homogeneously distributed throughout the study period, making it difficult to study distribution over time, and perhaps generating bias on ribotype prevalence; second, clinical diagnosis was not confirmed in a uniform way. Apart from differences in diagnosis, this may have contributed to the low recovery of isolates; and finally, data of ribotyping in 027 and 001 strains were mainly extrapolated from primary results of conventional electrophoresis.

In conclusion, this is the first report on drug susceptibility of *C. difficile* ribotypes circulating in Mexico. Ribotypes 027 and 001 were the most frequent and highly drug resistant; furthermore, we found four isolates with reduced susceptibility to fidaxomicin, raising a concern since this drug is unavailable in Mexican Hospitals. The clinical relevance of these findings needs to be addressed to fully understand the epidemiology of CDI in Mexican hospitals.

Acknowledgment

The authors thank Lucy Acevedo for technical support.

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

- Goorhuis, A., D. Bakker, J. Corver, S.B. Debast, C. Harmanus, D.W. Notermans, A.A. Bergwerff, F.W. Dekker, and E.J. Kuijper. 2008. Emergence of *Clostridium difficile* infection due to a new hypervirulent strain, polymerase chain reaction ribotype 078. *Clin. Infect. Dis.* 47:1162–1170.
- Krutova, M., J. Matejkova, E.J. Kuijper, P. Drevinek, and O. Nyc. 2016. *Clostridium difficile* PCR ribotypes 001 and 176—the common denominator of *C. difficile* infection epidemiology in the Czech Republic, 2014. *Euro. Surveill.* 21:58–68.
- Debast, S.B., M.P. Bauer, and E.J. Kuijper. 2014. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection. *Clin. Microbiol. Infect.* 20 Suppl 2:1–26.
- Louie, T.J., M.A. Miller, K.M. Mullane, K. Weiss, A. Lentnek, Y. Golan, S. Gorbach, P. Sears, and Y.K. Shue. 2011. Fidaxomicin versus vancomycin for *Clostridium difficile* infection. *N. Engl. J. Med.* 364:422–431.
- Spigaglia, P. 2016. Recent advances in the understanding of antibiotic resistance in *Clostridium difficile* infection. *Ther. Adv. Infect. Dis.* 3:23–42.
- Valerio, M., M. Pedromingo, P. Munoz, L. Alcala, M. Marin, T. Pelaez, M. Giannella, and E. Bouza. 2012. Potential protective role of linezolid against *Clostridium difficile* infection. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 39:414–419.
- Huang, H., A. Weintraub, H. Fang, and C.E. Nord. 2009. Antimicrobial resistance in *Clostridium difficile*. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 34:516–522.
- Crawford, T., E. Huesgen, and L. Danziger. 2012. Fidaxomicin: a novel macrocyclic antibiotic for the treatment of *Clostridium difficile* infection. *Am. J. Health. Syst. Pharm.* 69:933–943.
- Marin, M., A. Martin, L. Alcala, E. Cercenado, C. Iglesias, E. Reigadas, and E. Bouza. 2015. *Clostridium difficile* isolates with high linezolid MICs harbor the multiresistance gene *cfr*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59:586–589.
- Lemee, L., A. Dhalluin, S. Testelin, M.A. Mattrat, K. Maillard, J.F. Lemeland, and J.L. Pons. 2004. Multiplex PCR targeting *tpi* (triose phosphate isomerase), *tcdA* (Toxin A), and *tcdB* (Toxin B) genes for toxigenic culture of *Clostridium difficile*. *J. Clin. Microbiol.* 42:5710–5714.
- Freeman, J., J. Vernon, K. Morris, S. Nicholson, S. Todhunter, C. Longshaw, and M.H. Wilcox. 2015. Pan-European longitudinal surveillance of antibiotic resistance among prevalent *Clostridium difficile* ribotypes. *Clin. Microbiol. Infect.* 21:248 e9–248 e16.
- Leeds, J.A., M. Sachdeva, S. Mullin, S.W. Barnes, and A. Ruzin. 2014. In vitro selection, via serial passage, of *Clostridium difficile* mutants with reduced susceptibility to fidaxomicin or vancomycin. *J. Antimicrob. Chemother.* 69:41–44.
- Curry, S.R., J.W. Marsh, K.A. Shutt, C.A. Muto, M.M. O'Leary, M.I. Saul, A.W. Pasculle, and L.H. Harrison. 2009. High frequency of rifampin resistance identified in an epidemic *Clostridium difficile* clone from a large teaching hospital. *Clin. Infect. Dis.* 48:425–429.
- Persson, S., M. Torpdahl, and K.E. Olsen. 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. *Clin. Microbiol. Infect.* 14:1057–1064.
- Persson, S., J.N. Jensen, and K.E. Olsen. 2011. Multiplex PCR method for detection of *Clostridium difficile* *tcdA*, *tcdB*, *cdtA*, and *cdtB* and internal in-frame deletion of *tcdC*. *J. Clin. Microbiol.* 49:4299–4300.
- Bidet, P., F. Barbut, V. Lalande, B. Burghoffer, and J.C. Petit. 1999. Development of a new PCR-ribotyping method for *Clostridium difficile* based on ribosomal RNA gene sequencing. *FEMS Microbiol. Lett.* 175:261–266.
- Cheknis, A.K., S.P. Sambol, D.M. Davidson, K.J. Nagaro, M.C. Mancini, G.A. Hidalgo-Arroyo, J.S. Brazier, S. Johnson, and D.N. Gerding. 2009. Distribution of *Clostridium difficile* strains from a North American, European and Australian trial of treatment for *C. difficile* infections: 2005–2007. *Anaerobe.* 15:230–233.
- Morfin-Otero, R., E. Garza-Gonzalez, S.A. Aguirre-Diaz, R. Escobedo-Sanchez, S. Esparza-Ahumada, H.R. Perez-Gomez, S. Petersen-Morfin, E. Gonzalez-Diaz, A. Martinez-Melendez, and E. Rodriguez-Noriega. 2016. *Clostridium difficile* outbreak caused by NAP1/BI/027 strain and non-027 strains in a Mexican hospital. *Braz. J. Infect. Dis.* 20:8–13.
- Camacho-Ortiz A., D. Lopez-Barrera, R. Hernandez-Garcia, A.M. Galvan-De Los Santos, S.M. Flores-Trevino, J.M. Llaca-Diaz, H.J. Maldonado-Garza, F.J. Bosques-Padilla, and E. Garza-Gonzalez. 2015. First report of *Clostridium difficile* NAP1/027 in a Mexican hospital. *PLoS One.* 10: e0122627.
- Snydman D.R., L.A. McDermott, N.V. Jacobus, C. Thorpe, S. Stone, S.G. Jenkins, E.J. Goldstein, R. Patel, B.A. Forbes, S. Mirrett, S. Johnson, and D.N. Gerding. 2015. U.S.-Based National Sentinel Surveillance Study for the Epidemiology of *Clostridium difficile*-Associated Diarrheal

- Isolates and Their Susceptibility to Fidaxomicin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59: 6437–6443.
21. Tenover F.C., I.A. Tickler, and D.H. Persing. 2012. Antimicrobial-resistant strains of *Clostridium difficile* from North America. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56: 2929–2932.
 22. Freeman J., J. Vernon, S. Pilling, K. Morris, S. Nicholson, S. Shearman, C. Longshaw, and M.H. Wilcox. 2017. The ClosER Study: results from a three-year pan-European longitudinal surveillance of antibiotic resistance among prevalent *Clostridium difficile* ribotypes, 2011–2014. *Clin. Microbiol. Infect.* [Epub ahead of print]; DOI: 10.1016/j.cmi.2017.10.008.
 23. Lee J.H., Y. Lee, K. Lee, T.V. Riley, and H. Kim. 2014. The changes of PCR ribotype and antimicrobial resistance of *Clostridium difficile* in a tertiary care hospital over 10 years. *J. Med. Microbiol.* 63: 819–823.
 24. Novak A., P. Spigaglia, F. Barbanti, I. Goic-Barisic, and M. Tonkic. 2014. First clinical and microbiological characterization of *Clostridium difficile* infection in a Croatian University Hospital. *Anaerobe.* 30: 18–23.
 25. Nyc O., M. Krutova, A. Liskova, J. Matejkova, J. Drabek, and E.J. Kuijper. 2015. The emergence of *Clostridium difficile* PCR-ribotype 001 in Slovakia. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 34: 1701–1708.
 26. Goldstein E.J., F. Babakhani, and D.M. Citron. 2012. Antimicrobial activities of fidaxomicin. *Clin. Infect. Dis.* 55 Suppl 2: S143–S148.
 27. Leeds J.A. 2016. Antibacterials developed to target a single organism: mechanisms and frequencies of reduced susceptibility to the novel anti-*Clostridium difficile* compounds fidaxomicin and LFF571. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 6: a025445.
 28. Goldstein E.J., D.M. Citron, P. Sears, F. Babakhani, S.P. Sambol, and D.N. Gerding. 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. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55: 5194–5199.
 29. Adler A., T. Miller-Roll, R. Bradenstein, C. Block, B. Mendelson, M. Parizade, Y. Paitan, D. Schwartz, N. Peled, Y. Carmeli, and M.J. Schwaber. 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. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 83: 21–24.
 30. Ammam F., D. Meziane-Cherif, D. Mengin-Lecreulx, D. Blanot, D. Patin, I.G. Boneca, P. Courvalin, T. Lambert, and T. Candela. 2013. The functional *vanGCd* cluster of *Clostridium difficile* does not confer vancomycin resistance. *Mol. Microbiol.* 89: 612–625.
 31. Cheng J.W., M. Xiao, T. Kudinha, F. Kong, Z.P. Xu, L.Y. Sun, L. Zhang, X. Fan, X.L. Xie, and Y.C. Xu. 2016. Molecular Epidemiology and Antimicrobial Susceptibility of *Clostridium difficile* Isolates from a University Teaching Hospital in China. *Front. Microbiol.* 7: 1621.
 32. Freeman J., S. Pilling, J. Vernon, and M.H. Wilcox. 2017. In vitro activities of MCB3681 and eight comparators against *Clostridium difficile* isolates with known ribotypes and diverse geographical spread. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61: pii: e02077-16.
 33. Noren T., I. Alriksson, T. Akerlund, L.G. Burman, and M. Unemo. 2010. In vitro susceptibility to 17 antimicrobials of clinical *Clostridium difficile* isolates collected in 1993–2007 in Sweden. *Clin. Microbiol. Infect.* 16:1104–1110.

Address correspondence to:
 Elvira Garza-González, PhD
 Servicio de Gastroenterología
 Universidad Autónoma de Nuevo León
 Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”
 Avenida Francisco I. Madero S/N
 Colonia Mitras Centro
 Monterrey CP 64460
 México

E-mail: elvira_garza_gzz@yahoo.com