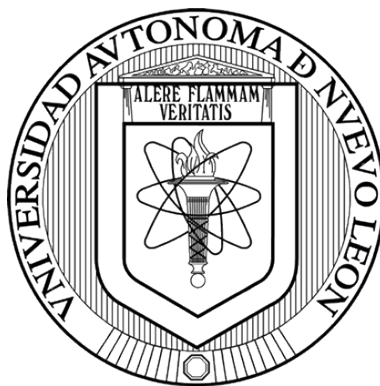


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



FARMACORRESISTENCIA EN AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE *Clostridium*

difficile ASOCIADOS A LOS GENES DE RESISTENCIA

cfr, rpoB Y rpoC.

POR

QCB. HUGO SÁNCHEZ ALANÍS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

DICIEMBRE, 2017

“Farmacorresistencia en aislamientos clínicos de *Clostridium difficile* asociados a los genes de resistencia *cfr*, *rpoB* y *rpoC*.”

Comité de Tesis

Dra. Licet Villarreal Treviño
Presidente

Dra. Elvira Garza González
Secretario

Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales
Vocal

Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna
Vocal

Dr. Juan Francisco Contreras Cordero
Vocal

AGRADECIMIENTOS

A la Subdirección de posgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas por la facilidad para la realización de mis estudios.

Agradezco a mis papás con mucho cariño: *Armandina Alanís Ayala* y *José Luz Sánchez de la Torre* por enseñarme a seguir mis sueños, ser fuerte ante las situaciones que se presenta a lo largo de nuestro recorrido por la vida y por los consejos dados. A mi hermana *Cecilia Sánchez Alanís* por aguantarme con todo el estrés acumulado.

A la *Dra. Licet Villarreal Treviño* por siempre recibirme con una sonrisa, por su paciencia y por todo el apoyo brindado.

Agradezco profundamente a la *Dra. Elvira Garza González* por la oportunidad brindada para hacer posible un logro más en mi vida profesional, por todo el apoyo, comprensión, conocimientos, consejos y confianza, muchas gracias.

A mi comité de tesis por la dedicación, apoyo y amabilidad: a la *Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales*, al *Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna* y al *Dr. Juan Francisco Contreras Cordero*.

Agradezco también a la *Dra. Samantha Flores*, a la *Dra. Soraya Mendoza*, a la *Dra. Paola Bocanegra*, por los consejos brindados y a *TLC María de la Luz Duarte* por su apoyo y consejos.

A mi compañero *MC. Adrián Martínez* por el apoyo y conocimiento compartido, para un mejor trabajo.

A mis amigas *Laura Tijerina* y *Dianelys Sotolongo* por hacer que el tiempo volará, compartirme sus conocimientos, echarme muchas porras y compartir travesuras. Las quiero mucho amigas.

Agradezco a mis compañeras de laboratorio, *Flora Cruz*, *Abril Herrera*, *Verónica Villarreal* por compartir un poco de su tiempo, su apoyo personal y profesional. Muchas gracias.

Y a todas las personas que me dieron una palabra de aliento para que no dejara de seguir mis sueños, en especial a mis amigos *Gissel Robles*, *Nora Martínez* y *Hugo Salazar* y además a mis compañeros y amigos del Laboratorio Central del Hospital Universitario.

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a mis dos pilares

A MI MADRE: Armandina Alanís Ayala

A MI PADRE: José Luz Sánchez de la Torre

Hugo

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	ii
DEDICATORIA	iii
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE IMÁGENES	viii
LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS	ix
RESUMEN.....	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	2
2.1 Generalidades y antecedentes históricos.....	2
2.2 Características microbiológicas y hábitat.....	2
2.3 Factores de virulencia	3
2.3.1 Toxinas.....	3
2.3.2 Adhesinas.....	4
2.3.3 Esporas.....	4
2.3.4 Transmisión de <i>C. difficile</i>	5
2.4 Espectro de infecciones.....	5
2.4.1 Diarrea leve.....	5
2.4.2 Colitis pseudomembranosa.....	5
2.4.3 Colitis fulminante	6
2.4.4 Recurrencias.....	6
2.5 Factores de riesgo.....	6
2.6 Epidemiología	7
2.7 Tratamiento y farmacorresistencia.....	8

2.8 Genes asociados a farmacorresistencia	9
3. JUSTIFICACIÓN	11
4. HIPÓTESIS	12
5. OBJETIVOS	13
5.1 Objetivo general	13
5.2 Objetivos particulares.....	13
6. MATERIAL Y MÉTODOS	14
6.1 Estrategia general	14
6.2 Población de estudio e información clínica y demográfica	14
6.3 Cultivo de <i>C. difficile</i>	14
6.4 Identificación fenotípica.	15
6.5 Identificación molecular.....	15
6.5.1 Extracción del ADN genómico.....	15
6.5.2 Identificación molecular de <i>C. difficile</i>	16
6.5.3 Determinación de toxinas.	16
6.6 Perfil de susceptibilidad antibióticos.	18
6.7 Amplificación de genes de resistencia a antibióticos.....	18
6.7.1 Amplificación de <i>cfr</i> (Linezolid).	18
6.7.2 Amplificación de <i>rpoB</i> (Rifampicina).	19
6.7.3 Amplificación de <i>rpoB</i> (Fidaxomicina).	19
6.7.4 Amplificación de <i>rpoC</i> (Vancomicina).	20
6.8 Purificación de fragmentos a secuenciar.....	20
6.9 Secuenciación de productos de PCR.....	21
6.10 Análisis estadístico.....	21
7. RESULTADOS	22

7.1 Población de estudio	22
7.2 Identificación del genotipo toxigénico de <i>C. difficile</i>	25
7.3 Perfil de susceptibilidad a antibióticos.....	25
7.4 Análisis de gen <i>cfr</i>	26
7.5 Amplificación y Secuenciación de un fragmento de <i>rpoB</i>	27
7.6 Amplificación y Secuenciación de un fragmento de <i>rpoC</i>	28
7.7 Análisis de secuencias.....	29
7.7.1 Secuencia <i>rpoB</i> (Rifampicina).....	29
7.7.2 Secuencia <i>rpoB</i> (Fidaxomicina).....	29
7.7.3 Secuencia <i>rpoC</i> (Vancomicina)	29
8. DISCUSIÓN	33
9. CONCLUSIONES	37
10. PERSPECTIVAS	39
11. BIBLIOGRAFÍA	40

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Iniciadores para determinación toxigénica de <i>C. difficile</i> .	17
2. Características de los pacientes con infección por <i>C. difficile</i> (ICD) (n=128)	23
3. Exposición a fármacos en pacientes con infección por <i>C. difficile</i> (ICD) previo a aislamiento. (n=128)	24
4. Distribución de genotipos de <i>tcdA</i> , <i>tcdB</i> , <i>cdt</i> y deleciones de <i>tcdC</i> en aislamientos de <i>C. difficile</i> . (n=128)	25
5. Perfil de susceptibilidad a antibióticos de los aislamientos de <i>C. difficile</i> . (n=128).	26
6. Distribución de las mutaciones encontradas en los genes <i>rpoB</i> y <i>rpoC</i> asociados a resistencia a antibióticos en <i>C. difficile</i> .	30

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Amplificación del gen <i>rpoB</i> fragmento analizado de 486pb para rifampicina en gel de agarosa 1%. M: Marcador de peso molecular (100 a 10,000pb). C+: Control positivo. Carriles 1 al 7: Muestras de pacientes.	27
2. Amplificación del gen <i>rpoB</i> fragmento analizado de 407pb para fidaxomicina en gel de agarosa al 1%. M: marcador de peso molecular (100 a 10,000pb). C+: control positivo. Carriles 1 al 7: Muestras de pacientes	28
3. Amplificación del gen <i>rpoC</i> fragmento analizado de 480pb para vancomicina en gel de agarosa al 1%. M: marcador de peso molecular (200 a 10000 pb). C+: Control positivo. Carriles 1 al 12: Muestras de pacientes. C-: Control negativo.	28

LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
BLAST	Herramienta Básica de Búsqueda de Alineación Local
CDC	Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades
CDT	<i>Clostridium difficile</i> transferasa
<i>cfr</i>	Resistencia a cloranfenicol-florfenicol
CIM	Concentración mínima inhibitoria
CLSI	Instituto Estándares Clínicos y de Laboratorio
EUCAST	Comité Europeo de Ensayos de Susceptibilidad Antimicrobiana
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos
IBP	Inhibidores de bomba de protones.
ICD	Infección por <i>Clostridium difficile</i>
n	Tamaño de muestra.
NAM	Acido <i>N</i> -acetilmurámico
OR	<i>Odds ratio</i>
Paloc	Locus de patogenicidad
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
rARN	Ácido ribonucleico ribosomal
<i>rpoB</i>	Subunidad beta de la ARN polimerasa dirigida por ADN
<i>rpoC</i>	Subunidad beta prima de la ARN polimerasa dirigida por ADN
TE	Tris, EDTA
<i>tpi</i>	Triosa fosfato isomerasa
Tris	2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
Δ	Delección

RESUMEN

Clostridium difficile es el principal agente causal de diarrea en pacientes hospitalizados y en los últimos reportes a nivel mundial se describe como el microorganismo aislado con mayor frecuencia de las infecciones asociadas a la atención de la salud, sus factores de virulencia contribuyen a impacto que este microorganismo tiene sobre la salud del paciente al presentarse cuadros que van desde diarreas leves hasta colitis fulminante. **Objetivo.** Determinar el perfil de susceptibilidad a los antibióticos y los genes asociados a la farmacorresistencia en aislamientos clínicos de *C. difficile*. **Métodos.** Se analizó los perfiles de resistencia de 128 aislamientos clínicos de *C. difficile* y se estudió la presencia del gen *cfr* mediante PCR de punto final y mediante la secuenciación de productos de PCR se estudiaron las mutaciones relacionadas con la resistencia a vancomicina, rifampicina y reducción de la susceptibilidad a fidaxomicina. **Resultados.** Se encontró una alta resistencia a antibióticos como quinolonas, clindamicina, eritromicina y vancomicina. Ninguno de los aislamientos presentó el gen *cfr*, se observaron mutaciones en el fragmento del gen *rpoB* para rifampicina en el 95% de los aislamientos resistentes estudiados y diferentes polimorfismos en el fragmento *rpoB* estudiado para fidaxomicina, además para *rpoC* se observaron diferentes polimorfismos no relacionados con resistencia a vancomicina previamente. **Conclusiones.** La resistencia a linezolid en los aislamientos de *C. difficile* está dada por un mecanismo distinto a la presencia de *cfr*. La resistencia a rifampicina en los aislamientos de *C. difficile* se relaciona con la presencia de una mutación en Arg505Lys en el gen *rpoB*. La susceptibilidad reducida a fidaxomicina no se relacionó con la mutación Gln1073Arg, ni con otras mutaciones encontradas en *rpoB*. La resistencia a vancomicina no se relacionó con la mutación Asp244Tyr, ni con otras mutaciones en *rpoC*.

ABSTRACT

Clostridium difficile is the main causative agent of diarrhea in hospitalized patients and in recent reports worldwide it is described as the most frequently isolated microorganism associated with health care infections, its virulence factors contribute to the impact that this microorganism has on the patient's health when presenting pictures ranging from mild diarrhea to fulminant colitis. **Objective.** To determine the susceptibility profile to antibiotics and genes associated with drug resistance in clinical isolates of *C. difficile*. **Methods.** The resistance profiles of 128 clinical isolates of *C. difficile* were analyzed, the presence of the *cfr* gene was analyzed by end-point PCR, and by PCR product sequencing the mutations related to resistance to vancomycin, rifampicin and reduction of susceptibility to fidaxomicin. **Results.** High resistance to antibiotics such as quinolones, clindamycin, erythromycin and vancomycin was found. None of the isolates presented the *cfr* gene, mutations were observed in the *rpoB* gene fragment for rifampicin in 95% of the resistant isolates studied and different polymorphisms in the *rpoB* fragment studied for fidaxomicin, in addition to *rpoC* different polymorphisms were observed that were not related to resistance to vancomycin previously. **Conclusions.** The resistance to linezolid in the *C. difficile* isolates is given by a mechanism other than the presence of *cfr*. Resistance to rifampicin in isolates of *C. difficile* is related to the presence of a mutation in Arg505Lys in the *rpoB* gene. The reduced susceptibility to fidaxomicin was not related to the Gln1073Arg mutation, nor to other mutations found in *rpoB*. Vancomycin resistance was not related to the Asp244Tyr mutation, nor to other mutations in *rpoC*.

1. INTRODUCCIÓN

Clostridium difficile es una bacteria Gram positiva, anaerobia estricta y productora de esporas, aunque puede no causar problemas en la población en general este microorganismo es el principal agente causal de diarrea en pacientes hospitalizados que van desde diarreas leves hasta colitis fulminante y muerte.

La incidencia de infección por *C. difficile* (ICD) se ha incrementado en los últimos años a nivel mundial asociado a la aparición de cepas hipervirulentas, además de que se han mejorado los métodos para su diagnóstico y el uso indiscriminado de antibióticos.

Existen diferentes factores de riesgo para el desarrollo de ICD, el principal es la administración de antibióticos de amplio espectro, y a nivel mundial se han encontrado cepas de *C. difficile* que presentan resistencia a distintos grupos de antibióticos de manera histórica a clindamicina, de forma intrínseca a cefalosporinas y quinolonas recientemente relacionado con cepas hipervirulentas ribotipo 027, entre otros que se relacionan principalmente con genes que codifican distintas proteínas capaces de modificar o proteger el sitio de acción del antibiótico.

Alrededor del mundo se cuentan con distintos reportes donde se enfocan al estudio de estos principales mecanismos por los que un antibiótico no funciona de manera correcta contra *C. difficile*.

Sin embargo, en México no se cuenta con reportes sobre genes de resistencia a antibióticos en *C. difficile*, resultando de gran importancia al ser un riesgo para la colonización del paciente, por lo que este trabajo se centró en estudiar los genes de resistencia presentes en aislamientos clínicos de dos hospitales de tercer nivel de México de los estados de Nuevo León y Jalisco respectivamente.

2. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades y antecedentes históricos

Clostridium difficile fue descrita por primera vez en 1935 como parte de la microbiota intestinal en los recién nacidos (Rupnik *et al.* 2009) por Hall y O'Toole como una bacteria difícil de cultivar y de lento crecimiento en el cultivo (Portillo *et al.* 2002). En 1978 se relacionó por primera vez como agente causal de colitis pseudomembranosa asociado a antibioticoterapia (Rodríguez *et al.* 2012).

2.2 Características microbiológicas y hábitat

C. difficile es un bacilo Gram positivo esporulado y anaerobio estricto; las células vegetativas de *C. difficile* miden de 3.0 a 16.9 µm de largo y 0.5 a 1.9 µm de ancho y sus esporas son ovaladas subterminales; fermenta glucosa, manitol, manosa y xilosa; es negativo para lipasa y lecitinasa (Hatheway 1990).

C. difficile es un organismo heterótrofo con una temperatura de crecimiento óptima de 37 °C. La mayor parte de las cepas son móviles ya que poseen flagelos peritricos. Las colonias de *C. difficile* después de 48 h de incubación en condiciones anaerobias a 37 °C son típicamente grandes, planas y ligeramente gris y produce p-cresol que les otorga un olor sui géneris (Levett 1984).

El hábitat de *C. difficile* es muy variado ya que la formación de esporas le permite la supervivencia en aguas, suelos y en ambientes hospitalarios, donde puede permanecer durante años (Zea y Salazar 2012).

2.3 Factores de virulencia

Entre los factores de virulencia de *C. difficile* se han descrito tres tipos de toxinas: la toxina A, la B y la toxina binaria (CDT), además de la producción de adhesinas y la esporulación propia de este microorganismo.

2.3.1 Toxinas

C. difficile tiene la capacidad de producir dos toxinas, las cuales son codificadas por genes que se localizan en el locus de patogenicidad (*PaLoc*), la cual es una región que consta de 19.6 Kb y que integra los genes *tcdA*, *tcdB*, *tcdC*, *tcdE* y *tcdR*. Los genes *tcdA* y *tcdB* codifican las toxinas *TcdA* y *TcdB* que son capaces de expresarse en la fase tardía y en estacionaria del crecimiento. El gen *tcdR* actúa como regulador positivo para la expresión de *tcdA*, *tcdB* y *tcdC* como regulador negativo evitando la expresión del locus de patogenicidad y *tcdE* se encarga de liberación de las toxinas al funcionar como una holina formando poros en la membrana (Rodríguez *et al.* 2012).

La enterotoxina A con peso molecular 308 kDa es la encargada de reclutar factores que funcionan como mediadores de inflamación, tales como la interleucina 6 (IL-6), IL8 por las células intestinales y por los monocitos IL-1, IL 6, IL8 y Factor de necrosis tumoral (TNF) alfa. La citotoxina B 269.6 kDa es esencial para la virulencia. Ambas toxinas cuentan con actividad glucosiltransferasas, interrumpiendo las fibras de actina del citoesqueleto disminuyendo la resistencia transepitelial, la acumulación de líquido. Esto ocasiona destrucción del epitelio intestinal (Rodríguez *et al.* 2012).

Algunas cepas de *C. difficile* son portadoras de una transferasa (CDT) denominada también toxina binaria, formada por dos subunidades *CdtA* y *CtdB*, las cuales son reguladas por la expresión de *cdtR*. Los genes para esta toxina se encuentran en el locus *Cdt* (*CdtLoc*) de aproximadamente 6.2 Kb. Como en otras toxinas AB, *CtdB* se une a la

célula hospedera la que permite la translocación al interior de *CdtA*. Esta toxina interviene en el incremento de la adhesión y actúa a nivel de citoesqueleto ocurriendo una mayor pérdida de líquidos (Rodríguez *et al.* 2012). Además, su presencia puede relacionarse con tasas de mortalidad más altas respecto a las que no contiene esta toxina (Bacci S *et al.* 2011)

2.3.2 Adhesinas

Las adhesinas son factores que las bacterias producen para adherirse efectivamente a las células del hospedero, *C. difficile* puede tener adhesión con la mucosa intestinal del ser humano está mediada por componentes proteicos.

El gen *cwp66* codifica la proteína Cwp66 (66 kDa), la cual está asociada a la superficie celular de *C. difficile* y contiene dos dominios que funcionan como adhesinas (Waligora *et al.* 2001).

También se ha descrito a *Fbp68*, de 68 KDa, que permite la adhesión a fibronectina, glicoproteína encontrada en los fluidos corporales y en la matriz extracelular de los vertebrados; su función podría ser la de adherir el bacilo a la matrix extracelular, fibrinógeno, colágeno y vitronectina (Hennequin 2003).

2.3.3 Esporas

Las esporas de *C. difficile* son metabólicamente inactivas y pueden persistir en el ambiente por largos periodos de tiempo. Las esporas presentan un factor CdeC, el cual está involucrado en la resistencia de la espora al calor, etanol y lisozima. Además, las esporas son resistentes a los desinfectantes utilizados en el ambiente intrahospitalario y a los antimicrobianos de elección para el tratamiento de ICD (Barra *et al.* 2014).

2.3.4 Transmisión de *C. difficile*

La transmisión de *C. difficile* es por vía fecal-oral, por lo que el personal de salud, el material médico y las superficies con esporas son una importante fuente de infección en el ambiente intrahospitalario (Zea y Salazar, 2012). Por lo anterior, si paciente no infectado entra en contacto con las esporas en el entorno hospitalario y con el personal de salud, después de recibir antibióticos de manera prolongada, se encuentra en mayor riesgo de desarrollar ICD. Si la cepa de *C. difficile* no es toxigénica o se tiene respuesta de inmunoglobulinas G en contra de la toxina A, los pacientes serán colonizados por *C. difficile* sin presencia de síntomas de infección. Por el contrario, si la cepa adquirida es toxigénica y no hay respuesta inmunitaria contra la toxina A el paciente colonizado desarrollará cuadros clínicos clásicos de ICD (Rupnik *et al.* 2009).

Cabe destacar que en personas adultas puede encontrarse como microbiota normal en el intestino, lo cual representa un riesgo para la diseminación del microorganismo (Rodríguez *et al.* 2012).

2.4 Espectro de infecciones

2.4.1 Diarrea leve

La diarrea leve es la manifestación menos grave de la ICD; se asocia con el 20% de las diarreas con tratamiento antibiótico (Briceño *et al.* 2000). Las heces casi nunca muestran sangre, aunque sí mucosidad, y su consistencia va de blanda hasta acuosa o mucosa. Los signos clínicos y de laboratorio son fiebre, dolor abdominal, leucocitosis importante, hipoalbuminemia y aumento de la proteína C reactiva (Rodríguez *et al.* 2012).

2.4.2 Colitis pseudomembranosa

Se presenta de forma sistemática, con dolor abdominal, fiebre y diarrea acuosa que puede ir acompañada de sangre, altos niveles de glóbulos blancos mayores o igual a 20,000 leucocitos/mm³, hipoalbuminemia y se caracteriza por lesiones con eritema,

edema, pérdida del patrón vascular, sangrado, y placas amarillentas elevadas de 2 a 10 mm dispersas en la mucosa del colon (Kachrimanidou y Malisiovas 2011).

2.4.3 Colitis fulminante

La colitis fulminante es la manifestación grave y altamente letal de la enfermedad, que aparece aproximadamente en el 3% de los infectados con *C. difficile*. Se caracteriza, además de lo descrito en la colitis pseudomembranosa, por presentar una alteración del estado general del individuo, acompañado por letargo, fiebre, leucocitosis, acidosis láctica, taquicardia, dolor abdominal, tono muscular ausente, íleo paralítico, megacolon tóxico, entre otras manifestaciones. Puede llegar hasta la colectomía e incluso la muerte (Zea y Salazar, 2012).

2.4.4 Recurrencias

Aproximadamente entre un 15-45% de los pacientes tratados de ICD sufren recaídas en un período de 2 meses. Esto se puede deber, además de las constantes alteraciones de la microbiota, a la posible presencia de esporas de la bacteria no erradicadas por el tratamiento y a que la inmunidad que se genera a partir de la primera exposición no es específica, ya que estas reinfecciones pueden ser por cepas diferentes a la inicial (Barbut *et al.* 2000).

2.5 Factores de riesgo

Los factores de riesgo para de la ICD más frecuentes son la exposición a antibióticos, la hospitalización prolongada, la predisposición del huésped, la edad avanzada (más de 65 años), los procedimientos quirúrgicos gastrointestinales y la estancia en unidades de cuidados intensivos.

El 96 % de los casos de ICD se asocia al consumo previo de antibióticos (Becerra, 2011) como lo son clindamicina, cefalosporinas, fluoroquinolonas, ampicilina con amoxicilina, macrólidos, clotrimaxol y tetraciclinas (Lo Vecchio y Zacurb 2012).

La estancia en hospitales y el uso prolongado de antibióticos, puede producir una disbiosis *C. difficile* crece sin la competencia de la microflora normal del intestino causando una ICD (Madigan *et al.* 2012).

2.6 Epidemiología

En el año 2002, se reportó un aumento de los casos de ICD en Norteamérica, inicialmente en Canadá, posteriormente, en Estados Unidos y Europa. Tales casos llevaron a la aparición de un brote causado por una cepa hipervirulenta de *C. difficile*, que en 2005 fue caracterizada como BI/ NAP1/027/toxinotipo III (Zea y Salazar, 2012).

En 2003 se describió en Argentina que de 87 pacientes con sospecha de ICD, el 40% eran positivos para la determinación toxigénica de *C. difficile* (Legaria *et al.* 2003).

En el 2004, describió en Canadá una incidencia de 22,5 por 1.000 casos de diarrea nosocomial asociada a *C. difficile*, con una tasa de mortalidad de 6,9% a los 30 días y de 16,7% al año de haber sido diagnosticados (Loo *et al.* 2004).

En el año 2008 el ribotipo más ampliamente descrito como causante de infección por *C. difficile*, especialmente en Europa, es el ribotipo 001, el cual ha sido asociado a altas tasas de resistencia a antibióticos como eritromicina, ciprofloxacino y moxifloxacino (Borgmann, 2008).

En Países Bajos se describió en el 2008 una nueva cepa hipervirulenta, ribotipo 78 con un incremento en la frecuencia entre 2005 y 2008 del 3 al 13% afectando población joven y asociada a la comunidad (Goorhuis *et al.* 2008).

En Estados Unidos el Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC por sus siglas en inglés) publicó que en 1999 se presentaron 793 muertes causadas por *C. difficile*; mientras que en 2009 se reportaron 7.285 muertes. Para el año 2011, 29,000 pacientes murieron dentro de los 30 días al diagnóstico inicial. (Arnold, 2010).

En México se realizó el primer reporte de *C. difficile* NAP1/027 en un Hospital de Nuevo León (Camacho *et al.* 2015) en el 2015. En 2016 se reportó un brote de ICD en el que el 39% fue positivo para la cepa NAP1 cepa / B1 / 027 (Morfin *et al.* 2016).

2.7 Tratamiento y farmacorresistencia

El tratamiento de la ICD depende de la severidad de la ICD. En la colitis no grave (menos de 4 deposiciones por día y sin signos de colitis grave), si es posible, se puede suspender el tratamiento antibacteriano y observar la respuesta clínica (Bauer *et al.* 2009).

En casos donde la ICD está en episodio inicial, leve o moderado se trata con antibiótico de elección es el metronidazol 250 mg cada 6 h o 500 mg cada 8 h por vía oral durante 10–14 días. Se puede usar la vancomicina, 125 mg cada 6 h por vía oral durante 10 a 14 días si hay falla terapéutica con el metronidazol (Bujandaa y Cosme 2008).

En situaciones graves complicadas se administra vancomicina, 500 mg 4 veces por día por vía oral o por tubo nasogástrico, más metronidazol, 500 mg cada 8 horas por vía intravenosa. Si el paciente presenta recurrencia esta se trata como en el periodo inicial y en una segunda recurrencia se trata con vancomicina con un régimen gradual de dosis interrumpidas.

C. difficile presenta resistencia a las fluoroquinolonas; especialmente en *C. difficile* ribotipos 027, 018 y 126. Un estudio en Europa del 2005 mostró que en el 35.7% de los aislamientos clínicos estudiados presentaban resistencia a moxifloxacino y hasta un 44.4% eran resistentes a eritromicina (Barbut *et al.* 2007).

2.8 Genes asociados a farmacorresistencia

Entre los genes asociados a la farmacorresistencia, se ha estudiado el gen que codifica la subunidad beta de la ARN polimerasa dirigida por ADN *rpoB*, el cual se ha asociado a la resistencia a rifampicina y fidaxomicina. Además, la subunidad beta prima de la ARN polimerasa dirigida por ADN *rpoC* asociado a vancomicina y el gen de resistencia a cloranfenicol-florfenicol *cfr* asociado a resistencia a linezolid (Marín *et al.* 2015).

El linezolid es una oxazolidinona que actúa inhibiendo la síntesis de proteínas a través de la orientación de 23S rRNA. El linezolid presenta buena actividad *in vitro* contra *C. difficile* por lo que es una terapia prometedora. En un estudio se identificaron aislamientos que presentan CMI > 4mg/L, y la resistencia se relacionó con la presencia de el gen *cfr* capaz de codificar una metiltransferasa de rARN (Marín *et al.* 2015).

La rifampicina es perteneciente al grupo de rifamicinas y su mecanismo de acción va dirigido a la DNA polimerasa dependiente de ARN. Se han descrito diferentes mutaciones en el gen *rpoB* relacionadas con la resistencia a este antibiótico Arg505Lys, His502Asn, Tyr, Arg, Ser488Thr, Asp492Asn, y Iso548Met donde se observaron MIC > 256 mg/ L (O'Connor *et al.* 2008).

La fidaxomicina es un nuevo antibiótico macrocíclico que ha sido autorizado para el tratamiento de ICD en adultos. Se trata de un antibiótico bactericida, con actividad frente a la toxina y muy selectivo frente a *C. difficile*. Actúa al inhibir la síntesis de ARN a nivel de la ARN polimerasa bacteriana. Interfiere con la ARN polimerasa en un lugar distinto del de las rifamicinas. La inhibición de la ARN polimerasa clostridial se produce a concentraciones bajas, lo que explica parcialmente la especificidad significativa de su actividad. Asimismo, se ha demostrado que fidaxomicina inhibe la esporulación de *C. difficile in vitro*. Un estudio reciente describe una disminución en la susceptibilidad

antimicrobiana de fidaxomicina frente a *C. difficile* describiendo una mutación puntual Gln1073Arg, encontrándose CIM de 4mg/L (Leeds *et al.* 2014).

La vancomicina es un glucopéptido que se une al dipéptido C-terminal precursor, D-alanil-D-alanina, del NAM-pentapéptido de peptidoglicano (PG) durante la síntesis de PG, por lo que la prevención de transpeptidación reacciones entre cadenas laterales de péptidos adyacentes de cepas PG adyacentes. En géneros como *Staphylococcus* y *Enterococcus* se ha descrito resistencia en este antibiótico se ha descrito ampliamente al poseer un clúster de genes *van* donde su expresión codifica proteínas encargadas de modificar las terminales de PG, sin embargo, se demostró que genes homólogos encontrados *vanG_{cd}* no son los determinantes en la resistencia para vancomicina en *C. difficile*, por lo que la resistencia a este medicamento debe darse por otra vía. Un estudio describe una disminución en la susceptibilidad antimicrobiana de vancomicina frente a *C. difficile* podría estar relacionada con una mutación puntual en el gen *rpoC* en Asp244Tyr (Leeds *et al.* 2014).

3. JUSTIFICACIÓN

C. difficile es el principal agente causal de enfermedad gastrointestinal asociada a la atención de la salud. Esta especie persiste por tiempo prolongado en el ambiente hospitalario, lo que incrementa su transmisión. La infección por *C. difficile* (ICD) se asocia con tasas de morbimortalidad altas. La información generada en este proyecto apoyará al conocimiento del perfil de resistencia antimicrobiano de los aislamientos clínicos de esta especie en nuestra población y los factores genéticos involucrados en la farmacorresistencia de *C. difficile*.

4. HIPÓTESIS

La farmacorresistencia en aislamientos clínicos de *Clostridium difficile* se asocia a los genes de resistencia *rpoB*, *rpoC* y *cfr*.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar el perfil de susceptibilidad a los antibióticos y los genes asociados a la farmacoresistencia en aislamientos clínicos de *C. difficile*.

5.2 Objetivos particulares

- Colectar aislamientos de *C. difficile* a partir de personas con sospecha clínica de ICD.
- Caracterizar el genotipo toxigénico de los aislamientos de *C. difficile*.
- Determinar el perfil de susceptibilidad a antibióticos de *C. difficile*.
- Identificar genes asociados a la resistencia a antibióticos:
 - Presencia de gen *cfr* que confiere resistencia a linezolid.
 - Mutaciones en el gen *rpoB* que confiere resistencia a rifampicina y susceptibilidad reducida a fidaxomicina.
 - Mutaciones en el gen *rpoC* que confiere resistencia a vancomicina.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Estrategia general

Se incluyeron muestras de heces de pacientes con sospecha de ICD recuperadas en un periodo de 2 años. A partir de los cultivos jóvenes se realizó una tinción de Gram para observar las características morfológicas, tintoriales y esporulación. Los aislamientos presuntivos de *C. difficile*, se identificaron por medio de PCR con la amplificación del gen *tpi* (triosa fosfato isómeras), e identificación del perfil toxigénico. Todos los aislamientos identificados como *C. difficile* se sembraron y se les realizó un perfil de susceptibilidad a antibióticos. Posterior a esto se realizó la extracción de material genético por el método de lisis enzimática y, por último, se realizó la amplificación del gen *cfr* y amplificación y secuenciación de los genes de resistencia a los antibióticos; *rpoB*, *rpoC*.

6.2 Población de estudio e información clínica y demográfica

Se estudiaron aislamientos clínicos de *C. difficile*, que se obtuvieron a partir de muestras de heces de pacientes con ICD de dos hospitales de tercer nivel de México.

Además, se recabaron datos clínicos y demográficos de los pacientes a los que se les aisló la bacteria.

6.3 Cultivo de *C. difficile*

Se realizó un proceso de eliminación de la microbiota intestinal y células vegetativas de *C. difficile* mediante la adición en proporciones iguales de volumen de etanol al 96% y muestra de heces (1:1). Esta preparación se incubó a temperatura ambiente por 3 h y posteriormente, se centrifugó por 5 min a 3,000 rpm y el sobrenadante fue descartado. El sedimento fue sembrado en agar sangre pre-reducido y se incubó a 37 °C por 24 a 48 h en cámara de anaerobiosis con una atmosfera de 85% N₂, 10% CO₂, 5% H₂.

6.4 Identificación fenotípica.

Se realizó la observación de las placas de agar sangre, y a las colonias con morfología presuntiva de *C. difficile*, 2-5 mm, con borde irregular, color grisáceo, no hemolíticas se les realizó un Gram. En las colonias que se observaron bacilos Gram positivos esporulados, se continuó el proceso de identificación.

6.5 Identificación molecular.

6.5.1 Extracción del ADN genómico

Se inoculó la cepa de estudio en caldo tioglicolato y se incubó por 24 h en anaerobiosis. Se tomaron 1800 µL del caldo y se transfirió a un tubo Eppendorf y se centrifugó a 13,500 rpm durante 5 min. Se decantó el sobrenadante. Se agregaron 500 µL de Tris-HCl al precipitado y se agitó en vórtex, se centrifugó a 13,500 rpm por 5 min, se eliminó el sobrenadante y se adicionaron 200 µL de Tris-HCl y aproximadamente 150 µg de lisozima. La mezcla se incubó durante 12 a 14 h a 37°C en baño metabólico. Posteriormente se añadieron 200 µL de TE 1X con SDS al 1% y 6 µL de proteinasa K (10mg/ml) y esto se incubó a 55 °C durante 3 h en baño metabólico. Una vez transcurrido el tiempo se adicionaron 250 µL de fenol saturado, 250 µL de SEVAG y 100 µL de TE 1X se agitó por inversión durante 5 min y se centrifugó a 13,500 rpm durante 8 min se transfirió la fase acuosa a otro tubo Eppendorf de 2 ml y se repitió el procedimiento una vez más. Se recuperaron 400 µL de fase acuosa y se le adicionaron 2.33 volúmenes de etanol absoluto frío hasta observar la formación de la hebra de ADN y se dejó precipitar durante 1 h a -20 °C, después se centrifugó 5 min a 13,500 rpm y se decantó todo el sobrenadante, se dejó secar el ADN aproximadamente 12 a 14 h a temperatura ambiente. Una vez seco se resuspendió con 100 µL de TE 1X y se incubó a 65 °C por 15 min en

baño metabólico. Una vez transcurrido el tiempo se conservó a -20 °C hasta su uso. Todo el procedimiento se hizo por duplicado.

6.5.2 Identificación molecular de *C. difficile*

La amplificación del material genético fue realizada en un termociclador Axygen Maxygene II en un volumen final de reacción de 25 µL que contenía 0.5 µM de cada iniciador utilizado; *tpi-F* (5'-AAAGAAGCTACTAAGGGTACAAA-3') y *tpi-R* (5'-CATAATATTGGGTCTATTCCTAC-3'), 200 µM de cada desoxinucleósido trifosfato, y 0.5 U de Taq DNA polimerasa en buffer 1X de amplificación (10 mM Tris-HCl [pH 8.3], 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂).

La amplificación se realizó mediante una desnaturalización inicial a 95 °C durante 3 min, 30 s a 95 °C, alineación 30 s a temperaturas decrecientes de 65 a 55 °C por 11 ciclos (decreciendo 1°C por ciclo) y finalmente la extensión a 72 °C por 30 s, para un total de 40 ciclos. Los productos de PCR fueron observados en geles de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Las esporas de los aislamientos identificados como *C. difficile* se guardaron en caldo glicerol 20% a -80 °C después de 7 días de haberse resembrado.

6.5.3 Determinación de toxinas.

La detección de toxinas se realizó mediante PCR múltiple. La reacción se llevó a un volumen final de 25 µL, que contenía 200 µM de cada desoxinucleósido trifosfato, y 0.5 U de Taq DNA polimerasa en buffer 1X de amplificación (10 mM Tris-HCl [pH 8.3], 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂), los iniciadores y sus concentraciones se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Iniciadores para determinación toxigénica de *C. difficile*.

Gen	Iniciador	Secuencia 5'→3'	[] (μM)	Producto
<i>tcdA</i>	<i>tcdA-F3345</i>	GCATGATAAGGCAACTTCAGTGGTA	0.6	629 pb
	<i>tcdA-R3969</i>	AGTTCCTCCTGCTCCATCAAATG	0.6	
<i>tcdA</i>	<i>tcdB-F5670</i>	CCAAARTGGAGTGTTACAAACAGGTG	0.4	410 pb
	<i>tcdB-R6079A</i>	GCATTTCTCCATTCTCAGCAAAGTA	0.2	
	<i>tcdB-R6079B</i>	GCATTTCTCCGTTTTTCAGCAAAGTA	0.2	
<i>cdtA</i>	<i>cdtA-F739A</i>	GGGAAGCACTATATTTAAAGCAGAAGC	0.05	221 pb
	<i>cdtA-F739B</i>	GGGAAACATTATATTTAAAGCAGAAGC	0.05	
	<i>cdtA-R958</i>	CTGGGTTAGGATTATTTACTGGACCA	0.1	
<i>ctdB</i>	<i>ctdB-F617</i>	TTGACCCAAAGTTGATGTCTGATTG	0.1	262 pb
	<i>ctdB-R878</i>	CGGATCTCTTGCTTCAGTCTTTATAG	0.1	
<i>tcdC</i>	<i>tcdC-F2523</i>	CATGGTTCAAATGAAAGACGAC	0.2	160 pb
	<i>tcdC-R415</i>	GGTCATAAGTAATACCAGTATCATATCCTTTC	0.2	

[] **Concentración del iniciador.**

La amplificación se llevó mediante una desnaturalización inicial a 95 °C durante 3 min, 50 s a 95 °C, alineación 40s a 54°C, extensión a 72 °C por 30 s, para un total de 35 ciclos y una extensión final de 3 min a 72 °C. Los productos de PCR fueron observados en geles de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (Persson *et al.* 2008).

6.6 Perfil de susceptibilidad antibióticos.

El perfil de susceptibilidad antimicrobiana para todos los aislamientos se determinó mediante la estimación de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de antibióticos tomando como puntos de corte los establecido por Instituto Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI por sus siglas en inglés), el Comité Europeo de Ensayos de Susceptibilidad Antimicrobiana (EUCAST), y los no establecidos por estos institutos fueron tomados de publicaciones previas (Curry *et al* 2009; Goldstein *et al.* 2011; Marín *et al.* 2014).

En este estudio se determinó la CMI de clindamicina, eritromicina, tetraciclina, linezolid, moxifloxacino, ciprofloxacino, rifampicina, metronidazol y vancomicina.

Se inocularon las esporas de los aislamientos de *C. difficile* en agar Brazier, se incubaron las placas a 48 h a 37 °C en anaerobiosis, posteriormente se tomaron de 2-3 colonias con las que se inoculó el caldo Schaedler se incubó por 24 h a 37 °C anaerobiosis. Posteriormente se inoculó 1 µL de cada uno de los aislamientos agar Wilkins Chalgren a diferentes concentraciones de cada antibiótico y estos fueron incubados por 48h a 37°C en anaerobiosis y se utilizaron placas sin antibióticos como control (Freeman, *et al* 2005).

6.7 Amplificación de genes de resistencia a antibióticos.

6.7.1 Amplificación de *cfr* (Linezolid).

La amplificación fue realizada en un termociclador Axygen Maxygene II en un volumen final de reacción de 25 µl que contenía; 1.0 µM de cada iniciador utilizado de los iniciadores de *cfr*-Cd-ex-F (5'-TCCTCTACGGCAAACAAACC-3') y *cfr*-Cd-ex-R (5'-GCTCCACTTGAGTGATGCCTA-3'); 200 µM de cada desoxinucleósido trifosfato,

y 0.5 U de Taq DNA polimerasa en buffer 1X de amplificación (10 mM Tris-HCl [pH 8.3], 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂).

La amplificación se realizó mediante una desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min y 30 ciclos de 95 °C durante 30 s, 60 °C durante 45s, y 72 °C durante 45 s y un ciclo final a 72 °C por 5 min. Los productos de PCR se observaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. El producto esperado fue de 786pb.

6.7.2 Amplificación de *rpoB* (Rifampicina).

La amplificación fue realizada en un termociclador Axygen Maxygene II en un volumen final de reacción de 50 µl que contenía; 2.0 µM de cada iniciador utilizado de los iniciadores CDrpoB2F (5'-ATGGAAGCTATAACGCCTCAA-3') y CDrpoB2-R (5'ACAGCACCATTTACAGTTCTA-3'); 400 µM de cada desoxinucleósido trifosfato, y 1.0 U de Taq DNA polimerasa en buffer 1X de amplificación (10 mM Tris-HCl [pH 8.3], 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂).

La amplificación se realizó mediante una desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min y 35 ciclos de 95 °C durante 30 s, 55 °C durante 45 s, y 72 °C durante 45 s, y un ciclo final a 72 °C por 5 min. Los productos de PCR se observaron por electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio. El producto esperado fue de 486pb.

6.7.3 Amplificación de *rpoB* (Fidaxomicina).

La amplificación fue realizada en un termociclador Axygen Maxygene II en un volumen final de reacción de 50 µl que contenía; 2.0 µM de cada iniciador utilizado CdrpoB-FD-F (5'-TCATGGAAAATGGAACACCA-3') y CdrpoB-FD-R (5'-CCAAACCTCCATCTCTCCAA-3') diseñados para este estudio, 400 µM de cada desoxinucleósido trifosfato, y 1.0 U de Taq DNA polimerasa en buffer 1X de amplificación (10 mM Tris-HCl [pH 8.3], 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂).

La amplificación se realizó mediante una desnaturalización inicial a 95 °C durante 3 min, 30 ciclos de 95 °C durante 30 s, 56 °C durante 30 s, y 72 °C durante 30 s, y un ciclo final a 72 °C por 5 min. Los productos de PCR se observaron por electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio. El producto esperado fue de 407 pb.

6.7.4 Amplificación de *rpoC* Vancomicina.

La amplificación fue realizada en un termociclador Axygen Maxygene II en un volumen final de reacción de 50 µl que contenía; 2.0 µM de cada iniciador utilizado de los iniciadores CdrpoC-VAN-F (5'-GAATGGGTGCTGAAGCTGTA-3) y CdrpoC-VAN-R (5'-GACGGAAACGACCTTGCTTA -3') diseñados para este estudio; 400 µM de cada desoxinucleósido trifosfato, y 1.0 U de Taq DNA polimerasa en buffer 1X de amplificación (10 mM Tris-HCl [pH 8.3], 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂).

La amplificación se realizó mediante una desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min, 35 ciclos de 95 °C durante 30 s, 55 °C durante 45 s, y 72 °C durante 45 s, y un ciclo final a 72 °C por 5 min. El producto esperado fue de 480 pb, el cual se detectó en gel de agarosa 1%, teñidos con bromuro de etidio.

6.8 Purificación de fragmentos a secuenciar.

La purificación de los fragmentos amplificados de *rpoB* y *rpoC* realizó mediante la técnica de precipitación con etanol, para lo cual cada producto de PCR (50 µL) se colocó un tubo Eppendorf de 1.5 mL con 5 µL de acetato de sodio 3M a pH 4.6 y 100 µL de etanol al 95°C. Se colocaron los productos de PCR en la mezcla de etanol-acetato de sodio, se agitó en vórtex y se mantuvo a -20 °C por 40 min, una vez transcurrido el tiempo se centrifugó a 13,500 rpm por 20 min. Se aspiró el sobrenadante y fue descartado. Posterior a esto se lavó el precipitado con 300 µL de etanol a 70% agitando con vórtex, se centrifugó 10 min a 4°C a 13,500 rpm, se eliminó el sobrenadante y el sedimento se dejó secar por 12 h a temperatura ambiente. Posterior a esto se resuspendió el producto de PCR en 50 µL

de agua grado PCR, y se observó la integridad y concentración semicuantitativa del fragmento una vez purificado en gel de agarosa al 1%.

6.9 Secuenciación de productos de PCR.

Para la secuenciación, los productos de PCR fueron enviados a MacroGen Inc. en Seúl, Corea del Sur, para su secuenciación en MacroGen3730XL07-16112-010. Las secuencias fueron analizadas mediante la Herramienta Básica de Búsqueda de Alineación Local (BLAST por sus siglas en inglés).

6.10 Análisis estadístico

El análisis de datos se realizó por una prueba exacta de Pearson en el paquete estadístico SPSS versión 20.0.

7. RESULTADOS

7.1 Población de estudio

Se obtuvieron un total de 307 muestras de heces de pacientes con ICD de dos hospitales de tercer nivel de México, en un periodo de 2014 a 2016; en las cuales se aislaron e identificaron 128 aislamientos de *C. difficile* (41.69%, de recuperación).

De los 128 aislamientos de *C. difficile*, el 59.3% (n=76) fueron recuperados de pacientes del estado de Jalisco y el 40.6% (n=52) del estado de Nuevo León.

La media de edad de los pacientes con ICD fue de 45.26 años y el 24.2% de los pacientes tenía diabetes, seguido del 45% que tenían cirugías previas. (Tabla 2).

Se observó leucocitosis de 15.39 ± 3.76 leucocitos $\times 10^3/\text{mm}^3$ y todos los casos tuvieron una estancia hospitalaria mayor de 15 días. La mortalidad atribuible a ICD fue del 10% (Tabla 2).

Tabla 2. Características de los pacientes con infección por *Clostridium difficile* (ICD) (n=128)

Característica	n (%)
Edad (años) (media ± SD)	45. 26 ± 20.15
Enfermedad subyacente	
Diabetes	31 (24.2)
Neoplasia	11 (8.6)
Leucemia	6 (4.7)
Linfoma	3 (2.3)
Virus de Inmunodeficiencia Humana	2(1.6)
Procedimientos previos	
Cirugías previas	58 (45.3)
Cirugía abdominal	22 (17.2)
Valores de Laboratorio	
Leucocitos x 10 ³ /mm ³ (media ± SD)	15.39 ± 3.76
Estancia hospitalaria (días) (media ± SD)	18.3 ± 1.9
Mortalidad	
General	40 (31.2)
Atribuible a ICD	13 (10.2)

Más del 80% de los pacientes tuvo uso previo de antibióticos. Entre ellos las cefalosporinas de 3era generación (45.3%), los carbapenémicos (27.3%) y la clindamicina (23.4%), además de otros fármacos como los inhibidores de bombas de protones (72.2%) (Tabla 3).

Tabla 3. Exposición a fármacos en pacientes con infección por *C. difficile* (ICD) previo a aislamiento. (n=128)

Numero de antibióticos recibidos	Frecuencia n (%)
0	19 (14.8)
1	17 (13.3)
2-4	67 (52.4)
≥5	20 (15.7)
Sin dato	5 (3.9)
Días de exposición (media ± SD)	
13.6 ± 2.2	
Antibióticos previos.	
Cefalosporinas (3era generación)	58 (45.3)
Quinolonas	27 (21.1)
Carbapenémicos	35 (27.3)
Vancomicina	29 (22.7)
Metronidazol	27 (21.1)
Clindamicina	30 (23.4)
Amikacina	7 (5.5)
Antifúngicos	18 (14.1)
Otros	38 (29.7)
Otros fármacos	
Quimioterapia	9 (7.0)
Inhibidores de bomba de protones (IBP)	93 (72.2)
Anti H-2	13 (10.2)
Inmunosupresores	28 (21.9)

7.2 Identificación del genotipo toxigénico de *C. difficile*.

El 100% de los aislamientos contenían los fragmentos buscados de *tcdA* y *tcdB*, con algunas variaciones en la presencia de los genes para las subunidades de la toxina binaria *cdtA* y *cdtB*. Además, se observó la presencia de deleciones en el gen *tcdC* esto de 18 pares de bases en el 71.0% de los aislamientos (Tabla 4).

Tabla 4. Distribución de genotipos de *tcdA*, *tcdB*, *cdt* y deleciones de *tcdC* en aislamientos de *C. difficile*. (n=128)

Genotipo	n (%)
<i>tcdA</i> ⁺ / <i>tcdB</i> ⁺ / <i>cdt</i> ⁺ / <i>tcdC</i> ⁺ Δ(18pb)	91 (71.0)
<i>tcdA</i> ⁺ / <i>tcdB</i> ⁺ / <i>cdt</i> ⁻ / <i>tcdC</i> ⁻ Δ(18pb)	31 (24.2)
<i>tcdA</i> ⁺ / <i>tcdB</i> ⁺ / <i>cdt</i> ⁺ / <i>tcdC</i> ⁻ Δ (18pb)	6 (4.6)
<i>tcdA</i> ⁺ / <i>tcdB</i> ⁺ / <i>cdt</i> ⁻ / <i>tcdC</i> ⁺ Δ(18pb)	0 (0.0)

7.3 Perfil de susceptibilidad a antibióticos.

Los 128 aislamientos de *C. difficile* mostraron alta resistencia a clindamicina, eritromicina (81.3%), linezolid (67.9%), ciprofloxacino (87.5%), moxifloxacino (93.0%), rifampicina (78.5%) y vancomicina (40.6%), así como la aparición de aislamientos con susceptibilidad reducida a fidaxomicina (3.1%). También se encontró que el 100% de los aislamientos fue susceptible a tetraciclina y al antibiótico de primera línea metronidazol (Tabla 5).

Tabla 5. Perfil de susceptibilidad a antibióticos de los aislamientos de *C. difficile*. (n=128).

Antibiótico	Punto de corte mg/L	Rango de trabajo mg/L	MIC ₅₀ mg/L	MIC ₉₀ mg/L	%R	(%)S
Clindamicina ^a	≥ 8	0.5-128	>128	>128	81.3	18.7
Eritromicina ^a	≥ 8	0.25-128	>128	>128	81.3	18.7
Tetraciclina ^a	≥16	0.03-8	0.06	0.13	0.0	100.0
Linezolid ^e	≥4	1-32	4	8	67.9	32.1
Moxifloxacino ^c	≥8	2-128	128	>128	93.0	7.0
Ciprofloxacino ^c	≥32	2-128	32	64	87.5	12.5
Rifampicina ^b	≥32	0.001-128	>128	>128	78.1	21.9
Metronidazol ^a	≥32	0.06-16	1	2	0.0	100.0
Vancomicina ^c	>2	0.5-8	2	4	40.6	59.4
Fidaxomicina ^d	≥16	0.002-128	0.016	0.060	3.1*	96.9

*Sensibilidad reducida (2-4mg/L)

a: CLSI; 2016 b: Curry *et al.* 2009; c: EUCAST 2017; d: Goldstein *et al.* 2011; e: Marín *et al.* 2014.
R: resistentes. S: susceptibles.

7.4 Análisis de gen *cfr*

Se realizó la búsqueda de *cfr* en aislamientos seleccionados con altos CMI y aislamientos con bajos CIM. Se analizaron 9 aislamientos de *C. difficile* para *cfr* 5 con CMI de 32mg/L y 4 con 16 mg/L y 17 aislamientos más con CMI de 1 mg/L.

No se observó la presencia del gen *cfr* en ninguno de los 26 aislamientos analizados por PCR de punto final, tanto en cepas con alto CMI como en cepas con bajo CMI.

7.5 Amplificación y Secuenciación de un fragmento de *rpoB*.

Se seleccionaron 37 aislamientos de *C. difficile* para la amplificación y purificación del gen *rpoB* un fragmento de 486 pb (Figura 1). Para la evaluación de las mutaciones en aislamientos resistentes se seleccionaron 22 con CMI ≥ 128 mg/L y 15 aislamientos con CMI de 0.001 a 0.125 mg/L para rifampicina.

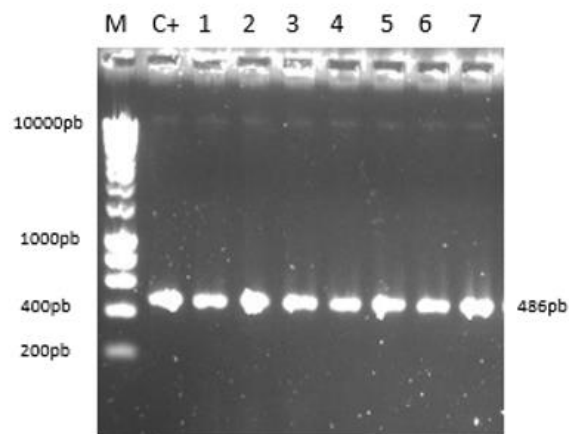


Figura 1. Amplificación del gen *rpoB* fragmento analizado de 486pb para rifampicina en gel de agarosa 1%. M: Marcador de peso molecular (100 a 10,000pb). C+: Control positivo. Carriles 1 al 7: Muestras de pacientes.

También para este mismo gen *rpoB* se seleccionaron 21 aislamientos para la amplificación y purificación de un fragmento de 407 pb (Figura 2). De éstos, 3 presentaron una reducción en la susceptibilidad a fidaxomicina con una CMI de 2mg/L y los 18 restantes presentaron CMI de 0.002 a 0.008 mg/L.

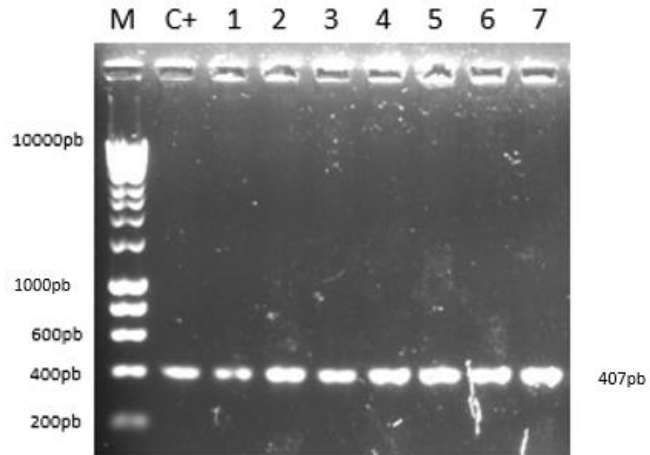


Figura 2. Amplificación del gen *rpoB* fragmento analizado de 407pb para fidaxomicina en gel de agarosa al 1%. M: marcador de peso molecular (100 a 10,000pb). C+: control positivo. Carriles 1 al 7: Muestras de pacientes

7.6 Amplificación y Secuenciación de un fragmento de *rpoC*.

Para observar si se presentaba algún cambio de secuencia con la que se pudiera relacionar la resistencia a vancomicina se seleccionaron 26 aislamientos de *C. difficile*. De éstos, 14 presentaron CMI de 0.5 a 2 mg/L, lo 12 restantes CMI de 4 a 8 mg/L (Figura 3).

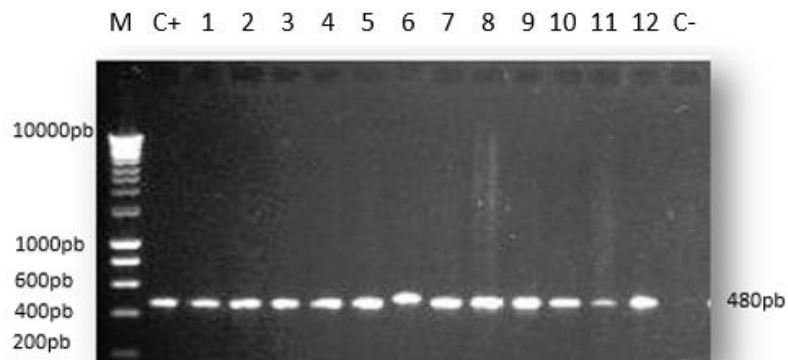


Figura 3. Amplificación del gen *rpoC* fragmento analizado de 480pb para vancomicina en gel de agarosa al 1%. M: marcador de peso molecular (200 a 10000 pb). C+: Control positivo. Carriles 1 al 12: Muestras de pacientes. C-: Control negativo.

7.7 Análisis de secuencias.

7.7.1 Secuencia *rpoB* (Rifampicina)

En las secuencias analizadas mediante BLAST, se detectaron 3 polimorfismos con cambio de aminoácido en 502, 505 y 548 (Tabla 6). La mutación Arg505Lys es predisponente para la resistencia a rifampicina (OR:52.5 IC (5.17- 532.6), p: 0.000) ésta se encontró en el 95.4% de los aislamientos resistentes y 28.5% de los sensibles.

7.7.2 Secuencia *rpoB* (Fidaxomicina)

Para fidaxomicina no se detectó el polimorfismo Gln1073Arg previamente reportado como asociado a la susceptibilidad reducida a este antibiótico.

En el fragmento analizado se detectaron polimorfismos asociados a cambio de aminoácido en Glu1037Gln, tanto en aislamientos sensibles como resistentes. Además de 6 polimorfismos en distintas posiciones entre 966 y 1049 sin cambio de aminoácido presentes tanto en cepas sensibles a fidaxomicina como resistentes. Al realizar el análisis se encontró un OR 0.4 (0.027-5.9), $p > 0.05$, por lo que no son predisponentes para la susceptibilidad reducida encontrada en los aislamientos (tabla 6).

7.7.3 Secuencia *rpoC* (Vancomicina)

Para vancomicina no se detectó el polimorfismo Asp244Tyr previamente reportado como asociado a la resistencia a vancomicina; Sin embargo, aparecen en el fragmento analizado otros polimorfismos dos con cambio de aminoácido en Glu1037Gln tanto en aislamientos sensibles a vancomicina como resistentes. Se encontraron 20 polimorfismos diferentes Lys265Asn y Phe294Leu e en aislamientos sensibles a vancomicina, además a lo largo del fragmento analizado se encontraron veinte polimorfismos sin cambio de aminoácido (tabla 6).

Tabla 6. Distribución de las mutaciones encontradas en los genes *rpoB* y *rpoC* asociados a resistencia a antibióticos en *C. difficile*.

Antibiótico	Gen	Polimorfismo	Codón	Cambio de aminoácido	Susceptible	Resistente	OR (IC95%), p
Linezolid	<i>cfr</i>			Cepa tipo	17/17 (0.0)	9/9 (0.0)	
Rifampicina	<i>rpoB</i>	<u>AG</u> A→ <u>AA</u> A	505	Arg505Lys	4/14 (28.5)	21/22 (95.4)	52.5 (5.17- 532.6), 0.000
		<u>C</u> AT→ <u>A</u> AT	502	His502Asn	0/14 (0.0)	8/22 (36.3)	NC
		<u>AT</u> A→ <u>AT</u> G	548	Ile548Met	4/14 (28.5)	13/22 (59.0)	3.6 (0.85-15.10), 0.074
		Cepa tipo			10/14(71.5)	1/22 (4.5)	
Fidaxomicina	<i>rpoB</i>	<u>C</u> AA→ <u>C</u> GA	1073	Gln1073Arg	0/18 (0.0)	0/3 (0.0)	
		<u>G</u> AG→ <u>C</u> AC	1036	Glu1036Gln	15/18(83.3)	2/3 (66.7)	0.4 (0.027-5.9), 0.489
		<u>G</u> GG→ <u>G</u> GA	1020	Ninguno	15/18(83.3)	2/3 (66.7)	0.4 (0.027-5.9), 0.489
		<u>C</u> TA→ <u>T</u> TA	966	Ninguno	15/18(83.3)	2/ 3(66.7)	0.4 (0.027-5.9), 0.489
		<u>G</u> AC→ <u>G</u> AT	965	Ninguno	15/18(83.3)	2/3 (66.7)	0.4 (0.027-5.9), 0.489
		<u>A</u> AC→ <u>A</u> AT	1040	Ninguno	15/18(83.3)	2/3 (66.7)	0.4 (0.027-5.9), 0.489
		<u>T</u> AC→ <u>T</u> AT	1048	Ninguno	15/18(83.3)	2/3 (66.7)	0.4 (0.027-5.9), 0.489
		<u>A</u> TT→ <u>A</u> TC	980	Ninguno	15/18(83.3)	2/3 (66.7)	0.4 (0.027-5.9), 0.489
Cepa tipo				3/18 (16.7)	1/3 (33.3)		

Vancomicina	<i>rpoC</i>	<u>GAT</u> → <u>TAT</u>	244	Asp244Tyr	0/14(0.0)	0/12(0.0)	NC
		<u>AAG</u> → <u>AAT</u>	265	Lys265Asn	1/14 (7.1)	0/12 (0.0)	NC
		<u>TTC</u> → <u>TTA</u>	294	Phe294Leu	1/14 (7.1)	0/12 (0.0)	NC
		<u>AAG</u> → <u>AAA</u>	175	Ninguno	5/14 (35.7)	11/12 (91.7)	19.8 (1.94-201.63) 0.004
		<u>AAG</u> → <u>AAA</u>	217	Ninguno	4/14 (28.5)	11/12 (91.7)	27.5 (2.61- 289.14), 0.004
		<u>GAG</u> → <u>GAA</u>	184	Ninguno	4/14 (28.5)	11/12 (91.7)	27.5 (2.61- 289.14), 0.004
		<u>GAG</u> → <u>GAA</u>	193	Ninguno	4/14 (28.5)	11/12 (91.7)	27.5 (2.61- 289.14), 0.004
		<u>GAG</u> → <u>GAA</u>	213	Ninguno	4/14 (28.5)	11/12 (91.7)	27.5 (2.61- 289.14), 0.004
		<u>GGG</u> → <u>GGA</u>	199	Ninguno	4/14 (28.5)	11/12 (91.7)	27.5 (2.61- 289.14), 0.004
		<u>GCG</u> → <u>GTC</u>	192	Ninguno	2/14 (14.2)	0/12 (0.0)	NC
		<u>GCG</u> → <u>GCA</u>	249	Ninguno	4/14 (28.5)	11/12 (91.7)	27.5 (2.61- 289.14), 0.004
		<u>CCA</u> → <u>CCG</u>	234	Ninguno	4/14 (28.5)	11/12 (91.7)	27.5 (2.61- 289.14), 0.004
		<u>CAA</u> → <u>CAG</u>	200	Ninguno	2/14 (14.2)	0/12 (0.0)	NC
		<u>GCA</u> → <u>GCG</u>	293	Ninguno	1/14 (7.1)	0/12 (0.0)	NC
		<u>CTA</u> → <u>TTA</u>	190	Ninguno	4/14 (28.5)	11/12 (91.7)	27.5 (2.61- 289.14), 0.004
		<u>AAC</u> → <u>AAT</u>	264	Ninguno	4/14 (28.5)	11/12 (91.7)	27.5 (2.61- 289.14), 0.004

G <u>T</u> T→G <u>T</u> A	203	Ninguno	4/14 (28.5)	11/12 (91.7)	27.5 (2.61- 289.14), 0.004
G <u>C</u> T→G <u>C</u> A	290	Ninguno	1/14 (7.1)	11/12 (91.7)	143(7.9807-2562.3), 0.000
A <u>T</u> A→A <u>T</u> T	206	Ninguno	4/14 (28.5)	11/12 (91.7)	27.5 (2.61- 289.14), 0.004
G <u>G</u> A→G <u>G</u> T	306	Ninguno	1/14 (7.1)	11/12 (91.7)	143 (7.9807-2562.3),0.000
T <u>A</u> T→T <u>A</u> G	257	Ninguno	4/14 (28.5)	11/12 (91.7)	27.5 (2.61- 289.14), 0.004
<u>T</u> T <u>A</u> → <u>C</u> T <u>A</u>	270	Ninguno	4/14 (28.5)	11/12 (91.7)	27.5 (2.61- 289.14), 0.004
A <u>A</u> T→A <u>A</u> C	282	Ninguno	4/14 (28.5)	11/12 (91.7)	27.5 (2.61- 289.14), 0.004
Cepa tipo			1/14 (7.1)	0/12 (0.0)	

OR: odds ratio, IC95%: Intervalo de confianza al 95%, p: valor de probabilidad. NC No calculable

8. DISCUSIÓN

Este es el primer estudio de aislamientos de *C. difficile* enfocado en genes de resistencia a antibióticos en México. En este trabajo, se incluyeron 128 aislamientos de *C. difficile*, a los cuales se les identificó el perfil toxigénico, el perfil de susceptibilidad y se estudiaron genes relacionados con resistencia a distintos antibióticos.

Se recolectaron datos clínicos de los pacientes y se encontró que la edad promedio de las personas con ICD fue de 45.26 ± 20.15 años; lo cual está por debajo de lo reportado por Becerra y colaboradores, quienes encontraron que la edad (> 65 años) es un factor de riesgo para el desarrollo de ICD. Para esta misma población, reportaron una mortalidad mayor al 80% (Becerra *et al.* 2011).

El 24% de los pacientes padecían diabetes, lo cual concuerda con lo reportado por Lin y colaboradores, quienes encontraron que los pacientes con este padecimiento tenían una mayor probabilidad de padecer la ICD (Lin *et al.* 2013).

La ICD es la principal causa de diarrea asociada a cuidados de la salud, y está muy estrechamente relacionada con la administración de antibióticos. En este estudio se observó que al 80% de los pacientes se le había administrado de 1 a 5 antibióticos durante su estancia hospitalaria, el cual es un factor de riesgo importante en la población estudiada. Esto es similar a lo observado en un estudio de casos y controles, en el que encontraron que entre los pacientes que desarrollaron ICD, el 89.5 % habían tomado algún antibiótico previo a la infección (Monge *et al.* 2011).

Se ha documentado que el principal antibiótico relacionado con la ICD es la administración de clindamicina (Spigaglia 2016). En este estudio llama la atención que únicamente el 23.4% de los pacientes habían consumido este antibiótico. Interesantemente, se observó una mayor exposición a cefalosporinas de tercera generación (45.3%), lo cual es similar a lo encontrado en un estudio de Monge y colaboradores en el que se reporta que los pacientes que recibieron este grupo de antibióticos tenían una mayor probabilidad de desarrollar ICD 42.1% (OR 10.1, IC 95% 1.8-55.1, p=0.008) (Monge *et. al* 2011).

En nuestro estudio, la administración de IBP se asoció al desarrollo de ICD. Estos fármacos producen una baja de ácido clorhídrico, lo cual sube el pH hasta 5. Esta alza del pH favorece que no se eliminen las células vegetativas y que se puedan establecer en el intestino, lo cual se conjunta con la disbiosis asociada al consumo de antibióticos (Dial *et. al* 2005). En este sentido, la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) emitió una advertencia sobre la prescripción de IBP y el riesgo que representan al desarrollo de ICD (Khanna *et. al* 2012).

La ICD se desarrolla cuando el paciente entra en contacto con las esporas de *C. difficile* que llegan hasta el colon y se producen las células vegetativas que son capaces de producir toxinas A y B y ocasionar el daño (Persson *et al.* 2008). En este trabajo, se detectaron los genes que codifican para estas toxinas mediante PCR y se encontró que el 100% de los aislamientos eran toxigénicos, lo que nos indica que son capaces de causar daño en la mucosa del intestino al producir las toxinas A y B. Además, al 71% de los aislamientos se les detectó una delección de 18pb en el gen *tcdC*, la cual está asociada a cepas hipervirulentas que sobreexpresan las toxinas A y B, ya que al no funcionar de manera adecuada el regulador negativo del Paloc hay hiperproducción de las toxinas. Alrededor del 76% de los aislamientos presenta la toxina binaria, la cual está relacionada con una mayor persistencia de *C. difficile* en el colon; este valor es superior al reportado

por Dale y colaboradores (del 5 al 30%). El 24% de las cepas no presentaron alteraciones en el gen regulador *tcdC* ni la presencia de toxina binaria (Dale *et. al* 2014).

Para la determinación de los perfiles de susceptibilidad, se utilizó el método de dilución en placa (Freeman *et al.* 2005) y se emplearon los puntos de corte definidos por el CLSI, EUCAST y para los antibióticos que no tenían un punto de corte se emplearon los establecidos por distintos autores.

En este trabajo, se encontró una alta resistencia a los antibióticos; con una resistencia del 81.3 para clindamicina y eritromicina. Para moxifloxacino se detectó una resistencia del 93.0%. Los reportes previos de resistencia a estos antibióticos son muy variados (del 8 al 100%) (Spigaglia 2016).

La resistencia a ciprofloxacino fue del 87.5%, el cual es un porcentaje similar al reportado para este antibiótico (del 88 al 100%). La resistencia a rifampicina fue del 78.1%, lo cual está por encima de lo reportado para este antibiotico (1.7 a 65%).

La resistencia a vancomicina fue del 40.6%. Reportes previos han mostrado valores de resistencia del 0.5 al 47% (Spigaglia 2016), por lo que la resistencia detectada en este trabajo está dentro del rango previamente reportado. Esta resistencia puede tener implicaciones clínicas, porque la vancomicina es uno de los tratamientos de primera línea para la ICD.

En contraste, el 100% de los aislamientos fueron sensibles a tetraciclina. Un reporte previo por Huang y colaboradores mostraron resultados similares a los de este trabajo (100% de sensibilidad a tetraciclina). En contraste, otros reportes han informado una resistencia a este antibiótico del 2.4 al 41.6% (Lachowicz *et. al* 2015).

El 100% de las cepas mostraron sensibilidad a metronidazol; otros trabajos han reportado una resistencia del 0.11 al 13.3% (Norman *et al.* 2014, Freeman *et al.* 2015)

Ya que el metronidazol es un antibiótico usado como tratamiento de primera línea, los resultados de sensibilidad *in vitro* sugieren que puede aplicarse como terapia de la ICD con relativa seguridad.

En este trabajo, se seleccionaron aislamientos con los valores más altos de CMI y los aislamientos con valores más bajos de CMI para linezolid, rifampicina, fidaxomicina y vancomicina para detectar mutaciones relacionadas a resistencia. El linezolid y la rifampicina (se correlaciona con resistencia a rifaximida) se han propuesto como antibióticos alternos a los de primera línea.

La resistencia a linezolid se ha relacionado con la presencia del gen *cfr* el cual fue buscado mediante PCR y no se observó la presencia de este gen. Estudios previos han mostrado que 7/9 de los aislamientos resistentes a linezolid contenían el gen *cfr*. (Marín *et al.* 2015), lo cual sugiere la presencia de otro mecanismo de resistencia a linezolid

El mecanismo de acción de la rifampicina y la fidaxomicina son similares, pero actúan en diferente área de la RNA polimerasa.

En este trabajo se buscaron polimorfismos en un fragmento de 486 pb del gen *rpoB* relacionado con la resistencia a rifampicina, y se encontró que la mutación Arg505Lys es un marcador de resistencia a rifampicina (OR:52.5 IC (5.17- 532.6), p: 0.000) (95.4% contra 28.5%). Esta mutación se ha relacionado previamente a resistencia a rifampicina, ya que se reportó que el 46.8% de los aislamientos resistentes presentaba esta mutación.

Para analizar el mecanismo de susceptibilidad reducida a fidaxomicina, se analizó un fragmento *rpoB* de 407pb y se encontraron 7 polimorfismos, 1 de los cuales alteraba el aminoácido resultante. Al realizar el análisis, no se encontró que fuera marcador de la susceptibilidad reducida encontrada en los aislamientos OR 0.4 (0.027-5.9), p=>0.05.

Interesantemente, en este trabajo no se detectó el polimorfismo Gln1073Arg, el cual se había asociado previamente con susceptibilidad reducida a fidaxomicina (Leeds *et al* 2013). Esto sugiere que el mecanismo de resistencia es diferente al previamente descrito.

Para el mecanismo de resistencia a vancomicina, se analizó un fragmento de *rpoC* 480 pb se encontraron diferentes polimorfismos; sin embargo, la mayoría se encontraban tanto en sensibles como cepas en resistentes. Además, se detectaron algunos polimorfismos asociados a OR elevados (19.8 – 143); sin embargo, estos pleomorfismos no se asociaron a un cambio de aminoácido al obtener la proteína final.

Previamente se ha descrito que la mutación Asp244Tyr está relacionada a la resistencia a vancomicina (Leeds *et al* 2014); Sin embargo, este polimorfismo no se encontró en los aislamientos.

9. CONCLUSIONES

1. Se obtuvieron 128 aislamientos toxigénicos de *C. difficile* en dos hospitales de tercer nivel de México.
2. Se detectó una alta resistencia de *C. difficile* a quinolonas, clindamicina, eritromicina y rifampicina.
3. No se presentó resistencia a tetraciclina.
4. La resistencia a linezolid en los aislamientos de *C. difficile* está dada por un mecanismo distinto a la presencia del gen *cfr*.
5. La resistencia a rifampicina en los aislamientos de *C. difficile* se relaciona con la presencia de una mutación en Arg505Lys en el gen *rpoB*.
6. La susceptibilidad reducida a fidaxomicina no se relacionó con la mutación Gln1073Arg, ni con otras mutaciones encontradas en *rpoB*.
7. La resistencia a vancomicina no se relacionó con la mutación Asp244Tyr, ni con otras mutaciones en *rpoC*.

10. PERSPECTIVAS

Este trabajo abre la puerta al estudio de la resistencia a antibióticos que presenta *C. difficile* en nuestro país, ya que se podrán estudiar otros posibles mecanismos de resistencia a linezolid, vancomicina y fidaxomicina. Además del estudio de la resistencia a otros grupos de antibióticos como lo son quinolonas, macrólidos y lincosaminas.

11.BIBLIOGRAFÍA

Arnold A, Pope C, Bray S, Riley P, Breathnach A, Krishna S, Planche T. 2010. Prospective assessment of two-stage testing for *Clostridium difficile*. Journal Hospital Infection 76:18-22.

Bacci, S., Mølbak, K., Kjeldsen, M. K., & Olsen, K. E. (2011). Binary Toxin and Death after *Clostridium difficile* Infection. Emerging Infectious Diseases, 17(6), 976-982.

Barbut F, Richard A, Hamadi K, Chomette V, Burghoffer B, Petit JC. 2000. Epidemiology of recurrences or reinfections of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. Journal of Clinical Microbiology 38:2386-8.

Barbut F, Mastrantonio P, Delmée M, Brazier J, Kuijper E, Poxton I. 2007. Prospective study of *Clostridium difficile* infections in Europe with phenotypic and genotypic characterisation of the isolates. Clinical Microbiology Infeccion 13(11):1048-1057

Barra J, Hernández J, Ibáñez P, Guzmán AM, Álvarez M, Paredes D. 2014. *Clostridium difficile* spores and its relevance in the persistence and transmission of the infection Rev Chil Infect 31(6): 694-703.

Bauer MP, Veenendaal D, Verhoef L, Bloembergen P, Van Dissel JT y Kuijper EJ. 2009. Clinical and microbiological characteristics of community-onset *Clostridium difficile* infection in The Netherlands. Clinical Microbiology and Infection, 15:1087–1092.

Becerra MG, Ospina S, Atehortúa SL, Berbesi DY. 2011. Risk factors for *Clostridium difficile* infection. Infectio. 2011; 15(4): 220-226 eñ

Borgmann S, Kist M, Jakobiak T, Reil M, Scholz E, Von Eichel C, Gruber H, Brazier JS, Schulte B. 2008. Increased number of *Clostridium difficile* infections and prevalence of *Clostridium difficile* PCR ribotype 001 in southern Germany. Euro Surveill 13(49):1-12.

Briceño I, García P, Álvarez M, Ferres M, Quiroga T..2000. Diarrea asociada a *Clostridium difficile*: Evaluación de varios métodos de diagnóstico Rev Chil Infect 17 (4): 313-320

Bujanda L y Cosme Á. 2008. Diarrea asociada a *Clostridium difficile*. Gastroenterología y Hepatología. 32(1):48–56.

Camacho A, López D, Hernández R, Galván AM, Flores SM, Llaca JM y Garza E. 2015. First Report of *Clostridium difficile* NAP1/027 in a Mexican Hospital. *PLoS ONE* 10(4):1-10.

Curry SR, Marsh JW, Shutt KA, Muto CA, O'Leary MM, Saul MI, Pasculle AW, y Harrison LH. 2009. High frequency of rifampin resistance identified in an epidemic *Clostridium difficile* clone from a large teaching hospital. *Clinical Infection Diseases*. 15; 48(4): 425

Dale NG, Stuart J, Maja R y Klaus A. 2014. *Clostridium difficile* binary toxin CDT, Mechanism, epidemiology, and potential clinical importance. *Gut Microbes*, 5:(1)15-27.

Dial S, Delaney JA, Barkun AN, Suissa S. 2005. Use of gastric acid-suppressive agents and the risk of community-acquired *Clostridium difficile*-associated disease. *JAMA*. 294(23):2989–2995.

Freeman J, Stott J, Baines SD, Fawley WN y Wilcox MH. 2005. Surveillance for resistance to metronidazole and vancomycin in genotypically distinct and UK epidemic *Clostridium difficile* isolates in a large teaching hospital. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 56 (5): 988-989.

Goldstein EJC, Babakhani F y Cintron DM. 2012. Antimicrobial Activities of Fidaxomicin. *Clin Infect Dis*. 55(Suppl 2): S143–S148.

Goorhuis A, Bakker D, Corver, J, Debast SB, Harmanus C, Notermans DW, Bergwerff AA., Dekker FW y Kuijper EJ. 2008. Emergence of *Clostridium difficile* infection due to a new hypervirulent strain, polymerase chain reaction ribotype O78", *Clin Infect Dis* 47(9):1162-1170.

- Hatheway CL. (1990). Toxigenic clostridia. *Clinical Microbiology Reviews*. 3: 66-98.
- Hennequin C, Janoir C, Barc MC, Collignon A, Tuomo Karjalainen. 2003. Identification and characterization of a fibronectin-binding protein from *Clostridium difficile*. *Microbiology* 149:2779–2787
- Kachrimanidou M, Malisiovas N. 2011. *Clostridium difficile* Infection: A Comprehensive Review. *Critical Reviews in Microbiology* 37(3): 178–187
- Khanna S, Pardi DS, Aronson SL, Kammer PP y Baddour LM. 2012. Outcomes in community-acquired *Clostridium difficile* infection. *Aliment Pharmacol Ther*, 35: 613–618.
- Lachowicz D, Pituch H y Obuch-Woszczatynski P. 2015. Antimicrobial susceptibility patterns of *Clostridium difficile* strains belonging to different polymerase chain reaction ribotypes isolated in Poland in 2012. *Anaerobe*, 31:37-41.
- Leeds JA, Sachdeva M, Mullin S, Barnes WB y Ruzin A. 2014. In vitro selection, via serial passage, of *Clostridium difficile* mutants with reduced susceptibility to fidaxomicin or vancomycin. *Journal Antimicrobial Chemotherapy* 2014; 69: 41- 44.
- Legaria MC, Lumelsky G y Rosetti S. 2003. *Clostridium difficile*-associated diarrhea from a general hospital in Argentina. *Anaerobe* 9:113–116
- Levett PN. 1984. Detection of *Clostridium difficile* in faeces by direct gas liquid chromatography. *Journal Clinical Pathology* 37: 117-9.
- Lin JH, Hung YP, Liu HC, Lee JC, Lee CI, Wu YH, Tsai PJ y Ko WC. 2013. Risk factors for *Clostridium difficile*-associated diarrhea among hospitalized adults with fecal toxigenic *C. difficile* colonization. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 48, 183-189
- Lo Vecchio A, Zacurb GM. 2012. *Clostridium difficile* infection: an update on epidemiology, risk factors, and therapeutic options. *Wolters Kluwer Health*. 28(1): 1-9

Loo VG, Poirier L, Miller MA, Oughton M, Libman MD, Michaud S, Bourgault AM, Nguyen T, Frenette C, Kelly M, Vibien A, Brassard P, Fenn S, Dewar K, Hudson JT, Horn R, René P, Monczak Y, Dascal A. 2005. A predominantly clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality. *N Engl J Med.* 353:2442-2449.

Madigan Michael T., Martinko John M., Stahl David A., Clark David P.. 2012. *Brock Biology of Microorganisms*. Pearson Education, Inc, pp 795-796.

Marín M, Martín A, Alcalá L, Cercenado E, Iglesias C, Reigadas E y Bouza E, 2015. *Clostridium difficile* Isolates with High Linezolid MICs Harbor the Multiresistance Gene *cfr*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59(1): 586-589.

Monge D, Morosini M, Millán I, Pérez-Canosa C, Manso M, Guzman MF y Asensio A. 2011. Factores de riesgo de infección por *Clostridium difficile* en pacientes hospitalizados. *Med Clin.* 137(13):575–80.

Morfín R, Garza E, Aguirre SA, Escobedo R, Esparza S, Perez HR, Petersen S, Gonzalez E, Martínez A, Rodríguez E. 2016. *Clostridium difficile* outbreak caused by NAP1/BI/027 strain and non-027 strains in a Mexican hospital. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases.* 20:8-13.

Norman K, Scott H, Harvey R, Norby B, Hume M. 2014. Comparación de la susceptibilidad antimicrobiana entre *Clostridium difficile* aislado a partir de una población humana y porcina integrado en Texas. *Pathog Foodborus Dis.* 11: 257-264

O'Connor JR, Galang MA, Sambol SP, Hecht DW, Vedantam G, Gerding DN y Johnson S. 2008. Rifampin and Rifaximin Resistance in Clinical Isolates of *Clostridium difficile*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy.* 52(8): 2813–2817.

Persson S, Torpdahl M y Olsen KEP. 2008. New multiplex PCR method for the detection of *Clostridium difficile* toxin A (*tcdA*) and toxin B (*tcdB*) and the binary toxin (*cdtA / cdtB*) genes applied to a Danish strain collection. *Clinical Microbiology and Infection,* 14: 1057–1064.

Portillo MI, Castellanos MA, Cortés E, Chiprut R. 2002. Infección por *Clostridium difficile*. Gaceta Médica de México. 138 (1): 57-66

Rodríguez D, Mirelis B, Navarro F. 2012. Infecciones producidas por *Clostridium difficile*. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 31(4):254–263.

Rupnik M, Wilcox MH, Gerding DN. 2009. *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. Nature Reviews 7: 526-536.

Spigaglia P. 2016. Recent advances in the understanding of antibiotic resistance in *Clostridium difficile* infection. Therapeutic Advances Infectious Disease. 3(1):23-42.

Waligora AJ, Hennequin C, Mullany P, Bourlioux P, Collignon A, Karjalainen T. 2001. Characterization of a Cell Surface Protein of *Clostridium difficile* with adhesive properties. Infection and Immunity 69(4): 2144–2153.

Zea JW, Salazar CL, 2012. Enfermedad asociada a *Clostridium difficile*: prevalencia y diagnóstico por laboratorio. Infectio Asociación Colombiana de Infectología 16(4):211–222

RESUMEN BIOGRÁFICO

Hugo Sánchez Alanís

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias con orientación en Microbiología

Tesis. FARMACORRESISTENCIA EN AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE *Clostridium difficile* ASOCIADOS A LOS GENES DE RESISTENCIA *cfr*, *rpoB* Y *rpoC*.

Campo de Estudio: Microbiología

Datos personales: Nacido en San Nicolás de los Garza, Nuevo León, el 3 de julio de 1990, hijo de José Luz Sánchez de la Torre y Armandina Alanís Ayala.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Clínico Biólogo en 2013.

Experiencia Profesional: Químico Analista en área de Bacteriología del Departamento de Patología Clínica del Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González.