

**Universidad Nacional Autónoma de Honduras**  
**Facultad de Ciencias**  
**Escuela de Microbiología**  
**Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas**



“Caracterización molecular y epidemiológica de cepas de *Clostridium difficile* aisladas de pacientes hospitalizados en el Instituto Hondureño de Seguridad Social y el Hospital Escuela Universitario, Tegucigalpa, Honduras. Febrero 2016 - junio 2016”.

**Tesis sustentada por:**

Fanny Mariela Hidalgo Villeda

**PARA OPTAR AL GRADO DE MÁSTER EN CIENCIAS EN ENFERMEDADES  
INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS**

16/julio/2017

Ciudad Universitaria, Tegucigalpa M.D.C. Honduras C.A.

**Universidad Nacional Autónoma de Honduras**  
**Facultad de Ciencias**  
**Escuela de Microbiología**  
**Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas**

Rectora

**Julieta Castellanos, M.Sc.**

Vicerrectora académica

**Belinda Flores, M.Sc.**

Directora de Investigación Científica y Posgrado

**Leticia Salomón, M.Sc.**

Decano de la Facultad de Ciencias

**Nabil Kawas, M.Sc.**

Coordinadora del Posgrado en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas

**Maritza Canales Girón, M.S.P.**

16/julio/2017

Ciudad Universitaria, Tegucigalpa M.D.C. Honduras C.A.

**Universidad Nacional Autónoma de Honduras**  
**Facultad de Ciencias**  
**Escuela de Microbiología**  
**Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas**

Asesor de tesis

**Edgardo Tzoc, M.Sc. (UNAH)**

Coasesor de tesis

**Carlos Quesada, PhD. (UCR)**

Terna examinadora

**Edgardo Tzoc, M.Sc. (UNAH)**

**Carlos Quesada, PhD. (UCR)**

**César Rodríguez, PhD. (UCR)**

16/julio/2017

Ciudad Universitaria, Tegucigalpa M.D.C. Honduras C.A.

## **Dedicatoria**

- ✓ A Dios por llenarme de bendiciones.
- ✓ A mi madre por su amor y apoyo incondicional.
- ✓ A mi familia por apoyarme en todas mis decisiones.

## **Reconocimientos**

Este proyecto fue financiado por la Dirección de Investigación Científica (UNAH), Tegucigalpa, Honduras; Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica, Laboratorio de Investigación en Bacteriología Anaerobia (UCR) y Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (UCR) San José, Costa Rica.

Agradezco al Dr. Edgardo Tzoc, Dr. Carlos Quesada y el Dr. César Rodríguez por toda su paciencia, enseñanzas, consejos, dedicación y apoyo permanente durante todo este proceso de formación. A la coordinación y docentes de la Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas, por su confianza y apoyo, para formar parte de la tercera promoción de esta maestría.

Agradecimientos a Tim Du (Laboratorio Nacional de Microbiología, Winnipeg, MB, Canadá) por el apoyo brindado en la implementación de protocolos de laboratorio, y por el acceso a la base de datos de PFGE; a Pablo Vargas, Robín Cárdenas por su colaboración en las técnicas de identificación y tipificación molecular. También agradezco a Sarhy Guevara, Cinthia Mendoza y Héctor Ventura, estudiantes de la Escuela de Microbiología, por su valiosa contribución en la recolección de las muestras, cultivo bacteriano, recolección y manejo de la información epidemiológica. A la Red de Macrouiversidades de Latinoamérica y El Caribe por el apoyo financiero para la movilidad a Costa Rica.

Expreso gratitud al comité de enfermedades infecciosas del IHSS y HEU, a los laboratorios de ambos centros hospitalarios por su colaboración en la conservación de las muestras.

## Índice

Lista de tablas .....	viii
Lista de figuras.....	ix
Lista de anexos .....	x
Lista de abreviaturas.....	xi
Resumen.....	xii
CAPÍTULO 1: Introducción .....	1
CAPÍTULO 2: Revisión de la literatura .....	5
2.1. Epidemiología.....	6
2.2. Patogenia y factores de virulencia de Clostridium difficile.....	9
2.3. Factores de riesgo de la aparición de diarrea asociada a Clostridium difficile .....	15
2.4. Respuesta inmune del hospedero contra la infección por Clostridium difficile. ....	17
2.5. Manifestaciones Clínicas de las ICD.....	20
2.6. Diagnóstico de las ICD.....	21
2.7. Tratamiento de la enfermedad asociada a Clostridium difficile. ....	26
2.8. Resistencia a los antibióticos en C. difficile.....	27
2.9. Prevención y control de casos.....	29
CAPÍTULO 3: Metodología.....	30
3.1. Objetivo general:.....	30
3.2. Objetivos específicos: .....	30
3.3. Diseño del estudio.....	31
3.4. Enfoque del estudio.....	31
3.5. Área de estudio .....	31
3.5. Población de estudio: .....	32
3.6. Criterio de inclusión:.....	33
3.7. Criterio de exclusión:.....	33
3.8. Aspectos éticos.....	33
3.9. Tipo de muestreo .....	34
3.10. Tamaño de la muestra .....	34
3.11. Implementación del estudio .....	34
3.12. Consentimiento informado de los participantes.....	35
3.13. Consentimiento de los padres (Menores de edad) .....	36

3.14. Asentimiento de los menores de edad .....	36
3.15. Recolección y manejo de datos epidemiológicos.....	37
3.16. Recolección y transporte de la muestra de heces.....	37
3.17. Técnicas de laboratorio.....	38
3.18. Aspectos de bioseguridad .....	46
3.19. Análisis de datos .....	46
CAPÍTULO 4: Resultados.....	49
4.1. Detección de toxinas A y B, y aislamiento anaerobio de C. difficile.....	49
4.2. Análisis epidemiológico de los aislamientos de C. difficile. ....	49
4.3. Caracterización molecular de las cepas de C. difficile. ....	51
4.4. Ensayos de citotoxicidad.....	54
4.5. Perfil de resistencia a antimicrobianos.....	56
CAPÍTULO 5: Discusión .....	60
CAPÍTULO 6: Conclusiones .....	73
CAPÍTULO 7: Recomendaciones .....	75
7.1. Limitaciones .....	76
7.2. Perspectivas .....	76
CAPÍTULO 8: Referencias.....	78
Anexos.....	98

## Lista de cuadros

Cuadro 1. Antimicrobianos relacionados a ICD.....	165
Cuadro 2.Recomendaciones de tratamiento para EACD, según La Sociedad Epidemiológica de Norteamérica (SHEA) y la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de Norteamérica (IDSA). ....	264
Cuadro 3. Plan de análisis de datos.....	474
Cuadro 4. Detección de toxinas A y B y aislamiento en cultivo anaerobio .....	478
Cuadro 1. Antimicrobianos relacionados a ICD, adaptada de (Saliba et al. 2014; Goudarzi et al. 2014; T. 2015; Knecht et al. 2014).....	16
Cuadro 2. Recomendaciones de tratamiento para ICD, según La Sociedad Epidemiológica de Norteamérica (SHEA) y la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de Norteamérica (IDSA).....	26
Cuadro 3. Plan de análisis de datos.....	47

## Lista de figuras

Figura 1. Disposición de genes en el PaLoc que codifican por las toxinas de <i>C. difficile</i> .....	12
Figura 2. Internalización y mecanismo de acción de las toxinas A y B .....	<b>¡Error! Marcador no definido.2</b>
Figura 3. Infección por <i>C. difficile</i> y la estimulación de la respuesta inmune en el hospedero. ....	<b>¡Error! Marcador no definido.7</b>
Figura 4. Caracterización de cepas de <i>C. difficile</i> , tipificadas por PCR multiplex .....	<b>¡Error! Marcador no definido.1</b>
Figura 5. Caracterización de cepas de <i>C. difficile</i> , tipificadas por electroforesis en gel de campo pulsado .....	52
Figura 6. Toxinotipificación de cepas de <i>C. difficile</i> , utilizando enzimas de restricción <i>EcoRI</i> e <i>HincII</i> .....	53
Figura 7. Efecto citopático en células HeLa producido por las toxinas de <i>C. difficile</i> , agrupados por patrón de macrorestricción .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Figura 8. Resistencia a los antimicrobianos de las cepas de <i>C. difficile</i> , agrupados por patrón de macrorestricción <i>SmaI</i> .....	<b>¡Error! Marcador no definido.6</b>
Figura 9. Genes asociados a resistencia a tetraciclina y linezolid	<b>¡Error! Marcador no definido.7</b>

## Lista de anexos

Anexo 1. Solicitudes de ética aprobadas.....	97
Anexo 2. Flujograma de trabajo .....	99
Anexo 3. Consentimiento informado para los participantes.....	100
Anexo 4. Consentimiento de los padres (menores de edad) .....	104103
Anexo 5. Asentimiento de menores de edad.....	106
Anexo 6. Cuestionario Clínico Individual .....	10109
Anexo 7. Detección de toxinas A y B de <i>Clostridium difficile</i> .....	113
Anexo 8. Medios de cultivo para el cultivo e identificación de <i>Clostridium difficile</i> .....	115
Anexo 9. Aislamiento en cultivo anaerobio de <i>Clostridium difficile</i> .....	119
Anexo 10. Crioconservación y recuperación de cepas congeladas a -80 °C de <i>Clostridium difficile</i> .....	123
Anexo 11. Extracción de ADN .....	1248
Anexo 12. Detección de genes <i>tcdA</i> , <i>tcdB</i> , <i>tcdC</i> , <i>ctdB</i> y <i>tpi</i> .....	129
Anexo 13. Determinación de pulstipo de electroforesis por electroforesis en campo pulsante (PFGE). .....	136
Anexo 14. Toxinotipificación.....	147
Anexo 15. Ensayos de citotoxicidad y determinación del efecto citopático. ....	1510
Anexo 16. Pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos .....	1532
Anexo 17. PCR para los genes <i>tetM</i> y <i>cfr</i> .....	153

### **Lista de abreviaturas**

ICD: infecciones por *Clostridium difficile*

IAAS: infecciones asociadas a la atención en salud

AB: antibiótico

DACD: diarrea asociada a *Clostridium difficile*

UCI: unidad de cuidados intensivos

PFGE: Electroforesis en gel de campo pulsante

REA: análisis de endonucleasa de restricción

## Resumen

La prevalencia de infecciones por *Clostridium difficile* ha aumentado en todo el mundo debido, en parte, a la aparición y posterior diseminación de cepas NAP1, que se caracterizan por ser hiperproductoras de toxinas, producir una toxina binaria y presentar resistencia a las fluoroquinolonas. Aquí se describe por primera vez en hospitales de Honduras el hallazgo de tres diferentes tipos de cepas NAP1, de acuerdo a la técnica de electroforesis en gel de campo pulsado. En congruencia con su tipificación, estas cepas poseen una deleción de 18 pb en el gen *tcdC*, producen toxinas A, B y binaria, pertenecen al toxinotipo IV y presentan efecto citopático clásico en células HeLa.

Se obtuvo la información epidemiológica, donde el rango de edad es de 24 a 86 años; por otro lado, el 90% de los pacientes tuvo exposición a cefalosporinas y el 33% tuvo exposición a fluoroquinolonas previa a la aparición de los síntomas de la enfermedad.

Pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos (PSA) realizados con tiras E-test revelaron que las cepas NAP1 hondureñas son altamente resistentes a fluoroquinolonas, clindamicina y linezolid, también todas las cepas son sensibles a vancomicina y metronidazol, estos dos antimicrobianos son utilizados como tratamiento para las ICD, por lo que esta línea podrá seguir siendo utilizada como tratamiento.

En conjunto, estos resultados describen la aparición en Honduras de cepas de *C. difficile* con alto potencial de virulencia. En este contexto, el conocimiento generado permitirá tomar medidas para mitigar el impacto causado por este patógeno.

Palabras clave: *Clostridium difficile*, NAP1, PSA, resistencia, ICD.

## CAPÍTULO 1: Introducción

*Clostridium difficile* es un bacilo Gram-positivo esporulado, anaerobio estricto. Esta bacteria fue asociada por primera vez a enfermedad en humanos en 1978 y es la causa más común de diarrea asociada al uso de antibióticos (DAA) dentro de hospitales (J. M. Amy et al. 2015) en América del Norte, Latinoamérica, Asia y Europa (Rodríguez-Pardo et al. 2013).

Las infecciones por *C. difficile* (ICD) pueden manifestarse de diferentes formas, entre las que destaca una inflamación del colon que se manifiesta como un cuadro diarreico que aparece frecuentemente tras el uso de antimicrobianos, especialmente clindamicina, cefalosporinas y fluoroquinolonas. Estos antimicrobianos alteran la microbiota intestinal, generando las condiciones para que la bacteria germine y colonice el intestino (T. 2015). En algunos casos, las ICD pueden tener un desenlace clínico severo, como la colitis pseudomembranosa y megacolon tóxico (Matamouros et al. 2007).

La transmisión de *C. difficile* es por vía fecal-oral, debido a la ingestión de las esporas de la bacteria, las cuales son altamente resistentes en el entorno y facilitan su persistencia en ambientes aerobios fuera del hospedero (Goudarzi et al. 2014).

Los principales factores de virulencia de *C. difficile* son dos toxinas que pertenecen a la familia de grandes toxinas clostridiales, las cuales tienen actividad glicosiltransferasa y modifican GTPasas monoméricas. La toxina A (enterotoxina) y la toxina B (citotoxina), son codificadas por los genes *tcdA* y *tcdB*, respectivamente (Dingle et al. 2014). En la mayoría de las cepas, estos genes se encuentran en una región cromosomal de 19.6 kb, conocido como el locus de patogenicidad (PaLoc).

El PaLoc además posee los genes *tcdR* y *tcdC*, que regulan la expresión de los genes de las toxinas, y el gen *tcdE* que codifica por una proteína parecida a una holina posiblemente relacionada con la secreción de las toxinas (J. M. Amy et al. 2015).

Las toxinas A y B de *C. difficile* son endocitadas y activadas en los endosomas cuando estos se acidifican (Kasendra et al. 2013), son toxinas muy potentes que glicosilan a las GTP monoméricas, provocando la remodelación del citoesqueleto de actina, ruptura de las uniones estrechas y el desprendimiento de las células epiteliales de la membrana basal, generando un efecto citotóxico en las células epiteliales intestinales del hospedero (Carroll & Bartlett 2011).

La implementación de métodos de tipificación molecular como PFGE, REA y la toxinotipificación, permiten comprender mejor la epidemiología, genética y algunas características toxigénicas de *C. difficile*, enfocados principalmente en el estudio de brotes en la actualidad (O'Horo et al. 2012).

Desde el año 2002 se conoce una cepa de *C. difficile* clasificada por ribotipificación, análisis de endonucleasa de restricción, electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) y toxinotipificación como 027/BI/NAP1/IIIb (Camacho-Ortiz et al. 2015). Estas cepas hipervirulentas NAP1 se caracterizan por ser altamente resistentes a las fluoroquinolonas y clindamicina, producir toxinas A y B, la producción de una tercera toxina llamada toxina binaria (CDT), además, posee una delección de 18 pb en el gen regulador *tcdC* (Carter et al. 2011). La presentación clínica de estas cepas, se caracteriza por fiebre > 38°C, dolor abdominal, leucocitosis marcada y

disminución de la motilidad intestinal; asociadas también a recurrencias de la enfermedad hasta en un 42% de los casos (Pepin et al. 2006).

La cepa hipervirulenta de *C. difficile* NAP1 se ha extendido rápidamente por el mundo en las últimas décadas, aumentando la prevalencia y la gravedad de las infecciones humanas (Freeman et al. 2010). Estas cepas han sido responsables de grandes brotes de la enfermedad en centros hospitalarios en América del Norte, Europa y varios países asiáticos, aumentando las tasas de mortalidad hasta un 20% en ICD (Marín et al. 2014).

Recientemente, en América Latina se ha documentado la presencia de cepas NAP1 de *C. difficile* dentro de hospitales de México, Panamá y Chile, así como brotes en hospitales de Costa Rica (Anon 2012; Camacho-Ortiz et al. 2015; Lopez-Urena et al. 2014). En vista de esto, es pertinente evaluar la distribución de *C. difficile* NAP1 en toda América Latina para controlar su diseminación (Lopardo et al. 2015).

Antes de este estudio los datos sobre la presencia de cepas hipervirulentas de *C. difficile* dentro de los hospitales era desconocido en Honduras. En este país el sistema público y privado de salud tiene dificultades para diagnosticar las ICD, debido a que los laboratorios no pueden aislar e identificar esta bacteria ni demostrar sus toxinas en heces de pacientes con clínica sugestiva.

En este trabajo, se presenta por primera vez la caracterización molecular de cepas NAP1 de *C. difficile* obtenidas durante el año 2016 en el Hospital del Instituto Hondureño de Seguridad Social (IHSS) y el Hospital Escuela Universitario (HEU), los centros hospitalarios de mayor demanda e importancia en Honduras.

Las cepas encontradas, pertenecen al genotipo NAP1 con toxinotipo IV, altamente resistentes a las fluoroquinolonas, linezolid y clindamicina. Además, poseen una deleción en el gen regulador negativo *tcdC*, presencia de las toxinas TcdA, TcdB y CDT, y presentan un efecto citopático clásico en células HeLa; en conjunto, estos resultados describen la aparición en Honduras de cepas hipervirulentas de *C. difficile*.

Esta información se complementó con un análisis epidemiológico de los pacientes, con el fin de conocer los factores de riesgo asociados a la ocurrencia de estas infecciones en los hospitales de Honduras, esta información posibilita la elaboración e implementación de medidas para la mitigación del impacto por este patógeno, dado que cada centro de atención en salud presenta sus propias particularidades que influyen en la mayor o menor extensión del problema.

## CAPÍTULO 2: Marco teórico

En las últimas décadas las prácticas médicas en los centros hospitalarios a nivel mundial han proporcionado el ambiente ideal para que muchos patógenos microbianos puedan proliferar e infectar a pacientes susceptibles dentro de estos centros de atención en salud. A estas infecciones ocurridas dentro de los hospitales se les conoce como infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS); estas infecciones son cada vez más reconocidas como un importante problema de salud en actualidad, siendo el caso de patógenos como *Clostridium difficile* (O'Horo et al. 2012).

*C. difficile* es un bacilo Gram-positivo, esporulado, anaerobio estricto, mide aproximadamente 0.5 x 3-6 µm y tiene un crecimiento óptimo a 37°C en agar enriquecido con sangre de caballo (Freeman et al. 2010). Fue aislado por primera vez por Hall y O'Toole en 1935, pero no fue sino hasta 1978 que fue asociado con la enfermedad humana como el microorganismo responsable de la mayoría de los casos de colitis pseudomembranosa y la diarrea asociada al uso de antibióticos (Price et al. 1979).

Esta bacteria, frente al estrés del medio, produce esporas resistentes a condiciones ambientales extremas, cambios físicos y químicos como altas temperaturas, luz ultravioleta y exposición a desinfectantes que no contienen cloruros (Depestel & Aronoff 2013).

*C. difficile* en su forma de espora es resistente a los antibióticos, puede permanecer en el tracto gastrointestinal y contribuir potencialmente a la enfermedad recurrente después del tratamiento; las esporas también es uno de los factores por los que *C. difficile* puede proliferar rápidamente dentro de los hospitales. *C. difficile* se encuentra en las heces de pacientes tanto sintomáticos como asintomáticos y el contagio dentro de los hospitales se produce en un entorno contaminado por esporas, por lo que el riesgo aumenta en proporción a la duración de la hospitalización de los pacientes (Freeman et al. 2010; Rodríguez-Pardo et al. 2013).

La contaminación ambiental tiene un papel importante en la transmisión de *C. difficile* en entornos de la atención médica. Se ha documentado brotes, en los cuales se compartieron termómetros rectales e inodoros entre los pacientes de alto riesgo de transmisión que contribuyeron al contagio de la bacteria (Van Kleef et al. 2014). Otra forma en la que los pacientes pueden estar expuesto a las esporas de *C. difficile* es por el contacto con un trabajador sanitario que tenga una colonización transitoria en sus manos, y el índice de contagio durante la hospitalización aumenta en forma lineal con el tiempo y puede ser tan alta como un 40% después de estar hospitalizado por aproximadamente cuatro semanas (S. Cohen et al. 2010).

## **2.1. Epidemiología**

En los últimos años *C. difficile* se ha convertido en un patógeno importante dentro de los centros hospitalarios, considerándolo el responsable de diarrea asociada al uso de antibióticos en muchos países (Heinlen & Ballard 2011).

El impacto económico de las ICD en los sistemas de salud es importante en muchos países, ya que se ha descrito que tiene un costo aproximado anual de 496 millones dólares en países como Estados Unidos (McGlone et al. 2012; Freeman et al. 2010). Los costos suelen ser elevados para los hospitales debido a que se requiere de un aislamiento total del resto de los pacientes, de atención médica especializada, de tratamientos específicos para eliminar a *C. difficile*, de cuidados higiénicos especiales en los servicios de enfermería, que incluyen descontaminación del ambiente y en el caso de brotes epidémicos y la clausura de servicios médicos (Weber et al. 2013).

La epidemiología de las infecciones por *C. difficile* ha cambiado en los últimos años, debido a que se ha observado un aumento en la incidencia de ICD, dando lugar al reconocimiento de nuevas cepas altamente virulentas, causando brotes globales dentro los hospitales. Por lo mencionado anteriormente, entre los años 2007 y 2008, la incidencia media de ICD en 14 hospitales de Europa se reportaron 18 casos por cada 10,000 admisiones (Bauer et al. 2009); mientras que un estudio en Quebec, Canadá, informó de un aumento en la incidencia de 156.3 casos por cada 100,000 habitantes en 2003 y 20,000 muertes en los últimos años.

Entre los años 2000 y 2005 se duplicaron los casos de ICD en los hospitales de Estados Unidos y algunos hospitales de Montreal, Canadá (J. M. Amy et al. 2015; Freeman et al. 2010). Este aumento en el número de casos fue atribuido a la aparición de una cepa hipervirulenta, que muestra altos niveles de clonalidad y resistencia a múltiples fármacos (Karlowsky et al. 2012).

Esta cepa fue descrita como ribotipo 027 por ribotipificación, grupo B1 en análisis de endonucleasa de restricción (REA), pulsotipo NAP1 en electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), y toxinotipo III por toxina polimorfismo, y esta fue nombrada como B1/NAP1/027 (Kuijper et al. 2006).

Desde el 2003, esta cepa ha provocado brotes epidémicos en Canadá, Estados Unidos, Japón, Hong Kong, Corea del Sur, Australia y muchos países europeos (Rodríguez-Pardo et al. 2013; Chen & Lamont 2013; Collins et al. 2013). Por otro lado, en América Latina esta cepa se ha encontrado en Panamá, Chile, México, y ha causado brotes en hospitales de Costa Rica (Barra-carrasco et al. 2014; Camacho-Ortiz et al. 2015; Lopez-Urena et al. 2014).

Entre los años 2004 – 2008 en 17 hospitales de tercer nivel en Asia, se ha reportado un aumento en la incidencia de ICD de 1.7 / 1.000 ingresos para adultos a 2.7 / 1.000 admisiones (Collins et al. 2013). Otro estudio realizado en China entre marzo de 2007 y abril de 2008 en un hospital de 1.216 camas en Shanghái, durante este período, 42,936 pacientes fueron dados de alta y 587 pacientes habían tenido resultado positivos para la detección de toxinas en heces y cultivo anaerobio; en general, la incidencia de ICD fue de 17.1 por cada 10.000 admisiones (Huang et al. 2009).

En cuanto a la recurrencia de las ICD, se ha informado de que 12-24% de los pacientes experimentan al menos una recurrencia y el riesgo de recidivas aumenta hasta el 50-65% si un paciente ha tenido más de dos episodios previos (McFarland 2005).

La mayoría de las recidivas se presentan con los primeros 30 días después de haber completado la terapia en contra de ICD (Kelly 2012). Existen varias causas que favorecen la recurrencia de la enfermedad como alteraciones nuevas en la microbiota intestinal con la consiguiente pérdida de resistencia a la colonización, la persistencia de las esporas de *C. difficile* en el tracto gastrointestinal, una respuesta inmune defectuosa por parte del hospedero o una reinfección con una nueva cepa (Van Nood et al. 2009).

*C. difficile* se ha reportado con poca frecuencia en niños, se ha descrito que la colonización es muy superior a la colonización en los adultos, alcanzando en promedio hasta 37% con muy escasa presentación de la enfermedad (Village 2013). En un estudio en Estados Unidos en el 2005, porcentaje entre 10% - 19% de la colonización asintomática de la cepa NAP1 de *C. difficile* en los niños, siendo más frecuente en los bebés y los niños más pequeños (Hourigan et al. 2016).

## **2.2. Patogenia y factores de virulencia de *Clostridium difficile***

Durante su evolución las bacterias han desarrollado varios factores de virulencia cruciales para el éxito en el establecimiento de la enfermedad. El conocer y comprender los factores de virulencia explotados por los patógenos para evadir o interrumpir la barrera de la mucosa intestinal, es muy importante para implementar medidas de prevención y desarrollar nuevas alternativas de tratamiento (Kasendra et al. 2013; J. M. Amy et al. 2015).

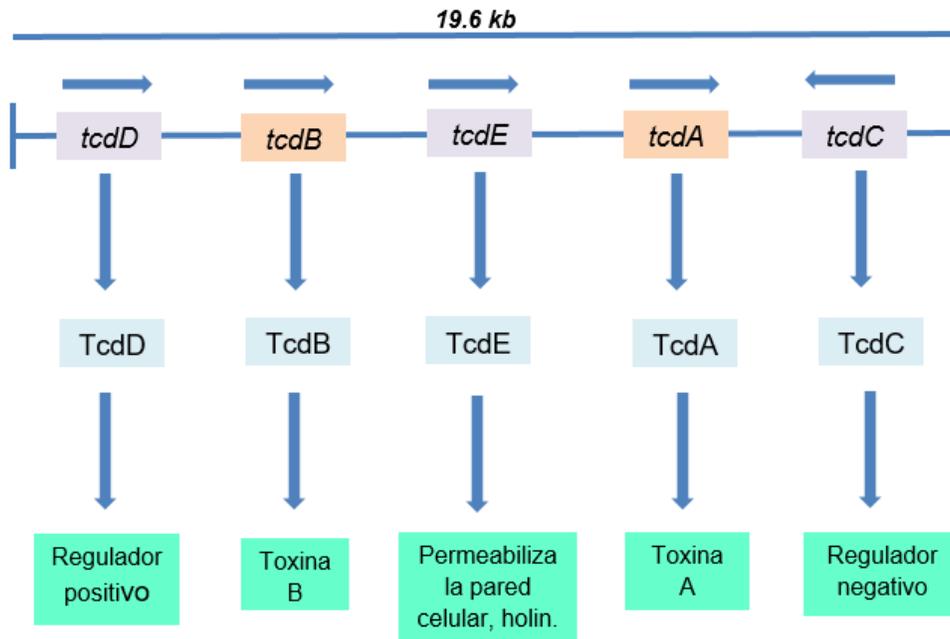
En el caso particular de *C. difficile*, esta bacteria expresa múltiples adhesinas de superficie y factores de colonización, incluyendo las proteínas asociadas a la superficie celular (Capa S), proteína de unión a fibronectina FbpA, proteasas tales como Cwp84, enzimas hidrolíticas, proteínas de choque térmico GroEL, un factor flagelar FliD, y flagelina FliC (Dingle et al. 2011). Los flagelos tienen un papel importante en la motilidad y la quimiotaxis, aumenta la ocurrencia de potenciales interacciones entre el patógeno y la superficie de la mucosa epitelial (Baban et al. 2013).

Además, como se mencionó anteriormente, esta bacteria es formadora de endosporas; a través de un proceso dependiente de la fosforilación del factor de transcripción Spo0A como respuesta a cambios ambientales y fisiológicos desfavorables para su sobrevivencia. Este proceso culmina con la formación de una espora durmiente que es altamente resistente a múltiples factores de estrés, lo que le permite sobrevivir en el medio ambiente por largo tiempo (Underwood et al. 2009; Barra-carrasco et al. 2014).

La infección por *C. difficile* inicia con la ingestión de esporas que resisten la acción del ácido gástrico; los pacientes hospitalizados que tienen mayor riesgo de desarrollar ICD, son los que han utilizado antibióticos como clindamicina, cefalosporinas, beta-lactámicos y fluoroquinolonas (Khanna & Pardi 2014).

Los antibióticos disminuyen la microbiota intestinal, encargada de metabolizar las sales biliares; lo que induce un incremento en la secreción de los niveles de sales biliares específicos, es decir, colatos y sus derivados (taurocolato, glicocolato, colato y desoxicolato); como consecuencia, las esporas germinan transformándose en células vegetativas en el intestino delgado, para posteriormente adherirse a la superficie del epitelio intestinal, luego estas formas vegetativas llegan al ambiente anaerobio del intestino ciego y colon, donde proliferan y colonizan la mucosa intestinal (Paredes-Sabja et al. 2014).

Una vez que las formas vegetativas se adhieren al epitelio intestinal, comienzan a secretar dos toxinas, la toxina A (TcdA) y la toxina B (TcdB). Estas toxinas son codificadas por los genes *tcdA* y *tcdB*, que se encuentran en una sección de 19.6 Kb del ADN cromosómico conocido como el locus de patogenicidad (PaLoc) (Fig.1) (Spigaglia & Mastrantonio 2002; Camacho-Ortiz et al. 2015). El PaLoc también contiene al gen *tcdR* que actúa como regulador positivo de la expresión de *tcdA* y *tcdB*, mientras que *tcdC* actúa como regulador negativo (factor anti-sigma) asociado a una regulación negativa del PaLoc, y el gen *tcdE* codifica una proteína parecida a las holinas de fagos y está vinculada con la liberación de las toxinas a través de la pared de la célula bacteriana (Rupnik et al. 1997).



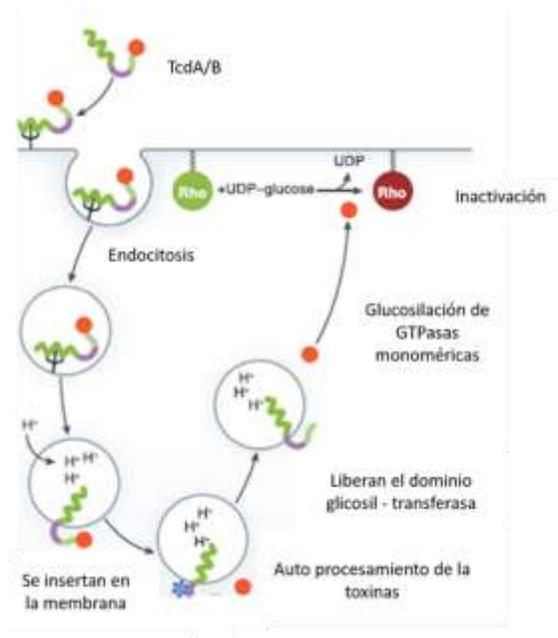
**Figura 1. Disposición de genes en el PaLoc que codifican por las toxinas de *C. difficile*. Modificado de Matamouros y colaboradores.**

Los genes *tcdB* y *tcdA* codifican para ambas toxinas, el gen *tcdE* codifica por una proteína parecida a una holina posiblemente implicada en la secreción de las toxinas, el gen *tcdR* por un factor sigma promotor de la expresión de los genes de las toxinas y *tcdC* por un posible factor anti-sigma que probablemente está asociado a una regulación negativa del PaLoc (Dupuy et al. 2008; Matamouros et al. 2007).

Las toxinas TcdA y TcdB son grandes exotoxinas tipo AB, que pertenecen a la familia de las grandes toxinas clostridiales, de 308-kDa de 270-kDa, respectivamente, mostrando aproximadamente un 63% de homología (Di Bella et al. 2016). Estas toxinas son endocitadas y activadas en los endosomas cuando estos se acidifican, luego las toxinas se someten a un cambio conformacional, seguido de la inserción de la región de transmembrana en la membrana endosomal y translocación del dominio glicosiltransferasa (GTD) en el citosol (Govind & Dupuy 2012).

Con este proceso las toxinas inactivan mediante glucosilación a las GTPasas monoméricas como Rho, Rac, Cdc42, y R-Ras, las cuales son esenciales para varias funciones de la célula hospedera, entre las que destacan: el funcionamiento de la barrera del epitelio, la migración de células inmunes, fagocitosis y producción de citoquinas (Fig. 2) (Kasendra et al. 2013; Chen et al. 2015a).

La inactivación de GTPasas da como resultado una alteración de los microfilamentos de actina y las uniones estrechas, lo que genera un efecto citotóxico en las células epiteliales intestinales del hospedero, que se visualizan como cambios morfológicos drásticos, como el redondeo de las células; causando una disminución en la función de barrera intestinal que posteriormente conduce a la acumulación de líquido, la inflamación, daño intestinal; y el resultado final es la alteración de la barrera epitelial y daño a la mucosa intestinal del hospedero (Pruitt et al. 2012; Chen et al. 2015b).



**Figura 2. Internalización y mecanismo de acción de las toxinas A y B.** Las toxinas son internalizadas en un endosoma, se insertan en la membrana, se autoprocenan para liberar el dominio glicosil-transferasa al citoplasma de la célula hospedera y posteriormente catalizan la monoglicosilación de GTPasas monoméricas pequeñas y su consecuente inactivación. Tomado de Jank y colaboradores (Jank et al. 2015).

TcdA se designa como una enterotoxina responsable de la acumulación de fluido en el íleon, particularmente genera una importante respuesta inflamatoria a través de la liberación de leucotrienos y factor de necrosis tumoral alfa, acompañado de la migración de neutrófilos, mientras que TcdB, con mayor potencia citotóxica que TcdA, a su vez, cruza a través de la alteración de las uniones estrechas hacia el lado baso-lateral de la célula epitelial para realizar su actividad citotóxica, causando pérdida de K<sup>+</sup> (Zhang et al. 2015; Di Bella et al. 2016; Rothman et al. 1984).

Algunas cepas de *C. difficile* denominadas hipervirulentas, además de producir las toxinas A y B, producen una tercera toxina con actividad ribosil-transferasa (*C. difficile* transferasa: CDT) denominada también toxina binaria. Esta toxina esta por 2 subunidades (CDTa y CDTb), codificada por los genes *ctdA* y *ctdB*, estos se localizan juntos en una región del ADN llamada locus CDT o CdtLoc, el cual se ubica en una región del genoma separada del PaLoc denominada CdtLoc, esta es una región conservada entre las diferentes cepas y posee un gen regulador (*cdtR*) (Knapp et al. 2016).

Esta toxina binaria interviene incrementando la adhesibilidad de la bacteria en las células hospederas y además puede catalizar ADP-ribosilación de G-actina (Lanis et al. 2013), dando como resultado la despolimerización de filamentos de actina, provocando una mayor pérdida de líquidos por la alteración en el citoesqueleto de la célula eucariota (J. Amy et al. 2015; Matamouros et al. 2007; Monot et al. 2015).

Las cepas epidémicas NAP1 producen adicionalmente la toxina binaria y presentan una deleción de 18 pares de bases en el gen *tcdC* del PaLoc y un aumento en la resistencia a las fluoroquinolonas (Vaishnavi 2015). Varios estudios aportan información acerca de que estas cepas son capaces de producir aproximadamente 10 veces más toxina A y aproximadamente 23 veces más toxina B que las cepas históricas, lo que controversialmente se ha atribuido a una deleción parcial en el gen regulador *tcdC* (Brierley 2005).

### **2.3. Factores de riesgo de la aparición de diarrea asociada a *Clostridium difficile***

La infección por *C. difficile* está relacionada con el aumento de los costos de atención de la salud debido a estancias hospitalarias más largas. Este patógeno es un agente infeccioso asociado a la atención en salud por lo que los pacientes, los trabajadores de la salud, el ambiente hospitalario y la exposición a antibióticos; contribuyen al desarrollo de ICD (Saliba et al. 2014).

Los principales riesgos para la ICD son:

- ✓ Exposición a antibióticos como clindamicina, cefalosporinas, beta- lactámicos y fluoroquinolonas (Tabla 1).

- ✓ Edad avanzada.
- ✓ Personas inmunocomprometidas.
- ✓ Hospitalización, y la residencia en el centro de atención a largo plazo.
- ✓ Estancia en una unidad de cuidados intensivos (UCI).
- ✓ Inhibidores de la bomba de protones (Heinlen & Ballard 2011; Knecht et al. 2014).

La ICD también puede ocurrir sin exposición a los antimicrobianos sobre todo en pacientes de edad avanzada o personas inmunocomprometidas.

**Cuadro 1. Antimicrobianos relacionados a ICD, adaptada de** (Saliba et al. 2014; Goudarzi et al. 2014; T. 2015; Knecht et al. 2014).

<b>Muy frecuentes</b>	<b>Frecuentes</b>	<b>Poco frecuentes</b>
Ampicilina	Quinolonas	Vancomicina
Amoxicilina	Macrólidos	Teicoplanina
Cefalosporinas	Tetraciclinas	Aminoglucósidos
Clindamicina	Cloranfenicol	Rifampicina
Fluoroquinolonas	Trimetropin	Teicoplanina

Se ha demostrado que la microbiota intestinal protege contra la infección de *C. difficile* a través de un proceso llamado resistencia a la colonización, que involucra microbios comensales que compiten con el patógeno por el espacio y los nutrientes en el intestino (van der Waaij et al. 1971).

Los pacientes dentro de un hospital al estar con tratamiento con antibióticos, hace que la microbiota intestinal sufra alteraciones, esto junto con la exposición a las esporas de *C. difficile*, se convierte en un paso inicial importante en la patogénesis de ICD (Buonomo & Petri 2016). Estudios recientes han identificado que las alteraciones en la microbiota en respuesta al tratamiento con antibióticos, induce picos de ácido siálico que son explotados por *C. difficile* para facilitar su expansión en el intestino (Ferreyra Jessica, Wu Katherine 2014)

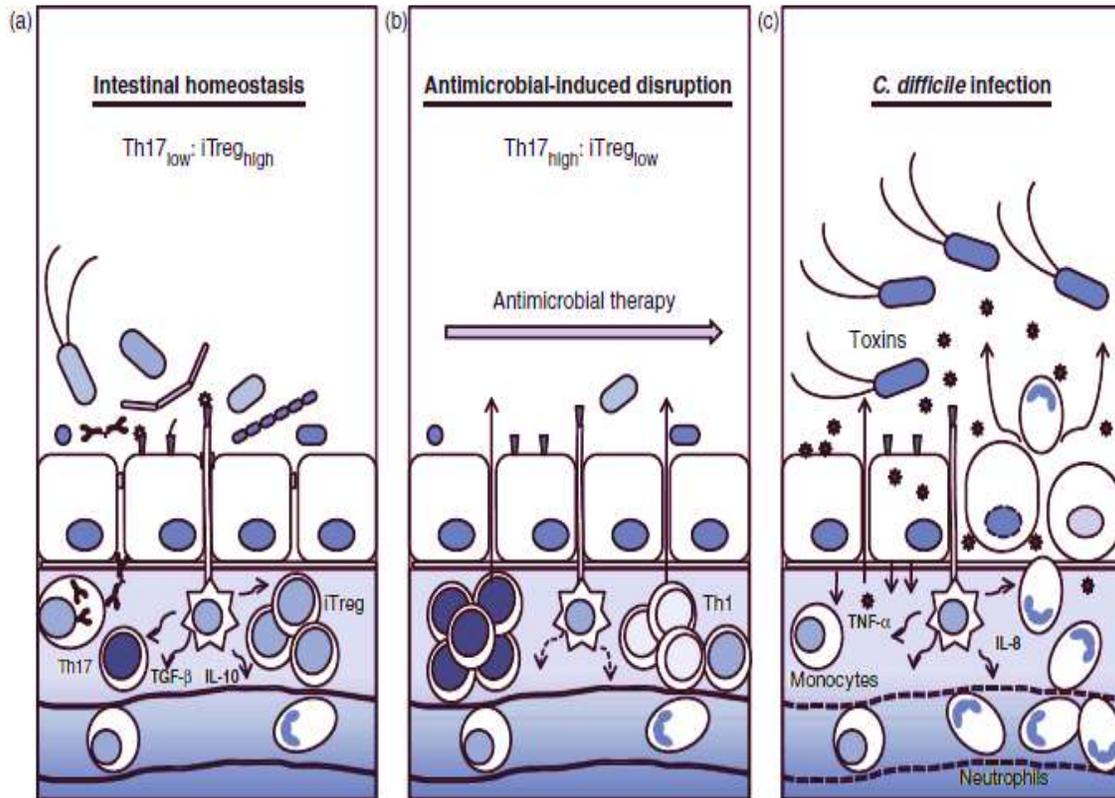
#### **2.4. Respuesta inmune del hospedero contra la infección por *Clostridium difficile***

Los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) como lípidos, ácidos nucleicos proteínas e hidratos de carbono, contribuyen a la respuesta inflamatoria del hospedero (Cowardin et al. 2015). Las alteraciones en la polaridad celular inducidas por las toxinas de *C. difficile*, pueden permitir a los PAMPs desencadenar la producción de citoquinas inflamatorias y quimiocinas como IL23, IL-1 $\beta$ . Mientras que la activación de los diferentes receptores Toll-like (TLRs) (Ryan et al. 2011), jugando un papel fundamental en la determinación del resultado final de la infección (Fig. 3).

Se ha demostrado que *C. difficile* reconoce inicialmente los TLR4, lo que resulta en la expresión de bajo nivel de IL-23; mientras que la intoxicación de las células del hospedero por las toxinas A y B, conduce a la secreción de IL-1 $\beta$ , que manda señales a través del receptor de IL-1 para incrementar la producción de IL-23; que puede ser un regulador clave del equilibrio entre la erradicación bacteriana y el daño tisular (Cowardin et al. 2015; Kasendra et al. 2013; Ryan et al. 2011).

También se ha descrito que las células dendríticas parecen actuar como los principales impulsores para establecer la respuesta Th17 durante el pico de la infección; esto está altamente relacionado con el daño epitelial disminuido (Leber et al. 2015).

El papel de los anticuerpos anti-toxina, especialmente la respuesta anti-TcdA, juega un papel muy importante en la prevención de la enfermedad primaria y recurrencia de la enfermedad. Varios estudios sugieren que ambas toxinas son fundamentales para la patogénesis de la enfermedad y, por tanto, ambos deben ser objeto de una protección efectiva (Zhao et al. 2014). Se ha descrito que los pacientes que llegan a ser colonizadas con *C. difficile*, y que pueden impulsar una respuesta inmune sistémica contra las toxinas de *C. difficile*, son menos propensos a desarrollar síntomas. Así también los pacientes sintomáticos que pueden montar una respuesta inmune temprana en el curso de su enfermedad son menos propensos a desarrollar una recurrencia de la enfermedad (Kelly & Kyne 2011; Bauer et al. 2014).



**Figura 3. Infección por *C. difficile* y la estimulación de la respuesta inmune en el hospedero.**

A). La respuesta inmune está mediada por los receptores TLR. Estos detectan las moléculas de las bacterias en la lámina propia, hay liberación de citoquinas. B). Durante la terapia antimicrobiana, da como resultado de la señalización, la acumulación de células proinflamatorias Th17 y hace que la mucosa sea más permeable. C). La infección por *C. difficile* da como resultado una lesión adicional mediada por las toxinas al epitelio, causando necrosis, liberación de citoquinas proinflamatorias y migración de neutrófilos desde la circulación periférica. Tomado de Salomon y colaboradores (Solomon 2013).

## 2.5. Manifestaciones Clínicas de las ICD.

*C. difficile* coloniza el intestino de los seres humanos y animales (Péchiné & Collignon 2016), las ICD presenta una amplia gama de enfermedades clínicas que puede variar desde una colonización asintomática, diarrea acuosa autolimitada y sin complicaciones, fiebre  $> 38^{\circ} \text{C}$ , megacolon tóxico, y hasta una colitis pseudomembranosa fatal (Bauer et al. 2009).

En la inflamación masiva del colon, las lesiones dan como resultado la formación de una pseudomembrana, moco y tejido necrótico. La colitis pseudomembranosa representa una etapa avanzada de la enfermedad y es virtualmente diagnóstica de la ICD. En algunos casos, se puede producir distensión del colon, una condición conocida como megacolon tóxico (Martin et al. 2016). Los pacientes con ICD grave o fulminante pueden presentar signos de toxicidad sistémica y el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, incluyendo leucocitosis ( $\geq 15000$  células/ $\mu\text{l}$ ), insuficiencia renal aguda, y dificultad respiratoria. También, puede conducir a perforaciones y sepsis, que son indicadores de mal pronóstico y elevada mortalidad. La colitis fulminante puede también dar lugar a la necesidad de una colectomía total (Saliba et al. 2014).

Desafortunadamente, la tasa media de mortalidad es alta tras la colectomía. En un 2 – 3% de los casos requieren cuidados intensivos y la tasa de mortalidad atribuida a ICD es de hasta 6% y puede llegar a 20% en brotes dentro de los hospitales (Rupnik et al. 2009; Freeman et al. 2010; Goudarzi et al. 2014).

## 2.6. Diagnóstico de las ICD.

El diagnóstico rápido y preciso de las ICD es esencial para mejorar el tratamiento de los pacientes y para reducir la transmisión en los centros de salud (O'Horo et al. 2012). El diagnóstico debe de estar basado en una combinación de la clínica del paciente, los exámenes de rutina como la colonoscopia o estudios histológicos, y el laboratorio.

En el laboratorio, existen diferentes métodos para establecer el diagnóstico de la enfermedad como ser:

- ✓ Ensayos inmunoenzimáticos.
- ✓ Cultivo anaerobio, más pruebas de identificación.
- ✓ Ensayos de neutralización de citotoxina por cultivo celular.
- ✓ Pruebas moleculares: PCR convencional o de tiempo real (Rodriguez et al. 2016).

Un caso de ICD, se define con la presencia de diarrea, acompañado de un análisis de materia fecal positivo para toxinas de *C. difficile* o hallazgos colonoscópicos o histopatológicos que revelen un caso de colitis pseudomembranosa (S. H. Cohen et al. 2010).

**Ensayos inmunoenzimáticos (EIA):** son ampliamente utilizados y uno de los ensayos más comunes para la detección de la toxina A, la toxina B o ambas en materia fecal.

Los resultados deben ser comparados con de la historia clínica del paciente, debido a que hay cepas que pueden no expresar la toxina que se está evaluando. Este tipo de prueba muestra sensibilidades del 72% al 82%, con especificidades entre 97% a 98% (Kim et al. 2014).

**Cultivo anaerobio:** para el aislamiento de *C. difficile* se utilizan medios selectivos, diferenciales y enriquecidos incubados en anaerobiosis, con el fin de favorecer el crecimiento de *C. difficile* y, por otro lado, eliminar la microbiota acompañante. Los medios de cultivo más ampliamente utilizados es el de agar cicloserina-cefoxitina-fructosa (CCFA) y el medio selectivo que contiene clorhidrato de cisteína, norfloxacin, y moxalactam (CDMN), estos medios de cultivo se basan en la capacidad de la cicloserina y cefoxitina de inhibir el crecimiento de la flora acompañante, y el clorhidrato de cisteína, norfloxacin y moxalactam, que reducen las contaminaciones (Quesada-Gómez et al. 2015).

Otra de las estrategias utilizadas previa al cultivo, es el shock con etanol a la muestra de heces, que se basa en la alta capacidad de supervivencia de las esporas de la bacteria frente alcohol, eliminando la microbiota acompañante y favorecer el crecimiento de la bacteria (Aspinall & Hutchinson 1992).

El cultivo anaerobio permite el aislamiento de la bacteria para su identificación fenotípica, estudios del perfil de resistencia y estudios moleculares. Es un método que tiene varias desventajas, ya que no está disponible en todos los laboratorios, debido a la dificultad que representa trabajar con bacterias anaerobias (Mullany & Roberts 2010).

**Cultivo celular:** El ensayo de neutralización de toxinas, es la prueba de referencia para la identificación de la toxina B en materia fecal, con este ensayo se puede identificar el efecto citopático que produce *in vitro* la toxina sobre tejido humano. Numerosas líneas celulares son satisfactorias para la detección de la citotoxicidad, muchos laboratorios prefieren utilizar los fibroblastos humanos basándose en el hecho de que son la línea de células más sensible para la detección de la toxina a bajas titulaciones. Se recomienda utilizar esta prueba en combinación con los criterios clínicos, la detección de genes y toxinas, debido a la variabilidad de las cepas de *C. difficile* (Knoop et al. 1993; S. Cohen et al. 2010).

La aparición de brotes epidémicos causados por cepas hipervirulentas de *C. difficile*, hacen necesario distinguir a los aislados más allá del nivel de especie; actualmente existen diversas técnicas de tipificación de las cepas, como las técnicas basadas en ácidos nucleicos, que son una herramienta muy útil, que pueden ser utilizadas para fines epidemiológicos, para entender los modos de transmisión, evaluar los factores de virulencia y los mecanismos de resistencia bacteriana. A continuación, se describen las técnicas moleculares más usadas para *C. difficile*.

**Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):** Identifica el gen *tcdB* que codifica la toxina B, el gen *tcdA* para la toxina A, el gen *ctdB* del dominio de unión de la toxina binaria, el gen del regulador negativo del PaLoc *tcdC* y de la triosa fosfato isomerasa (*tpi*) mediante PCR multiplex o PCR en tiempo real; se utiliza el gen *tpi* a pesar de ser un gen conservado pero algunas regiones variables son explotadas para la identificación de *C. difficile* (Lemee et al. 2004).

En el año 2008, la FDA aprobó el primer kit comercial para PCR en tiempo real para detección de las toxinas de *C. difficile*. La sensibilidad de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR) para la toxina A / B han sido superiores al 95% y con una especificidad del 100% (Kilic et al. 2015).

**Electroforesis en campo pulsado en gel (PFGE por sus siglas en inglés):** La técnica de PFGE es uno de los primeros métodos implementados para la tipificación de *C. difficile*, siendo considerada la técnica estándar en Norteamérica (Ngamskulrungrroj et al. 2015). Esta técnica emplea la enzima de restricción *Sma*I, que se encarga de cortar y fragmentar el genoma bacteriano; posteriormente estos fragmentos son separados en un gel de agarosa que es sometido a un campo eléctrico, lo que permite a los fragmentos migrar a través del gel de acuerdo con su tamaño y ser analizados a través de un software. Al final de la técnica se obtienen patrones de macrorestricción que permite clasificar a *C. difficile* en un determinado pulsotipo de acuerdo al patrón de las bandas en el gel. Cada pulsotipo se designa como NAP y se le asigna un número (p. ej. NAP1) (Bidet et al. 2000; Killgore et al. 2008).

**Toxinotipificación:** La toxinotipificación es un método basado en un ensayo de RFLP de los genes que codifican por las toxinas, de acuerdo con la longitud y patrones de restricción de 2 fragmentos (el B1 y A3) del PaLoc. Esta técnica presenta una gran reproducibilidad. Cuando se realiza en conjunto con PFGE o PCR-ribotipificación da buenos resultados del estatus toxigénico de las cepas de *C. difficile* en estudio.

Actualmente, se puede obtener el dato de toxinotipo por medio de un gel in silico a partir del análisis de la secuenciación del genoma completo de la bacteria. Se conocen 34 toxinotipos diferentes de *C. difficile*, estos se nombran del I al XXXIV (Marín et al. 2014; Rupnik et al. 2009; Rupnik & Janezic 2016).

**Análisis con endonucleasas de restricción (REA):** Esta técnica utiliza enzimas específicas que cortan el ADN bacteriano en muchos fragmentos que son separados por electroforesis en un gel de agarosa. La enzima más utilizada es la *Hind-III*, una enzima "cortadora" de 6 pb con numerosos sitios de restricción en el genoma. Esta técnica fue importante en el momento de identificar la cepa epidémica BI/NAP1/027 (Killgore et al. 2008; Huber et al. 2013).

**Ribotipificación:** Así como PFGE es la técnica más utilizada en América, la ribotipificación es la más utilizada en Europa y Asia. El ribotipo se define como un grupo de cepas con patrones de bandas idénticos, donde una diferencia en una sola banda representa un nuevo ribotipo. Esta técnica se basa en la amplificación, por medio de cebadores específicos de la región espaciadora interna que se encuentra entre el rARN 16S y 23S. El resultado de estas amplificaciones son bandas entre 200 y 700 pb visualizadas, normalmente, sobre un gel de agarosa o también a través de un software (Rupnik et al. 2009; S. Cohen et al. 2010; Marín et al. 2014).

**Análisis de secuencias de locus múltiples (MLST):** Esta técnica permite el estudio de la relación entre especies de bacterias, a través de la amplificación y secuenciación de aproximadamente 450-500 pb de fragmentos internos de 5 a 7 genes cromosomales. (Griffiths et al. 2010).

## 2.7. Tratamiento de la enfermedad asociada a *Clostridium difficile*.

Debido al aumento de la incidencia de las ICD en los últimos años, los entes de la salud se han visto obligados a crear una guía de tratamiento para las ICD. Los antibióticos pueden ser iniciados a la espera de diagnóstico cuando hay suficiente sospecha clínica (Bauer et al. 2009; S. H. Cohen et al. 2010).

**Cuadro 2. Recomendaciones de tratamiento para ICD, según La Sociedad Epidemiológica de Norteamérica (SHEA) y la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de Norteamérica (IDSA).**

Definición clínica	Datos clínicos de apoyo	Tratamiento
Inicial leve o moderado.	Leucocitos con un recuento de 15,000 células/ $\mu$ L.	Metronidazol 500mg, 3 veces por día, de 10 – 14 días.
Inicial grave	Leucocitos con un recuento de 15,000 células/ $\mu$ L, más un nivel elevado de creatinina en suero.	Vancomicina 125mg, 4 veces al día, de 10 – 14 días.
Inicial grave, complicado.	Hipotensión o choque, megacolon.	Vancomicina 500mg, 4 veces por día, vía oral o por tubo nasogástrico. Más metronidazol 500mg cada 8 horas por vía intravenosa.
Primera recurrencia	-----	Igual que el episodio inicial.
Segunda recurrencia		Vancomicina con un régimen de reducción gradual o dosis interrumpidas.

Tomado de (Zar et al. 2007; Leber et al. 2015; S. Cohen et al. 2010).

Debido a los reportes de fracaso del tratamiento y la recurrencia de ICD los esfuerzos recientes se han centrado en generar o considerar nuevas opciones terapéuticas.

En este contexto, en los últimos años se propuso una opción terapéutica para la ICD; en mayo de 2011, la Food and Drug Administration (FDA) aprobó fidaxomicina como el primer nuevo antibiótico para la ICD y en diciembre de 2011, fidaxomicina fue aprobado por la Agencia Europea de Medicamentos (Vaishnavi 2015; Chaparro-Rojas & Mullane 2013).

La fidaxomicina es un antibiótico bactericida, que tiene actividad muy limitado contra la microbiota del intestino. Produce una rápida supresión de la síntesis de ARN, seguido de la inhibición de la síntesis de proteínas (Biedenbach et al. 2010).

También ha surgido alternativas de tratamiento como el trasplante fecal, utilizando microorganismos intestinales a partir de un donante sano, este método se ha utilizado para tratar a pacientes con recaídas de ICD como una alternativa a la terapia con antibióticos en un esfuerzo para restaurar la microbiota intestinal, donde se ha obtenido resultados positivos (Gough et al. 2011). Alrededor de 27 estudios, han reportado una tasa de éxito del 92%, en donde los pacientes respondieron favorablemente después de un solo tratamiento (Vaishnavi 2015).

## **2.8. Resistencia a los antibióticos en *C. difficile***

Se ha observado que las cepas aisladas de *C. difficile* son resistentes a una amplia gama de antibióticos, incluyendo betalactámicos (penicilinas y cefalosporinas), aminoglucósidos, eritromicina, cefotaxime, ciprofloxacina, moxifloxacina, levofloxacina, clindamicina, tetraciclina, rifampicina y recientemente linezolid.

Las investigaciones realizadas sobre la resistencia a los antibióticos de *C. difficile*, han descrito múltiples mecanismos de resistencia, asociados por lo general a transposones y otros tipos de elementos genéticos móviles (Baines & Wilcox 2015).

Otro grupo importante de fenotipos de resistencia a antibióticos en *C. difficile* están asociados con mutaciones cromosomales. Por ejemplo, la resistencia a las fluoroquinolonas se debe a mutaciones idénticas en la subunidad A de la enzima ADN girasa (*gyrA*) (Wasels et al. 2015), mientras que la resistencia a rifampicina y rifaximina se asocia a mutaciones en la subunidad  $\beta$  de la ARN polimerasa bacteriana *rpoB* (O'Connor et al. 2008; López-Ureña et al. 2016).

La resistencia a clindamicina está relacionada al gen *ermB*, el cuál metila el ARNr 23S bacteriano. No obstante, existen reportes de cepas clindamicina resistente sin *erm(B)* y clindamicina-susceptibles con *erm(B)* (Tang-Feldman et al. 2005); por lo tanto, parece que existen mecanismos alternativos de resistencia para esta familia de antibiótico (Spigaglia 2016).

En *C. difficile* la resistencia a la tetraciclina se manifiesta como una consecuencia de la producción *TetM* pero también puede ser debido a *TetW* (Tenover et al. 2012). Tanto *TetM* como *TetW* son proteínas citoplasmáticas que protegen a los ribosomas de la acción de tetraciclinas (Chopra & Roberts 2001).

En los últimos años pocos estudios han documentado la resistencia a linezolid en cepas de *C. difficile*. El linezolid es una oxazolidinona activo frente a bacterias Gram-positivas por inhibición de la síntesis de proteínas a través de la interferencia con el ARNr 23S de las bacterias (Stevens et al. 2007).

El análisis adicional de cepas resistentes a linezolid por PCR y secuenciación han demostrado la presencia de genes similares a *cfr*, que confiere resistencia a fenicoles y una resistencia cruzada a linezolid (Gene et al. 2015).

## **2.9. Prevención y control de casos**

La mejora en el control de infecciones, con un enfoque en la prevención de la transmisión, son normativas que cada centro asistencial en salud debe elaborar, y mantener al personal actualizado sobre la importancia de tomar en cuenta estas medidas de prevención.

Los métodos de prevención para ICD deben ser implementados por todo el personal de salud. Entre ellos tenemos:

- ✓ La higiene de las manos: lavarse las manos con agua y jabón es más efectivo para la eliminación de esporas.
- ✓ Precauciones de barrera, que incluyen guantes y gabacha.
- ✓ Toallitas germicidas con 10% de hipoclorito de sodio son buenos adyuvantes para la limpieza del medio ambiente, especialmente en una situación de brote.
- ✓ En los pacientes con ICD se recomienda la hospitalización en pieza individual y en caso de ser compartida, que sea con pacientes con ICD documentada.
- ✓ Restricción en el uso de antibióticos.
- ✓ Detección precoz de pacientes infectados, cumplimiento de medidas de control y prevención establecidas (Van Kleef et al. 2014; Rupnik et al. 2009).

## CAPÍTULO 3: Metodología

### 3.1. Objetivo general:

- Determinar las características moleculares, epidemiológicas y de resistencia a antimicrobianos de las cepas de *Clostridium difficile* aisladas de pacientes hospitalizados en el Instituto Hondureño de Seguridad Social y el Hospital Escuela Universitario, Tegucigalpa, Honduras. Febrero 2016 - Junio 2016.

### 3.2. Objetivos específicos:

- Determinar la presencia de *Clostridium difficile* en muestras de heces diarreicas de pacientes con sospecha clínica por medio de la detección de toxinas A y B y cultivo de cepas.
- Describir las características epidemiológicas de los cuadros clínicos de *C. difficile* asociado a diarrea por el uso de antibióticos.
- Determinar las características moleculares por medio de la detección de genes *tcdA*, *tcdB*, *tcdC*, pulsotipo por PFGE y toxinotipo de los aislamientos de *C. difficile* obtenidos a partir de pacientes hospitalizados.
- Determinar la capacidad de las toxinas de *C. difficile* de producir efecto citopático mediante ensayos de citotoxicidad en cultivo celular.
- Describir el perfil de resistencia a los antimicrobianos de los aislamientos de *C. difficile*.

Esta investigación fue realizada en Honduras, donde los principales investigadores son el asesor de este trabajo, el Dr. Edgardo Tzoc (tutor de tesis), profesor de la Escuela de Microbiología, UNAH, y la autora de esta tesis, Fanny Hidalgo Villeda. En Costa Rica el investigador principal es el Dr. Carlos Quesada Gómez, profesor de la Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica y como asesor el Dr. César Rodríguez, profesor de la Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica. Adicionalmente, se contó con el apoyo del Dr. Marco Tulio Luque, Infectólogo del Comité de prevención y control de infecciones intrahospitalarias del Hospital de Especialidades del hospital del IHSS e Infectólogo Pediatra del Departamento de Pediatría del HEU.

### **3.3. Diseño del estudio**

En el presente trabajo de investigación es un estudio descriptivo transversal.

### **3.4. Enfoque del estudio**

Cuantitativo.

### **3.5. Área de estudio**

Se recolectaron muestras en dos hospitales de mayor demanda en Honduras como ser el Instituto Hondureño de Seguridad Social (IHSS), ubicado en la colonia La Granja en Comayagüela, Tegucigalpa, Honduras. El IHSS cuenta con 821 médicos, más de mil enfermeras, personal administrativo, de limpieza y técnicos.

Anualmente se atienden 2,688,518 consultas médicas. El total de afiliados directos ascienden a 600 mil personas y los beneficiarios indirectos representan 1 millón de personas. Las salas donde se recolectaron las muestras fueron medicina interna tanto de hombre como mujeres, séptico, patológico, unidad de cuidados intensivos de adultos y niños.

El Hospital Escuela Universitario (HEU), ubicado en el boulevard Suyapa, avenida 1ro de enero, Tegucigalpa, Honduras. Actualmente es el centro hospitalario de referencia nacional y además el centro de educación médica de pre y postgrado.

Es el único hospital en Tegucigalpa con servicio de emergencia en todas las especialidades para niños y adultos con cobertura las 24 horas del día, los 365 días del año. Las salas donde se recolectaron las muestras fueron medicina interna tanto de hombre como mujeres, emergencia de medicina interna, oncología pediátrica, nutrición y séptico.

### **3.5. Población de estudio:**

Personas de cualquier edad, hombre o mujer, con sospecha clínica de ICD, hospitalizados en el Instituto Hondureño de Seguridad Social o el Hospital Escuela Universitario, Tegucigalpa, Honduras. Enero 2015 - mayo 2016.

### **3.6. Criterio de inclusión:**

Se utilizaron algunas recomendaciones de Guías de práctica clínica para la infección por *Clostridium difficile* realizada por la Sociedad de Salud Epidemiológica de Norteamérica (SHEA) y la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de Norteamérica (IDSA).

Personas de cualquier edad, hombre o mujer; hospitalizados en el Instituto Hondureño de Seguridad Social o el Hospital Escuela Universitario, con presencia de diarrea definida como 3 o más evacuaciones de heces no formadas en 24 horas consecutivas o menos, que el motivo de ingreso de la persona al hospital no sea por diarrea, que la diarrea se presente 48h después de haber ingresado al hospital y que el médico a cargo del paciente avale la sospecha clínica de una ICD. El paciente deberá firmar el consentimiento informado (S. Cohen et al. 2010).

### **3.7. Criterio de exclusión:**

Persona que no cumpla con los criterios de inclusión. Persona que no desee participar en el estudio, que no firme y apruebe el consentimiento informado.

### **3.8. Aspectos éticos**

El presente estudio no representó ningún riesgo para los participantes, siguiéndose un riguroso proceso de codificación de las muestras para la protección de la privacidad y confidencialidad de los individuos. El protocolo de investigación de este estudio fue evaluado por el Comité de Ética de Investigación de la Maestría de Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas (CEI-MEIZ), y el Comité de ética del IHSS y HEU respectivamente, obteniendo un dictamen favorable (Anexo1).

### **3.9. Tipo de muestreo**

Muestreo no probabilístico por conveniencia.

### **3.10. Tamaño de la muestra**

En el período de tiempo comprendido entre Febrero y Junio del año 2016, se recolectaron 52 muestras de heces provenientes de pacientes con sospecha clínica de ICD, 37 HEU y 15 de IHSS, obteniendo un total de diez cepas de *C. difficile*.

### **3.11. Implementación del estudio**

El presente estudio “Caracterización molecular y epidemiológica de las cepas de *Clostridium difficile* aisladas de pacientes hospitalizados en el Instituto Hondureño de Seguridad Social y el Hospital Escuela Universitario, Tegucigalpa, Honduras. Febrero 2015 - junio 2016” se realizó en colaboración de la Universidad de Costa Rica (UCR).

El estudio se llevó a cabo en el IHSS y HEU, cuando el médico tuvo una sospecha clínica de un paciente con ICD, se procedió a informar al responsable de la investigación en cada uno de los centros asistenciales, el cual explicó el consentimiento informado al paciente, y este procedió a firmarlo.

Una vez firmado el consentimiento informado, se procedió a aplicar el cuestionario clínico y también se le explicó al personal médico y de enfermería las condiciones de la toma de la muestra de heces. La muestra fue trasladada inmediatamente en una hielera al Laboratorio de Bacteriología (UNAH), donde se realizaron las primeras pruebas, como la detección de toxinas y cultivo anaerobio.

Posteriormente las muestras en las que se confirmó la presencia de *C. difficile*, fueron trasladadas al Laboratorio de Investigación en Bacteriología Anaerobia (LIBA) ubicado en la Universidad de Costa Rica, en San José, Costa Rica para realizar la tipificación molecular, perfil de resistencia a antimicrobianos y ensayos de citotoxicidad (Anexo 2). A continuación, se describe a detalle el proceso antes mencionado.

### **3.12. Consentimiento informado de los participantes**

El consentimiento informado fue diseñado por Fanny Hidalgo y aplicado por estudiantes de la carrera de Microbiología capacitados; se le explicó detalladamente al paciente o familiar los riesgos y beneficios de participar en el estudio. También se aclaró que posterior a los resultados de la detección de toxinas para *C. difficile*, este resultado sería informado lo más pronto posible al médico a cargo del paciente.

Los pacientes tuvieron tiempo para hacer preguntas y aclarar dudas sobre el estudio. Los pacientes que aceptaron participar en el estudio, firmaron el formulario de consentimiento informado antes de iniciar su participación. El consentimiento fue firmado por un testigo en los casos en que los pacientes que participaron no supieran leer ni escribir. A cada participante se le aseguró que toda la información proporcionada será tratada con confidencialidad y que su participación es libre y voluntaria. Posteriormente se entregó el consentimiento informado el cual el paciente firmó y entregó al equipo de investigación (Anexo 3).

### **3.13. Consentimiento de los padres (Menores de edad)**

Este tipo de consentimiento fue aplicado por personal capacitado; se le explicó al padre, madre o familiar a cargo del menor detalladamente los riesgos y beneficios de participar en el estudio. También se aclaró que posterior a los resultados de la detección de toxinas para *C. difficile*, este resultado fue informado lo más pronto posible al médico a cargo del paciente.

El padre, madre o encargado tuvieron tiempo para hacer preguntas y aclarar dudas. Los padres que aceptaron que el menor participara en el estudio, firmaron el formulario de consentimiento informado antes de iniciar la participación del menor; el consentimiento fue firmado por un testigo en los casos en que los pacientes que participaron no pudieran leer ni escribir. A cada participante se le aseguró de que toda la información proporcionada será tratada con confidencialidad y que su participación es libre y voluntaria. Posteriormente se entregó el consentimiento informado el cual el paciente firmó y entregó al equipo de investigación (Anexo 4).

### **3.14. Asentimiento de los menores de edad**

Los niños cuyos padres firmaron consentimiento informado fueron invitados a participar en el estudio. Los niños que manifestaron su consentimiento a participar en el estudio se inscribieron como consientes (lo que esto involucró contestar un cuestionario, proporcionar una muestra de materia fecal). El asentimiento del niño se obtuvo verbalmente y fue documentado a través de un formulario de asentimiento de los niños (Anexo 5).

### **3.15. Recolección y manejo de datos epidemiológicos**

Para implementar el estudio se administró un cuestionario clínico (Anexo 6) a los participantes. Asimismo, se les solicitó una muestra de heces para ser examinada en busca de las toxinas, perfil molecular y citotoxicidad de *C. difficile*.

La recolección de datos se llevó a cabo usando un cuestionario clínico, antes de aplicar el cuestionario en la población de estudio, se realizó una validación del mismo. La entrevista se realizó en privado y cada pregunta fue hecha verbalmente con las respectivas aclaraciones de ser necesario; los datos recolectados en el cuestionario clínico fueron edad, sexo y sala de los pacientes, el conteo más alto de glóbulos blancos, la temperatura corporal registrada en el expediente durante el proceso de la enfermedad, también el médico a cargo proporcionó datos sobre la exposición previa a antimicrobianos y el diagnóstico de ingreso de cada uno de los pacientes.

A cada participante se le asignó un número de registro único de identificación para el estudio y toda información que permita identificarla fue manejada de forma confidencial, también se creó un registro electrónico y un libro de registro como respaldo.

### **3.16. Recolección y transporte de la muestra de heces**

Se distribuyó recipientes transparentes, limpios, de boca ancha y con tapadera hermética en los dos centros asistenciales para la recolección de muestras de heces.

También se les dio indicaciones específicas de cómo recolectar las muestras. El participante entregó la muestra de heces al encargado de la investigación y este la rotuló con el nombre y código asignado al participante.

Las muestras recolectadas fueron transportadas inmediatamente al Laboratorio de Bacteriología (UNAH), introducidas en una hielera con icepacks para mantener una temperatura fría, para que las toxinas de la bacteria no se degradaran. De no poder transportar la muestra el mismo día al laboratorio, esta se mantuvo a -10 °C, hasta su transporte al laboratorio.

### **3.17. Técnicas de laboratorio**

#### **3.17.1 Procesamiento de muestras fecales:**

Las muestras fecales recibidas y registradas fueron sometidas a los siguientes procedimientos:

##### **a) Detección de toxinas A y B de *C. difficile***

Se realizó por medio de un inmunoensayo en las muestras de heces, utilizando la prueba Xpect *Clostridium difficile* toxinas A/B test (Remel®), siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo 7) (S. Cohen et al. 2010).

##### **b) Cultivo anaerobio de *C. difficile* a partir de las muestras de heces**

Para el cultivo anaerobio, se guio por lo establecido anteriormente por Quesada y colaboradores (Quesada-Gómez et al. 2015).

Brevemente, las muestras de heces fueron tratadas con etanol al 96% y se inocularon en placas de agar cefoxitina-cicloserina con fructosa (CCFA) (Oxoid), y se incubaron durante 48 - 72 horas a 37°C en una jarra de anaerobiosis. Las colonias amarillas en CCFA se inocularon en placas de agar de Brucella con sangre de caballo lisada al 5% (Oxoid) y suplementado con 10 mg / ml de vitamina K (BAK), se incubaron durante 48 horas a 37°C en jarras anaeróbicas. La identificación fenotípica de los aislamientos se realizó utilizando el sistema RapID 32A (bioMérieux) y la prueba de fluorescencia en agar BAK bajo luz ultravioleta de onda larga.

Estos medios se realizaron de acuerdo a los protocolos establecidos por el LIBA, UCR, Costa Rica y las instrucciones de los fabricantes. (Anexo 8 y 9).

### **3.17.2. Mantenimiento de las cepas después del cultivo hasta su traslado a Costa Rica**

Los aislamientos se subcultivaron en caldo infusión cerebro corazón (BHI) con 20% de glicerol y se congelaron a -20°C hasta su transporte al LIBA de la Universidad de Costa Rica para su caracterización molecular (Anexo 10).

### **3.17.3. Transporte de las cepas al LIBA, Costa Rica**

Se prepararon las esporas de *C. difficile* a partir de los aislamientos almacenados a -20°C, estas se cultivaron en BAK por cinco días a 37°C en jarras de anaerobiosis. Después de ese período de incubación, se verificó la pureza de las cepas (morfología colonial, tinción de Gram, olor, fluorescencia en UV) de las cepas crecidas en BAK.

Posteriormente se realizó una suspensión de las esporas en agua destilada estéril, se inocularon 100 µl en el papel filtro seco, cuando el papel filtro estaba totalmente seco, se introdujo 4 papeles filtro por cepa en bolsas estériles. Se guardaron hasta su traslado al LIBA, UCR.

#### **3.17.4. Procedimientos a realizar a partir del cultivo anaerobio**

Las esporas de las cepas se trasladaron en papel filtro al LIBA, UCR. Cada fragmento de papel filtro con esporas de *C. difficile*, se colocó en medio de carne picada con BHI y pre-reducido para bacterias anaerobias, asignándoles un código del LIBA, estos medios se incubaron 48h a 37°C. Después de este tiempo, los caldos fueron sembrados en Agar *Clostridium difficile* monoxalactam y norfloxacin (CDMN) y se incubaron 48h en cámara de anaerobiosis bajo una atmósfera compuesta de 90% de N<sub>2</sub>, 5% de H<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub> (Bactron II, ShellLab, Cornelius, OR, EE.UU.). Las colonias sospechosas se sembraron en Agar Brucella suplementado con vitamina K y 5% de sangre lisada de caballo (BAK), se incubaron 48h en la cámara de anaerobiosis. A partir del cultivo de BAK se realizó a cada cepa la prueba de fluorescencia y coloración de Gram (Anexo 10).

**A partir del cultivo en BAK, se realizó el siguiente procedimiento:**

##### **a) Extracción de ADN**

El ADN de cada cepa se obtuvo a partir de cultivos de ocho horas en BHI, utilizando el kit comercial InstaGene (Bio-Rad, Hércules, CA) según las instrucciones del fabricante y según lo descrito previamente por Quesada y colaboradores (Quesada-Gómez et al. 2015) (Anexo 11).

### **b) Detección de genes *tcdA*, *tcdB*, *tcdC*, *ctdB* y *tpi***

Se determinó la presencia de los genes de la toxina A (*tcdA*), toxina B (*tcdB*), del dominio de unión de la toxina binaria (*ctdB*), del regulador negativo del PaLoc (*tcdC*) y para la confirmación de la identificación de los aislamientos el gen triosa fosfato isomerasa (*tpi*) mediante PCR-multiplex. Se utilizó el protocolo, los cebadores y las condiciones descritas por Lemee y colaboradores (Lemee et al. 2004).

Los productos amplificados se visualizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% de doble peine en buffer TBE 0.5X, con una corrida de 100V por 90 minutos y se visualizaron con un colorante de carga de ADN suplementado con Gelred (Biotium) y las imágenes fueron capturadas utilizando un fotodocumentador BioDoc-it™ (UVP).

Como controles de amplificación fueron utilizados, una cepa NAP1 de referencia R20291 (A+B+ con una deleción de 18 pb en el *tcdC* y CDT+), una NAP7 (A+B+, con una deleción de >18 pb en el *tcdC* y CDT+) y una cepa NAP9 (A-B+, sin deleción en el *tcdC* y CDT+) (Anexo 12).

### **c) Determinación de pulstipo por electroforesis en campo pulsante (PFGE)**

Se determinó el patrón de macrorestricción mediante PFGE de cada uno de las cepas de *C. difficile* de acuerdo con el método descrito por Quesada y colaboradores (Quesada-Gómez et al. 2015). Brevemente, el ADN bacteriano se obtuvo a partir de cultivos de 6 a 8 h en BHI.

Se prepararon tapones de agarosa mezclando volúmenes iguales de suspensiones bacterianas y agarosa SeaKem Gold® en tampón Tris-EDTA (Sigma, Deisenhofen, Alemania). Los tapones se incubaron durante la noche a 37°C con lisozima (2 mg / ml) y ARNasa a (20 µg/ml) (Sigma) y se trataron con proteinasa K (20 mg / ml). Se realizó la digestión con la enzima de restricción *Sma*I (Roche®, Mannheim, Alemania) y se incubó durante la noche a 37°C, los fragmentos de ADN se separaron en agarosa al 1% ( Bio-Rad® Pulse Field Certified Agarose) mediante un equipo CHEF-DRIII (Bio-Rad® Laboratories) durante 21 horas. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se fotodocumentaron usando ChemiDoc™ XRS, posteriormente, las imágenes fueron analizadas con el software BioNumerics, v4.6 (Applied Maths), y los patrones de macrorestricción obtenidos, se compararon con los depositados en la base de datos del National Microbiology Laboratory de Canadá. Como control de corrida se utilizó se utilizó ADN obtenido de una cepa *Salmonella* ser. Braenderup H9812 (Anexo 13).

#### **d) Toxinotipificación**

La Toxinotipificación es una técnica donde se amplifica el segmento B1 de la toxina B y el segmento A3 de la toxina A mediante un PCR con las condiciones descritas por Rupnik y colaboradores (Rupnik & Janezic 2016).

En este estudio se escogieron tres cepas representantes de cada patrón de macrorestricción para secuenciar su genoma completo y así determinar su toxinotipo *in silico*. Para el patrón 0461 la cepa HON11, para el patrón 1056 la cepa HON10, y para el patrón 1057 la cepa HON06.

Para mandar a secuenciar cada una de las cepas mencionadas, se realizó una extracción de ADN utilizando un Kit comercial (QUIAGEN-DNeasy® Blood & Tissue Kit) siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo 14).

Al finalizar este procedimiento, se obtuvieron 200 µL de ADN de cada cepa, el cual se cuantificó en el NanoDrop, obteniendo las siguientes concentraciones, para la cepa HON06 30 ng/µl, para HON10 23.6 ng/µl y para HON11 22.6 ng/µl; posteriormente se realizó una electroforesis en agarosa al 1%, el ADN fue almacenado en tubos Eppendorf a -20<sup>o</sup> C hasta su envío.

El ADN fue enviado vía FedEx a la empresa MicrobesNG en el Reino Unido para su secuenciación. Para obtener el toxinotipo de cada cepa, se realizó una digestión *in silico* con las enzimas *EcoRI* y *HincII* de los fragmentos A3 y B1 utilizando el software GeneiousR10, se ingresaron las secuencias de los fragmentos A3 y B1 al software, y se digirieron *in silico* con las enzimas *EcoRI* y *HincII*, obteniendo finalmente un gel virtual.

#### **e) Ensayos de citotoxicidad y determinación del efecto citopático**

Se utilizaron monocapas de células HeLa para determinar los títulos de citotoxicidad y efecto el efecto citopático (CPE) de cada una de las cepas. Los sobrenadantes de 24 horas se diluyeron decimalmente 10-12 veces de forma seriada y estas diluciones se añadieron a monocapas de cultivo celular. El CPE se determinó mediante la observación en un microscopio invertido por deformación redondeada con ramificaciones para el efecto clásico arborizante o por deformación más marcadamente redondeada sin ramificaciones para el efecto variante.

El título de citotoxicidad fue establecido como la máxima dilución positiva en la que se presente un efecto citopático.

El título de citotoxicidad se reportó como el promedio  $\pm$  desviación estándar de los resultados de los experimentos en células HeLa por duplicado. Además, se reportó el CPE<sub>50%</sub> (que se establece como el inverso de la dilución en la que se afecta a un 50% de las células) de cada una de las cepas en estudio, evaluando así en porcentajes la presencia del CPE en la monocapa del cultivo celular de HeLa. La figura del ensayo de citotoxicidad se preparó con el programa GraphPad Prism 5, ajustando los datos con una regresión no lineal para el cálculo de la dosis letal 50 por patrón de macrorestricción (Anexo 15).

#### **f) Pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos**

Se determinaron las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) para la clindamicina, ceftioxina, ciprofloxacina, moxifloxacina, levofloxacina, linezolid, tetraciclina, tigeciclina, rifampicina, vancomicina y metronidazol, utilizando tiras de E-test (AB bioMérieux, Askim) y placas de agar Brucella con 5% de sangre lisada de caballo, 1  $\mu$ g / mL de vitamina K y 5  $\mu$ g / mL de hemina, con 4mm de espesor (Agar E-test). Se utilizó *C. difficile* ATCC 700057 como cepa control, según los lineamientos establecidos en M11-A7, M100-S21 por Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

Para lo anterior, se realizó una suspensión de la bacteria equivalente a la turbiedad del estándar 3 de McFarland a partir de colonias crecidas en BAK durante 18-24 horas a 37°C en anaerobiosis (90% N<sub>2</sub>, 5% H<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>; Bactron II, Shell Lab®), esta suspensión se inoculó en agar E-test en tres direcciones y se colocan las tiras de antibiótico en los 5 minutos siguientes. Las placas se incubaron bajo una atmósfera compuesta de 90% de N<sub>2</sub>, 5% de H<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub> en una cámara de anaerobiosis Bactron II (ShellLab, Cornelius, OR, EE.UU.) a 37°C durante 48 h. Para la categorización de susceptibilidad se utilizaron los puntos de recomendados por el CLSI: 0.25 µg/ml para tigeciclina, 4 µg/mL para linezolid, 8 µg/mL para clindamicina, ciprofloxacina, levofloxacina y moxifloxacina, 16 µg/mL para tetraciclina, 32 µg/ml para metronidazol y 64 µg/ml para cefoxitina. Para rifampicina y vancomicina se adoptaron los puntos de corte recomendados en el documento M100-S21 para *Staphylococcus aureus* porque no se han definido valores para las bacterias anaerobias; estos valores fueron 4 µg/mL para rifampicina y 16 µg/mL para vancomicina (Anexo 16).

#### **g) Detección de los genes *tetM* y *cfr* por PCR**

Se realizó una PCR para determinar la presencia de genes que se asocian a resistencia a tetraciclina (*tetM*) y linezolid (*cfr*). Se utilizó el protocolo, cebadores, las condiciones descritas por Marín, Spingaglia y colaboradores (Marín et al. 2015; Spigaglia et al. 2006).

Los productos amplificados se visualizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% en buffer TBE 0.5X, con una corrida de 100V por 90 minutos, luego se visualizaron con un colorante de carga de ADN suplementado con Gelred (Biotium) y las imágenes fueron capturadas utilizando un fotodocumentador (BioDoc-it™ de UVP) (Anexo 17).

### **3.18. Aspectos de bioseguridad**

El estudio fue presentado al Oficial de Bioseguridad de la Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas de la Escuela de Microbiología para su evaluación en relación al cumplimiento de las normas de bioseguridad establecidas (Anexo 18).

La manipulación de las muestras, así como los procedimientos se desarrollaron en un laboratorio con nivel de bioseguridad tipo II dadas las características de la muestra en estudio que representaba un riesgo mínimo de infección, debido a la biología de la bacteria, y que se necesitan condiciones específicas para poder desarrollar ICD. Se elaboraron y siguieron los procedimientos operativos estándar específicos de cada etapa del estudio.

### **3.19. Análisis de datos.**

Dado el diseño del estudio de tipo descriptivo y las características de las cepas, se determinaron estadísticos descriptivos de frecuencia, para ellos se utilizó el programa estadístico INFOSTAT para el análisis de estadística descriptiva.

Se elaboraron tablas y figuras para la presentación de las frecuencias de los datos microbiológicos, epidemiológicos, moleculares y de resistencia.

Para la digitalización del gel y determinación de pulsotipo se utilizó el software BioNumerics v4.6 (Applied Maths) y la base de datos del National Microbiology Laboratory of Canada, Public Health Agency.

Adicionalmente, se creó una figura para los ensayos de citotoxicidad, con la cual se estimó las CP<sub>50</sub> para cada una de las cepas, utilizando una regresión no lineal con el programa GraphPad Prism 5 y los datos se separaron por patrón de macrorestricción.

**Cuadro 3. Plan de análisis de datos**

<b>Variables</b>	<b>Fuente de datos</b>	<b>Análisis estadístico</b>
<b>1. Presencia de toxinas A y B de <i>C. difficile</i></b>	Prueba Xpect <i>C. difficile</i> A/B test de Oxoid®	-Descriptivo: -Análisis de frecuencias de las toxinas A y B.
<b>2. Cultivo anaerobio de <i>C. difficile</i></b>	Crecimiento de <i>C. difficile</i> en Agar BAK y CCFA	-Descriptivo: - Análisis de frecuencias de cultivos positivos por <i>C. difficile</i> .
<b>3. Presencia de genes <i>tcdA</i>, <i>tcdB</i>, <i>tcdC</i>, <i>ctdB</i> y <i>tpi</i>.</b>	PCR multiplex para los genes <i>tcdA</i> , <i>tcdB</i> , <i>tcdC</i> , <i>ctdB</i> y <i>tpi</i> .	- Descriptivo. - Análisis de frecuencias de cada uno de los genes.
<b>4. Pulsotipo</b>	Determinación de pulsotipo por electroforesis en campo pulsante (PFGE)	Software BioNumerics v4.6 (Applied Maths) con las bases de datos del National Microbiology Laboratory of Canada, Public Health Agency, Análisis de frecuencias de los pulsotipos resultantes.

5. Toxinotipo	Toxinotipificación	Descripción de toxinotipos
6. Citotoxicidad	Ensayos de citotoxicidad y determinación del efecto citopático	Regresión no lineal
7. Perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos	<p>Pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos. CMI de clindamicina, ciprofloxacina, moxifloxacina, vancomicina, rifampicina, linezolid y metronidazol mediante el uso de tiras E-test®.</p> <p>PCR para los genes <i>tetM</i> y <i>cfr</i></p>	<p>Determinación de porcentajes de resistencia y de percentiles 50 y 90 para cada uno de los antimicrobianos.</p> <p>Análisis de frecuencia de los genes <i>tetM</i> y <i>cfr</i>.</p>

## CAPÍTULO 4: Resultados

Durante el período comprendido de Febrero a Junio del año 2016, se analizaron un total de 52 muestras fecales de centros hospitalarios de Honduras, Hospital Escuela Universitario (n= 37) y el hospital del Instituto Hondureño de Seguridad Social (n=15), obteniendo un total de diez aislamientos de *C. difficile*.

### 4.1. Detección de toxinas A y B, y aislamiento anaerobio de *C. difficile*

El 21% del total de las muestras resultaron positivas para las toxinas A y B, de las cuales, un 15% provenientes del HEU y un 6% del IHSS.

El porcentaje de recuperación por cultivo anaerobio fue ligeramente mayor que el resultado en la detección de las toxinas, ya que se aislaron un 27% del total de las muestras (HEU: 21% vs. IHSS: 6%). Las muestras con cultivo anaerobio positivo, dieron lugar a 10 aislamientos, que fueron caracterizados por PCR multiplex, PFGE y toxinotipo; obteniendo las características epidemiológicas de los pacientes, datos de citotoxicidad y de resistencia a los antimicrobianos.

### 4.2. Análisis epidemiológico de los aislamientos de *C. difficile*

A partir del cuestionario clínico, se obtuvieron los porcentajes para cada uno de los datos clínicos y epidemiológicos de las infecciones producidas por *C. difficile*.

En los 10 aislamientos obtenidos (8 del HEU y 2 del IHSS), el rango de edad de los pacientes fue de 24 a 86 años de edad (Cuadro 4). El 80% de los pacientes corresponden al sexo femenino y el 20% al sexo masculino.

El 70% de los pacientes infectados obtuvieron un conteo de glóbulos blancos por encima de 15,000 células/ $\mu$ l y una temperatura  $>38^{\circ}\text{C}$  durante el transcurso de la infección.

En cuanto al diagnóstico inicial de los pacientes, la sepsis, diabetes, enfermedad de origen gastrointestinal y respiratorio, fueron las patologías reportadas en estos pacientes.

Por otro lado, se obtuvo información sobre la exposición a antibióticos de los pacientes previa a la aparición de los síntomas de la enfermedad; resaltando que la mayoría tuvieron exposición a cefalosporinas, carbapenems y fluoroquinolonas.

**Cuadro 4. Características clínicas de los pacientes infectados con genotipo NAP1 de *C. difficile* (n=10).**

Variable	(%)
Edad (rango) *	24 - 86
Sexo:	
Femenino	80
Masculino	20
Características clínicas:	
Conteo de glóbulos blancos $>15,000$ células/ $\mu$ l	70
Fiebre $>38^{\circ}\text{C}$	70
Diagnóstico de inicio:	
Sepsis	30
Diabetes	30
Respiratorio	20
Gastrointestinal	20

Exposición a antimicrobianos:

Exposición a cefalosporinas	90
Exposición a Carbapenems	40
Exposición a fluoroquinolonas	33

\* La información se obtuvo a partir de un cuestionario clínico – epidemiológico.

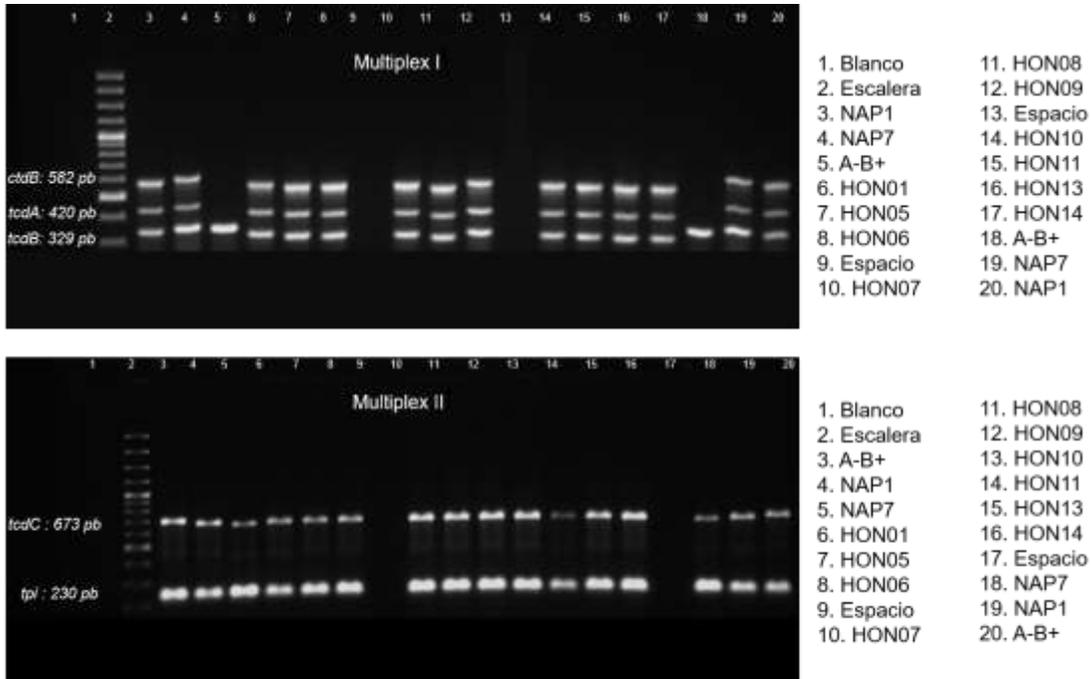
### **4.3. Caracterización molecular de las cepas de *C. difficile***

#### **4.3.1. PCR Multiplex**

Las cepas fueron analizadas por PCR-multiplex (Multiplex I y Multiplex II) para demostrar la presencia de genes del PaLoc (*tcdA*, *tcdB*, *cdtB* y *tcdC*) y el gen *tpi* para confirmar la identidad de las cepas como *C. difficile*.

El PCR Multiplex I y II demostró que todas las cepas tenían la presencia de los genes *tcdA*, *tcdB*, *tcdC*, *cdtB* y *tpi*; así como una delección en el gen *tcdC* (Fig. 4).

**Figura 4. Detección de genes de toxinas y confirmación de identificación de *C. difficile* por PCR multiplex.**



Escalera: Gene Ruler, 100pb, Fermentas.

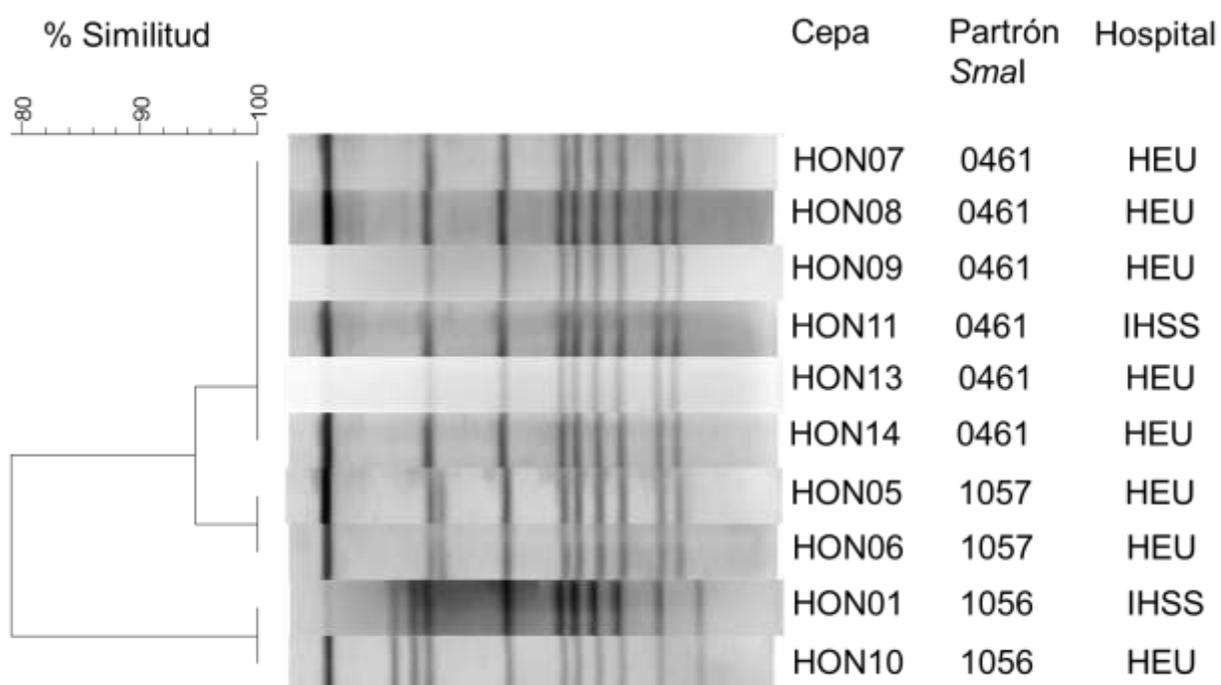
Se utilizaron las cepas **NAP1** (*tcdA* +, *tcdB* +, *cdtB*+, *tcdC*+ y *tpi* +), **NAP7** (*tcdA* +, *tcdB* +, *cdtB*+, *tcdC*+ y *tpi* +) y **A-B+** (*tcdA* -, *tcdB* +, *cdtB*-, *tcdC*+ y *tpi* +) como controles de peso molecular de las bandas para los diferentes genes.

#### 4.3.2. Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE).

Al total de las cepas se les realizó una electroforesis en gel de campo pulsado para obtener la clasificación NAP y el patrón de macrorestricción *Sma*I de cada una ellas. Las imágenes obtenidas fueron analizadas con el software BioNumerics, v4.6 (Applied Maths). Para dar una designación NAP y el patrón de macrorestricción a cada una de las cepas, el patrón de bandas debió coincidir con algún genotipo en la base de datos, en el caso de que no coincidieran se determinó como genotipo nuevo.

Todas las cepas analizadas fueron clasificadas como genotipo NAP1, encontrando tres diferentes patrones de macrorestricción *Sma*I denominados 0461 y 1056 (encontrados en ambos hospitales), mientras que el patrón 1057 fue encontrado solamente en el HEU (Fig. 5).

**Figura 5. Tipificación de cepas de *C. difficile* por electroforesis en gel de campo pulsado.**

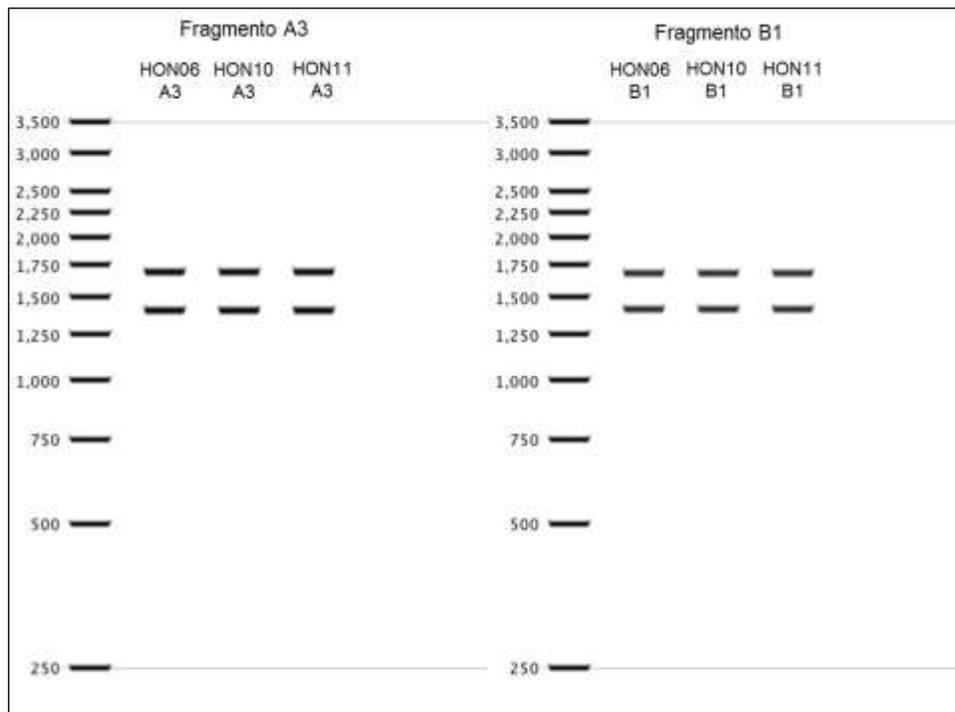


#### 4.3.3. Toxinotipificación

La toxinotipificación fue realizada solamente a una cepa de cada uno de los patrones de macrorestricción *Sma*I encontrados, es decir, HON06 del patrón 1057, HON10 del patrón 1056, y HON11 del patrón 0461.

La obtención de dos fragmentos para A3 (*EcoRI*, 1403 bp+ 1688 bp) y dos fragmentos para B1 (*HincII*, 1681 bp + 1408 bp) reveló que todos los aislamientos pertenecían al toxinotipo IV (Fig. 6).

**Figura 6. Toxinotipificación de cepas de *C. difficile* utilizando las enzimas restricción *EcoRI* e *HincII*.**



\*Se escogió una cepa de cada patrón de macorrestricción para secuenciar su genoma completo y se realizó una digestión in silico de los fragmentos A3 y B1 - GeneiousR10.  
\*Se compararon los tamaños esperados para los fragmentos de los diferentes toxinotipos con la base de datos publicada por Rupnik y colaboradores.

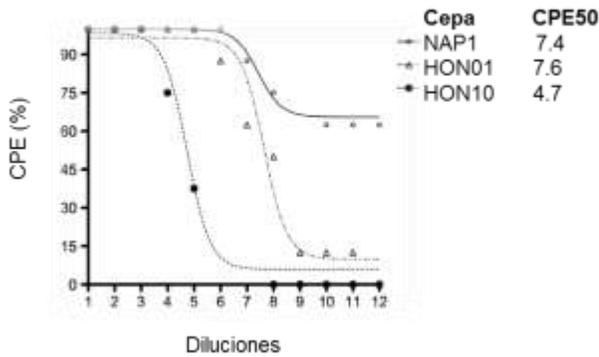
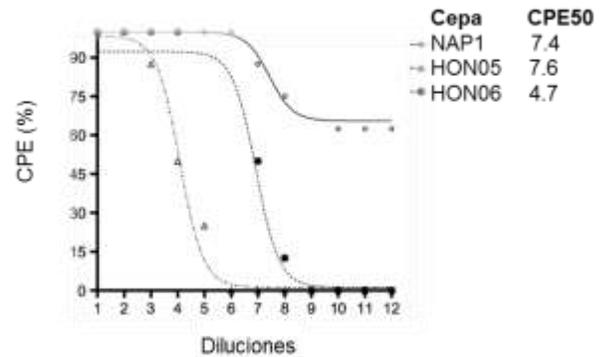
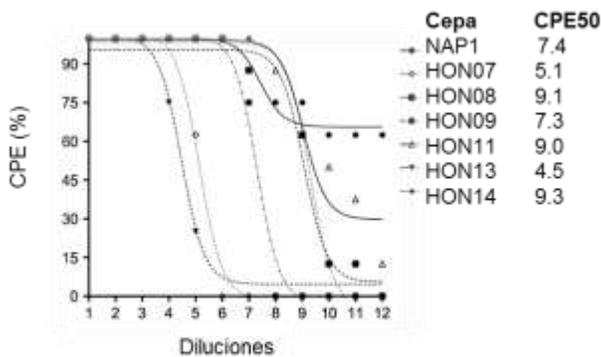
#### 4.4. Ensayos de citotoxicidad

Para realizar los ensayos de citotoxicidad se inocularon los sobrenadantes de las toxinas de las 10 cepas de *C. difficile* en células HeLa y se observó el efecto citopático (CPE), obteniendo los títulos de citotoxicidad y la CPE50 de las cepas.

Las cepas analizadas producen un CPE clásico en células HeLa, que se caracteriza por una deformación redondeada de las células. El porcentaje de mortalidad más alto fue el de la cepa HON11 del patrón 0461 (100% de mortalidad hasta la dilución 11), mientras que el patrón 1056 dio lugar a un 25% de mortalidad hasta la dilución 10 y el patrón 1057 a un 25% de mortalidad hasta la dilución 8 (Figura 7).

También se obtuvo los datos de CPE50, resaltando que el dato más alto fue para las cepas HON14, HON11 y HON08, estas cepas pertenecen al patrón de macrorestricción 0461. Mientras que los datos de CP50 más bajos son para las cepas HON10 (1056) y HON06 (1057).

**Figura 7. Efecto citopático en células HeLa producido por las toxinas de *C. difficile*, agrupados por patrón de macrorestricción *Sma*I.**

**A** Citotoxicidad en células HeLa (*SmaI* 1056)**B** Citotoxicidad en células HeLa (*SmaI* 1057)**C** Citotoxicidad en células HeLa (*SmaI* 0461)

Se obtuvo la CPE50, por patrón de macrorestricción *SmaI*, (A) *SmaI* 1056, (B) *SmaI* 1057 y (C) *SmaI* 0461, utilizando la cepa CQ33 (NAP1) como control de titulación.

#### 4.5. Perfil de resistencia a antimicrobianos

Para analizar el perfil de resistencia de las cepas, se obtuvo la CIM y el porcentaje de cepas resistentes. Todos los aislamientos fueron resistentes a clindamicina, cefoxitina, ciprofloxacina, moxifloxacina, levofloxacina y linezolid (Fig. 8).

El rango de CIM para tetraciclina fue de 0.125 - >32 µg/ml, para tigeciclina de 0.047 - >256 µg/ml y para rifampicina de 0.002 - >32 µg/ml, resaltando que los aislamientos con el patrón de macrorestricción *SmaI* 1056 (n=2) que se encuentra en ambos hospitales fueron resistentes a tetraciclina, tigeciclina y rifampicina, con CIMs más altas.

Los aislamientos que pertenecen al patrón de macrorestricción 0461 (n=6) resultaron resistentes a tigeciclina, y sensibles a tetraciclina y rifampicina; mientras que todos los aislamientos del patrón 1057 (n=2) que solamente se encuentra en el HEU, resultaron sensibles a estos tres últimos antibióticos. Todos los aislamientos resultaron sensibles a vancomicina y metronidazol.

La CIM<sub>90</sub> para clindamicina, cefoxitina, y tigeciclina fue de >256 µg/ml; para ciprofloxacina, moxifloxacina, levofloxacina, tetraciclina y rifampicina >32 µg/ml, linezolid 48 µg/ml; y para vancomicina y metronidazol tan solo 3 µg/ml y 1.5 µg/ml, respectivamente (Cuadro 5).

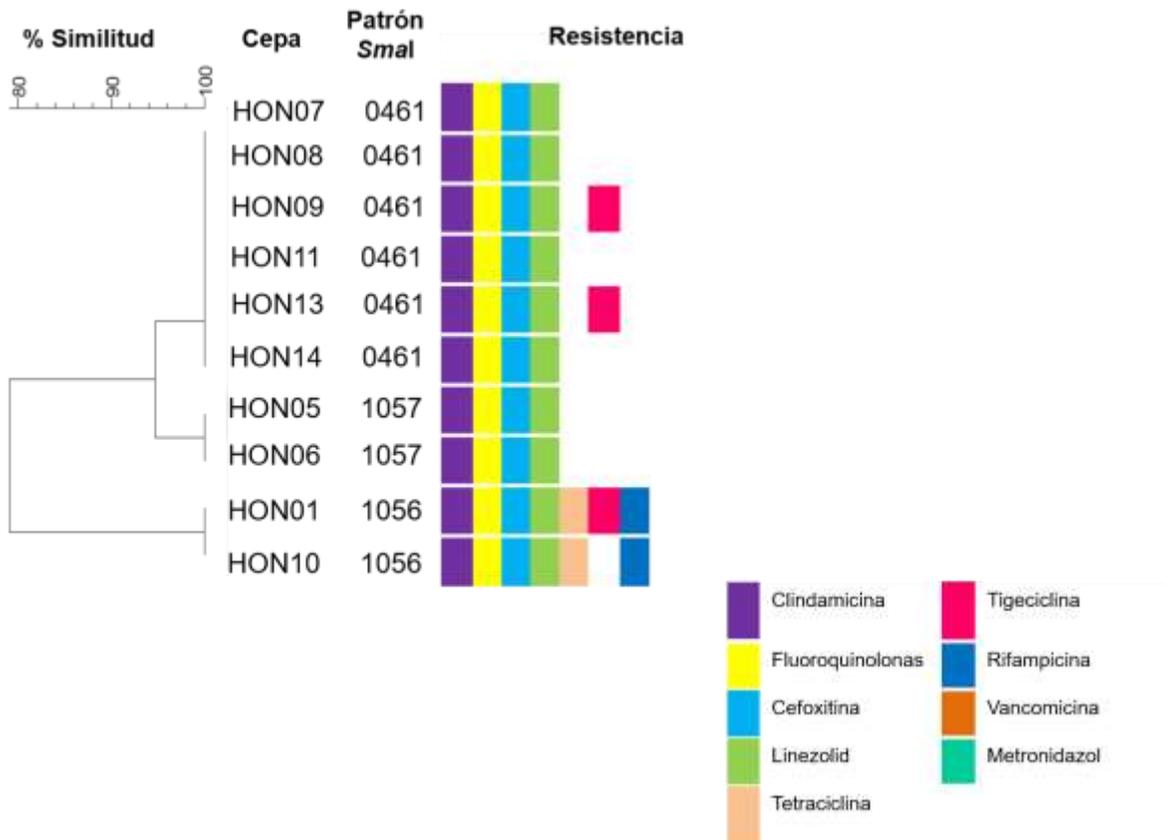
**Cuadro 5. Perfil de resistencia a antimicrobianos de cepas de *C. difficile*.**

Antimicrobiano	CIM <sub>90</sub> (µg/mL)	Rango de CIMs (µg/mL)	% Resistencia
Clindamicina	>256	>256	100
Ciprofloxacina	>32	>32	100
Moxifloxacina	>32	>32	100
Levofloxacina	>32	>32	100
Cefoxitina	>256	>256	100
Linezolid	48	16 – 48	100
Tetraciclina	24	0.125 - >32	20
Tigeciclina	>256	0.047 - >256	30
Rifampicina	>32	0.002 - >32	20
Vancomicina	3	0.75 – 3	0
Metronidazol	1.5	1.5	0

\**C. difficile* ATCC® 700057 como control.

\*Los resultados se interpretaron de acuerdo a los lineamientos del CSLI (M11-A7, M100-S21, 2011).

**Figura 8. Resistencia a los antimicrobianos de las cepas de *C. difficile*, agrupados por patrón de macrorestricción *Sma*I.**

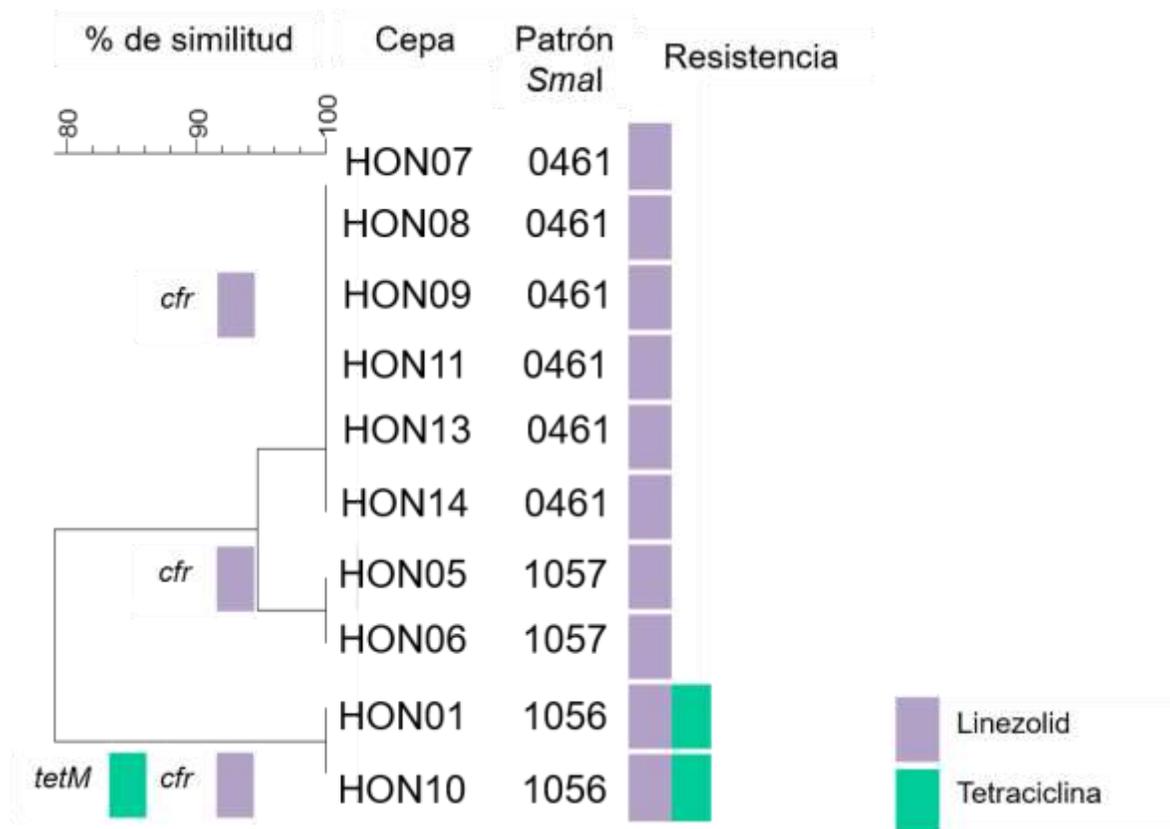


\* Adicionalmente el patrón 1056 representa resistencia a tetraciclina, tegeciclina y rifampicina

Adicionalmente, se realizó una PCR en busca de genes de resistencia. Se amplificó el gen *tetM*, para la resistencia a tetraciclina, y para la resistencia a linezolid se amplificó el gen *cfr*. Se escogieron estos genes, debido a que son los más asociados a la resistencia de estos dos antimicrobianos en *C. difficile* (Fig. 9).

Todas las cepas amplificaron del gen *cfr*, y para la resistencia a tetraciclina, las cepas HON01 y HON10 amplificaron para el gen *tetM* y ambas pertenecen al patrón de macrorestricción 1056.

**Figura 9. Genes asociados a resistencia a tetraciclina y linezolid**



\*Se utilizó el protocolo, cebadores y las condiciones descritas por Marín, Spingaglia y colaboradores

## CAPÍTULO 5: Discusión

En la última década *C. difficile* ha sido reconocido como uno de los patógenos más importantes dentro de los hospitales provocando gastos elevados en el tratamiento de las enfermedades que produce (Goudarzi et al. 2014). La incidencia y severidad de las ICD ha ido en aumento alrededor del mundo, en parte debido al surgimiento de cepas epidémicas que se caracterizan por ser hiperproductoras de toxinas y multirresistentes a los antibióticos (Anon 2012; Lopez-Urena et al. 2014).

Aquí se describe por primera vez la aparición de cepas de *C. difficile* en Honduras, con características genéticas, clínicas y de virulencia que se asemejan a las de las cepas NAP1 causantes de brotes dentro de hospitales en Europa, Asia y América.

A partir de pacientes con sospecha clínica de ICD provenientes del HEU y el hospital del IHSS, se recolectaron 52 muestras de heces; que fueron procesadas para la detección de toxinas A y B de *C. difficile* y cultivo anaerobio. En este estudio, el 21% del total de las muestras fueron positivas para ambas toxinas, y el porcentaje de positividad fue ligeramente mayor utilizando cultivo anaerobio con un 27% (Tabla 4).

Los datos anteriores apoyan los resultados de investigaciones basadas en la búsqueda de un método eficaz para el diagnóstico oportuno de ICD, principalmente como respuesta a brotes dentro de hospitales. Confirmando que la sensibilidad del cultivo anaerobio es mayor que el de la detección de toxinas por pruebas comerciales rápidas (Kim et al. 2014; Mullany & Roberts 2010; Martin et al. 2016).

En este contexto, se recomienda implementar ensayos de neutralización de toxinas para incrementar la sensibilidad del análisis. Algunos estudios comparativos han demostrado que estos ensayos tienen mayor sensibilidad en la detección de las toxinas de la bacteria que utilizando pruebas comerciales (Knoop et al. 1993; Martin et al. 2016), sin embargo estos resultados deben de ir de la mano con el aislamiento puro anaerobio y considerar en el diagnóstico las características clínicas de los pacientes que sean compatibles con de una ICD (S. Cohen et al. 2010; Carroll & Bartlett 2011; Rodríguez-Pardo et al. 2013).

Después de la detección de toxinas y el aislamiento del cultivo anaerobio, se obtuvieron un total de diez cepas de *C. difficile* para su caracterización epidemiológica, molecular y de resistencia a antimicrobianos.

En estudios epidemiológicos de brotes en varios centros hospitalarios del mundo, la edad ha sido considerada como un factor de riesgo para desarrollar ICD, principalmente asociado a personas en edad adulta (J. M. Amy et al. 2015). El rango de edad de los pacientes infectados en este estudio fue 24 a 86 años, el 80% de los pacientes corresponden al sexo femenino y el 20% al sexo masculino (Tabla 5). Estos datos concuerdan con lo reportado en brotes descritos en Costa Rica, Canadá y Chile, donde la mayoría de afectados por IACD pertenecen a la población adulta, y siendo el sexo femenino con mayor prevalencia de la enfermedad (Nap 2010; Pepin et al. 2006).

Además, el 70% de los pacientes infectados con cepas NAP1 de *C. difficile* obtuvieron un conteo de glóbulos blancos por encima de 15,000 células/ $\mu$ l y una temperatura  $>38^{\circ}\text{C}$  durante el transcurso de la infección. Estos resultados apoyan la naturaleza de la respuesta proinflamatoria provocada por las cepas NAP1 de *C. difficile*, la respuesta inmune estimulada cuando existe una ICD parecen ser contraproducentes, al exacerbar la lesión intestinal provocada por las toxina (Kelly & Kyne 2011; Péchiné & Collignon 2016).

La exposición a antibióticos es considerada como factor de riesgo importante para el desarrollo de ICD; el hecho de que la totalidad de los pacientes en este estudio haya estado sometidos a terapia con antimicrobianos previa al diagnóstico por ICD, coincide con lo publicado por distintos autores al respecto, donde se describen que los grupos de antibióticos implicados significativamente en desarrollo de ICD, son las cefalosporinas, quinolonas y penicilinas con o sin inhibidores. Lo anterior puede deberse a que son los grupos antibióticos más prescritos en la práctica clínica (Freeman et al. 2010; Lopardo et al. 2015; Dubberke et al. 2008).

El 90% de los pacientes analizados tuvo una exposición previa a cefalosporinas, y el 40% a carbapenems. Esto concuerda con lo anteriormente descrito que sostiene que la principal familia de antibióticos considerada de alto riesgo para desarrollar ICD son las cefalosporinas, obteniendo en este estudio un porcentaje mayor a estudios publicados en Europa y América, donde solamente el 37% de los pacientes con ICD tuvo una exposición previa a cefalosporinas (Siller-Ruiz et al. 2014; Kuijper et al. 2006; Depestel & Aronoff 2013).

Esta familia de antibióticos ha sido descrita como factor de riesgo importante en los brotes que se han reportado dentro de varios hospitales a nivel mundial (Lopardo et al. 2015).

Además es notorio que el 33% de los pacientes tuvo exposición a fluoroquinolonas, familia de antibióticos que en los últimos años ha sido considerada como de riesgo muy alto no solo para desarrollar ICD, sino que también se ha visto altamente involucrada en casos graves en brotes dentro de los hospitales a nivel mundial (Knecht et al. 2014).

La epidemiología molecular, es una herramienta que ha ayudado a caracterizar, comparar e identificar las cepas emergentes responsables de los brotes de ICD en varios centros hospitalarios en todo el mundo (Anon n.d.). En este contexto, las cepas de *C. difficile* obtenidas fueron analizadas por PCR-multiplex (Fig. 4), en donde las diez cepas obtenidas, resultaron positivas para el gen *tpi* dando una confirmación de la identidad de las cepas como *C. difficile*.

Estudios previos han revelado que, aunque el gen *tpi* es un gen bien conservado, algunas regiones variables pueden ser explotadas para la identificación de *C. difficile*. Además, estudios han concluido que el análisis de los fragmentos de secuencias del *tpi* producen un árbol evolutivo similar al construido a partir de secuencias de 16S rDNA, demostrando que el gen *tpi* puede constituir un objetivo alternativo y discriminatorio para la identificación de *Clostridium difficile* (Lemee et al. 2004; Dhalluin et al. 2003).

Además, todas las cepas amplificaron los genes para las toxinas A, B y binaria, mostrando una delección de 18 pb en el gen regulador negativo *tcdC*, lo cual se ha asociado a una hiperproducción de las toxinas TcdA y TcdB (Murray et al. 2009) y este patrón concuerda con las cepas NAP1 comúnmente aisladas en brotes dentro de hospitales alrededor del mundo, debido a que poseen ambas toxinas y adicionalmente la toxina binaria potenciando su patogenicidad (Lopez-Urena et al. 2014; Martin et al. 2008; Cheng et al. 2016; Anon 2012).

Seguidamente, las cepas también fueron tipificadas utilizando la técnica de electroforesis en gel de campo pulsado, el cual fue uno de los primeros métodos moleculares de tipificación descritos para *C. difficile* y aún es considerado el estándar en América. Las cepas con un 80% de similitud o más en los patrones de macrorestricción son consideradas como el mismo pulsotipo (Mullany & Roberts 2010); todas las cepas tipificadas se clasificaron como NAP1 (Fig. 5), este genotipo a partir del año 2003 ha sido causante de brotes en hospitales a nivel mundial, como ya se ha descrito anteriormente, se caracteriza por ser A+, B+ y CDT+, presentar una delección en el gen regulador *tcdC* (Murray et al. 2009; Killgore et al. 2008), mismas características compartidas con las cepas encontradas en Honduras.

Los análisis por PFGE también revelaron que las cepas pertenecían a tres diferentes patrones de macrorestricción *Sma*I. El patrón de macrorestricción 0461 es un genotipo descrito con anterioridad para cepas que se describieron a partir de brotes importantes en hospitales de Canadá y Estados Unidos (Pepin et al. 2006; Killgore et al. 2008).

Por el contrario, los patrones 1056 y 1057 no han sido descritos previamente en la literatura, y de acuerdo al dendograma mostrado (Fig. 3) parecen poseer información genética adicional que podría estar asociada a resistencia a antimicrobianos, lo que justifica el análisis de sus genomas.

La toxinotipificación es una herramienta utilizada para analizar cambios en el PaLoc, específicamente en los genes de las toxinas A y B; para la comprensión de las relaciones estructura-función de las toxinas, obtener datos locales de tipificación y de las variaciones genéticas de los aislamientos de *C. difficile*, lo anterior, es muy útil para entender el comportamiento patogénico de las cepas (Huber et al. 2013).

Las cepas NAP1 por definición pertenecen al toxinotipo III (Killgore et al. 2008), pero representantes de los tres patrones de macrorestricción *Sma*I aquí encontrados resultaron pertenecer al toxinotipo IV (Fig. 6). Este raro toxinotipo fue descrito por primera vez para la cepa 55767, una cepa A+B+CDT+ (Rupnik et al. 2009; Singh et al. 2017; Persson et al. 2008), lo cual resulta ser un dato interesante, que merece atención en estudios epidemiológicos posteriores (Rupnik & Janezic 2016).

También en congruencia con su tipificación como cepas NAP1, es posible afirmar que las cepas encontradas en Honduras poseen los rasgos moleculares típicos de cepas hipervirulentas de *C. difficile*, y por otro lado con rasgos genéticos no tan comunes en las cepas epidémicas NAP1 como ser el toxinotipo IV (Carter et al. 2011).

Para comprobar la actividad biológica de las toxinas, a todas las cepas se les realizó ensayos de citotoxicidad en células HeLa para determinar el efecto citopático (Fig. 7). Todas las cepas produjeron un efecto clásico en células HeLa. El porcentaje de CPE para los patrones de macrorestricción 1056 y 0461 fue mayor observándose en las diluciones más altas 11 y 12 respectivamente, mientras que para el patrón de macrorestricción 1057 se observa CPE hasta la dilución 8. Estos ensayos miden principalmente la actividad de la toxina B, revelando que los sobrenadantes de las cepas producen un CPE similar a las cepas NAP1 anteriormente descritas (Quesada-Gómez et al. 2015). Este tipo de aislamientos son frecuentes en brotes epidémicos en hospitales en América del Norte, Europa y recientemente en brotes en hospitales en Costa Rica (Freeman et al. 2010; Quesada-Gómez et al. 2015).

La CPE50 más altas fueron para cepas HON14, HON08, HON 11, todas ellas pertenecen al patrón de macrorestricción 0461; estos datos resultaron por encima al valor de la cepa NAP1 utilizada como control, donde su CPE50 fue de 7.4. Estos resultados pueden deberse a que las cepas pertenecen el toxinotipo IV, dando pie a estudios posteriores para analizar a profundidad las toxinas de las cepas.

En cuanto al perfil de resistencia, varias investigaciones han aportado información de las cepas epidémicas NAP1, caracterizándose por ser resistentes a varias familias de antibióticos (Karlowsky et al. 2012). En este estudio se realizó la prueba de susceptibilidad a antimicrobianos, utilizando tiras de E-test.

El 100% de las cepas analizadas resultaron ser altamente resistentes a clindamicina, cefoxitina y fluoroquinolonas (Tabla 5), como se ha informado en estudios con cepas NAP1 en América, específicamente en Costa Rica, donde se ha reportado que el 88% de las cepas NAP1 son resistentes a clindamicina (Van Kleef et al. 2014; Marín et al. 2014), también se han observado cepas de *C. difficile* clindamicina-resistentes en brotes ocurridos en Europa, Asia, América del Norte y el Oriente Medio con porcentajes menores al 80% (Baines & Wilcox 2015).

En cuanto a la resistencia a fluoroquinolonas, en este estudio los porcentajes de resistencia encontrados (100%) y con las CIM más altas para cada uno de los antibióticos que pertenecen a esta familia, en conjunto, estos datos están por encima de los reportados anteriormente en Europa y América, donde el porcentaje de resistencia a fluoroquinolonas suele ser de 70% en el total de los aislamientos (Freeman et al. 2015). Esta observación posiblemente refleja la rápida propagación de clones exitosos, principalmente los resistentes a las fluoroquinolonas, ya que los porcentajes de resistencia a este antimicrobiano y los niveles registrados para este patógeno están aumentando alrededor del mundo (Ramírez-Vargas et al. 2017), probablemente en respuesta a la presión selectiva impuesta por el uso de esta familia de antibióticos.

Está claro que, si bien la resistencia a fluoroquinolonas no es un determinante molecular de patogenicidad, el alto nivel de resistencia a los antibióticos introduce una fuerza importante de selección que favorece la difusión de las cepas hipervirulentas.

Las fluoroquinolonas son antibióticos muy utilizados como tratamiento para múltiples infecciones; si la bacteria está presente en el intestino y el paciente recibe este tipo de tratamiento, esta condición deprime la microbiota intestinal, sin causarle daño a *C. difficile*, siendo un factor que favorecería la colonización (He et al. 2012).

Es importante además resaltar la resistencia a linezolid de las cepas aisladas en Honduras. Este tipo de resistencia es inusual en *C. difficile*, y ha sido más estudiado en *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*, siendo atribuida principalmente al gen *cfr*, que confiere resistencia a fenicoles (cloranfenicol, tianfenicol) (Bender et al. 2016). En estudios recientes se ha descrito que el gen *cfr* confiere resistencia cruzada a linezolid en *C. difficile* (Hansen & Vester 2015; Schwarz & Wang 2015), pero todavía hay preguntas por contestar en cuanto a los mecanismos de resistencia detrás de esta observación. Lo interesante de nuestros resultados es que el 100% de las cepas obtenidas son altamente resistentes a linezolid, con CIM de 16-48 µg/mL que está por encima de lo descrito en estudios anteriores con CIM de 6-16 µg/mL (Marín et al. 2015).

Siendo que linezolid un antibiótico usado generalmente para infecciones bacterianas graves causadas por bacterias MDR, esto resulta ser de alta relevancia, ya que existen muy pocos reportes de cepas de *C. difficile* resistentes a las oxazolidonas. Lo anterior puede deberse a que no se había pensado que existieran cepas de *C. difficile* resistentes a esta familia de antibióticos, ya que la mayoría de los países controlan el uso de Linezolid dentro y fuera de los hospitales.

Además, todas las cepas que pertenecen al patrón de macrorestricción *Sma*I 1056 fueron resistentes a tetraciclina (de 24 - >32 µg/mL), tigeciclina (>256 µg/mL) y rifampicina (>32 µg/mL). La resistencia a la rifampicina en *C. difficile* se ha informado en 17.5% de los aislados con una CIM de 16 µg/mL, también hay reportes de cepas resistentes en Italia, la República Checa, Dinamarca y Hungría (Freeman et al. 2015; O'Connor et al. 2008). En cuanto a la resistencia a tigeciclina se ha reportado en porcentajes muy bajos con CIM de 32 µg/mL (Barbern et al. 2015), muchos más bajos que lo encontrado en este estudio. Lo importante de estos resultados es que la tigeciclina y rifampicina se han utilizado como tratamiento alternativo para ICD severa complicada (Britt et al. 2014). Debido a los resultados obtenidos, los pacientes infectados con cepas que pertenecen al patrón de macrorestricción *Sma*I 1056 de *C. difficile* en Honduras, el tratamiento con rifampicina o tigeciclina no es una alternativa para estos pacientes.

La resistencia a tetraciclina se documentó hace más de 30 años y se ha demostrado como resistencia transferible en cepas de *C. difficile* y otras especies bacterianas (Ionesco 1981). Las CIM reportadas en otros estudios varían entre 8 y 32 µg/ml (Spigaglia et al. 2006), similares a las de este estudio. La resistencia a tetraciclina ahora ha surgido en muchos patógenos bacterianos debido a la adquisición genética de los genes *tet*, que codifican proteínas citoplásmicas solubles que protegen a los ribosomas dentro de la célula (Chopra & Roberts 2001).

La resistencia a las tetraciclinas también varía ampliamente entre países, en un estudio en 2007 observaron que ninguna cepa resultó resistente a tetraciclina, mientras que en cepas del Reino Unido y los Países Bajos, la resistencia ascendía 14.3%. En general, la mayoría de los estudios de susceptibilidad demuestran resistencia en <10% de los aislamientos (Barbut et al. 2007), pero el impacto de la resistencia a las tetraciclinas para la medicina humana ha retomado importancia en los últimos años.

Este nuevo patrón de macrorestricción 1056 podría asociarse a una mayor virulencia, por poseer resistencia fenotípica a estos antibióticos; con estos datos, hemos aportado a la hipótesis de otros investigadores sobre resistencia a rifampicina y tetraciclina en aislamientos clínicos de *C. difficile* (Spigaglia et al. 2011) que afirma que puede ser más común de lo que inicialmente se sospechaba (O'Connor et al. 2008). En consecuencia, se necesitan más estudios para abordar las implicaciones clínicas y epidemiológicas de estos hallazgos.

La resistencia a los agentes antimicrobianos más comúnmente utilizados para el tratamiento de ICD, es decir, vancomicina y metronidazol (Li et al. 2015), se informa raramente en la literatura (Erikstrup et al. 2015). Sin embargo, estudios realizados en Europa han reportado tanto heterorresistencia y reducción de la susceptibilidad para metronidazol (Tenover et al. 2012). No se observó ninguno de estos fenómenos en este estudio, ya que todas las cepas analizadas resultaron sensibles a estos dos antimicrobianos, esto puede atribuirse al número limitado de cepas analizadas en este estudio.

Otro dato importante es la CIM<sub>90</sub>, que corresponde a la CIM que inhibe el 90% de las cepas, porque describe la eficacia de un antimicrobiano dado que es un reflejo de diferentes mecanismos de resistencia (Turnidge & Paterson 2007). En esta investigación, todas las cepas obtuvieron la CIM<sub>90</sub> más alta para clindamicina, cefoxitina, y tigeciclina; similar a los datos reportados en otros estudios (Tenover et al. 2012), mientras que para ciprofloxacina, moxifloxacina, levofloxacina, tetraciclina y rifampicina la CIM<sub>90</sub> fue >32 µg/ml (Tabla 6). Para las fluoroquinolonas, los resultados son muy similares a un estudio publicado en 2015, en el caso de tetraciclina y rifampicina, los datos reportados son más altos en comparación a estudios realizados en Europa y América (Baines & Wilcox 2015; Article 2012).

Por otro lado, la CIM<sub>90</sub> para linezolid fue de 48 µg/ml; mucho más alta de lo reportado anteriormente para *C. difficile* que ha sido de 1.5 µg/ml (Marín et al. 2015); las CIM<sub>90</sub> más bajas obtenidas fueron para vancomicina y metronidazol, concordando al dato que todas las cepas resultaron sensibles a estos dos antimicrobianos, este resultado tiene implicaciones muy importantes, ya que la vancomicina y metronidazol son el tratamiento de elección para *C. difficile* (Zar et al. 2007), y todavía se puede utilizar como terapia ya que las cepas no resultaron resistentes a estos dos antimicrobianos.

Adicionalmente, se analizaron los genes asociados a resistencia para tetraciclina y linezolid; todas las cepas amplificaron para el gen *cfr* (Fig. 8), que concuerdan con la resistencia fenotípica a linezolid (Schwarz & Wang 2015). El gen *cfr* se ha detectado en 7 de 9 cepas en un estudio publicado por Marín y colaboradores en el año 2015 (Marín et al. 2015).

La relevancia de estos resultados, se encuentra en la detección del gen *cfr* como un posible mecanismo de resistencia a linezolid en *C. difficile*, este gen no solo está asociado a la resistencia a linezolid sino también, a múltiples fármacos como los fenicoles (Bender et al. 2016), este tipo de hallazgos en aislamientos clínicos es preocupante con respecto a la diseminación de cepas resistentes a este antibiótico. Estos hallazgos deben ser evaluados mediante investigaciones adicionales para caracterizar estos genes *cfr* y su contribución a la resistencia a linezolid.

Para la investigación de la resistencia a tetraciclina, sólo las cepas HON01 y HON10 amplificaron para el gen *tetM* y ambas pertenecen al patrón de macrorestricción 1056, lo anterior concuerda con que este patrón de macrorestricción fue el único resistente a tetraciclina a nivel fenotípico. En un estudio publicado por Spigaglia y colaboradores, se obtuvieron diecinueve cepas que resultaron positivas para el gen *tetM*; mientras que en otro estudio en el Reino Unido, todas las cepas resistentes a la tetraciclina contenían el gen *tetM* (Spigaglia et al. 2006; Bakker et al. 2010), lo que sugiere una reciente circulación de estas cepas de *C. difficile* en los hospitales de Europa y América (Ramírez-Vargas et al. 2017).

Finalmente, el hallazgo en Honduras de estas cepas epidémicas de *C. difficile* que se caracterizan por una alta producción de toxinas y una alta resistencia a antibióticos, nos da una idea de lo virulentas que pueden llegar a ser estas cepas, y el potencial riesgo a corto plazo de tener un brote por *C. difficile* en hospitales de Honduras.

## CAPÍTULO 6: Conclusiones

Este trabajo confirma el hallazgo en Honduras de cepas epidémicas de *C. difficile* del pulsotipo NAP1. Con este estudio, serían cinco los países latinoamericanos que han reportado la presencia de cepas NAP1 dentro de sus hospitales, el hallazgo de estas cepas en los países latinoamericanos es más reciente que en América del Norte y Europa; por lo que se pone en evidencia la emergencia de la cepa epidémica a nivel latinoamericano con el primer reporte en Honduras, describiendo dos nuevos patrones de macrorestricción, 1056 y 1057.

La exposición a fluoroquinolonas y cefalosporinas es considerada como un factor de riesgo importante para las ICD. Las cepas encontradas en Honduras son altamente resistentes a las fluoroquinolonas lo que usualmente coincide con un alto potencial patogénico.

Los aislamientos aquí reportados son inusualmente resistentes a los antibióticos, entre ellos el linezolid. Esta investigación es de las pocas que reporta una alta resistencia a linezolid. Todas las cepas resultaron positivas para el gen *cfr*, este tipo de hallazgos en aislamientos clínicos es preocupante con respecto a la diseminación de cepas resistentes a estos antibióticos. Las implicaciones epidemiológicas de estos hallazgos aportan datos sobre el clonaje de genotipos altamente resistente a múltiples antibióticos, apoya la teoría sobre la resistencia a linezolid, y aportando a la descripción de una cepa NAP1.

Finalmente, conociendo las características moleculares de los aislados de *C. difficile* en Honduras se podrán tomar las medidas adecuadas de control y tratamiento oportunos para prevenir brotes intrahospitalarios, y así colocar a *C. difficile* como microorganismo en vigilancia dentro de los hospitales.

## CAPÍTULO 7: Recomendaciones

Obtener un mayor número de aislamientos de *C. difficile* para incrementar la posibilidad de encontrar y caracterizar posibles nuevos genotipos e investigar más a fondo los genotipos encontrados.

Estudiar los mecanismos de resistencia encontrados en las cepas altamente resistentes a múltiples antibióticos, enfocándose en la resistencia a linezolid; por ser un mecanismo muy poco estudiado en *C. difficile* y en bacterias Gram positivas.

Ampliar el espectro de antibióticos en los ensayos de susceptibilidad, incluyendo oxazolidinas de nueva generación y fenicoles, para comprobar la actividad del gen *cfr* al nivel fenotípico sobre estas familias de antibióticos.

Explorar los mecanismos de patogénesis que están asociados con la virulencia en diferentes genotipos de *C. difficile*, a través de bioensayos en animales y otras líneas celulares para ver si existe alguna diferencia a lo anteriormente descrito en otros estudios.

Con estos resultados, los programas de vigilancia en salud pública en Honduras deben considerar implementar el diagnóstico de ICD, especialmente en pacientes con factores predisponentes.

## **7.1. Limitaciones**

En Honduras las ICD no son bien conocidas por todo el personal médico de los hospitales, y cuando se tiene sospecha de este tipo de infecciones es por la intervención de un médico infectólogo o de medicina interna. Por lo anterior casi no existen datos sobre la cantidad de pacientes con sospecha clínica de ICD.

Si a lo anterior añadimos, que los laboratorios de estos centros hospitalarios no cuentan con herramientas de diagnóstico para *C. difficile*, como consecuencia se desconoce la prevalencia y frecuencia de estas infecciones, es por esta razón que este estudio partió de un vacío de información y conocimiento relacionado a este tema en Honduras.

En este estudio no se pudieron obtener datos de prevalencia en los hospitales, debido a que el muestreo por conveniencia.

## **7.2. Perspectivas**

Se espera que, con la publicación de los datos obtenidos en esta investigación, se pueda contribuir a la epidemiología de las ICD, llenando parcialmente el vacío de información y conocimiento relacionado con las características de las cepas de *C. difficile* circulantes en Honduras; además, se espera que se establezcan medidas para el control de la diseminación de este patógeno dentro de los hospitales.

Es necesario realizar más investigaciones que incluyan mayor cantidad de cepas tipificadas; ampliar en el estudio de los perfiles de resistencia, buscando respuesta sobre los mecanismos de resistencia adquiridos por este tipo de cepas. Investigar los genes asociados a resistencia, no solo a linezolid y tetraciclina, sino también al resto de los antimicrobianos a los que las cepas resultaron resistentes.

Debido a los resultados obtenidos en esta investigación, se pretende analizar la conformación de las toxinas de cepas HON.

En un futuro se pretende implementar un laboratorio donde se trabaje bacterias anaerobias, brindando apoyo a los hospitales en Honduras en cuanto al diagnóstico de ICD, por otro lado implementar y mantener esta línea de investigación.

## CAPÍTULO 8: Referencias

Amy, J., Johanesen, P. & Lyras, D., 2015. Extrachromosomal and integrated genetic elements in *Clostridium difficile*. *Plasmid*, 80, pp.97–110. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plasmid.2015.04.006>.

Amy, J.M. et al., 2015. *Clostridium difficile* infection. *PLoS ONE*, 10(1), pp.1–9. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.4161/21645515.2014.980193>.

Anon, 2012. Epidemic *Clostridium difficile* Ribotype 027 in Chile. , 18(8), pp.1370–1372.

Anon, Rodríguez C, 2016, Cd infection, molecular strain typing methods.

Article, S.F., 2012. Association of. , 139(July 2004), pp.143–148.

Aspinall, S.T. & Hutchinson, D.N., 1992. New selective medium for isolating *Clostridium difficile* from faeces. *Journal of clinical pathology*, 45(February), pp.812–814.

Baban, S.T. et al., 2013. The Role of Flagella in *Clostridium difficile* Pathogenesis: Comparison between a Non-Epidemic and an Epidemic Strain. *PLoS ONE*, 8(9).

Baines, S.D. & Wilcox, M.H., 2015. Antimicrobial Resistance and Reduced Susceptibility in *Clostridium difficile*: Potential Consequences for Induction, Treatment, and Recurrence of *C. difficile* Infection. , pp.267–298.

- Bakker, D. et al., 2010. Relatedness of human and animal *Clostridium difficile* PCR ribotype 078 isolates determined on the basis of multilocus variable-number tandem-repeat analysis and tetracycline resistance. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(10), pp.3744–3749.
- Barbern, J., Salso, S. & Alhambra, A., 2015. Tigeciclina: 10 años de historia y en plena vigencia. *Revista Espanola de Quimioterapia*, 28(2), pp.61–78.
- Barbut, F. et al., 2007. Prospective study of *Clostridium difficile* infections in Europe with phenotypic and genotypic characterisation of the isolates. *Clinical Microbiology and Infection*, 13(11), pp.1048–1057.
- Barra-carrasco, J. et al., 2014. Esporas de *C. difficile*. , 31(6), pp.694–703.
- Bauer, M.P. et al., 2014. Humoral immune response as predictor of recurrence in *Clostridium difficile* infection. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(12), pp.1323–1328. Available at: <http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12769>.
- Bauer, M.P., Kuijper, E.J. & van Dissel, J.T., 2009. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): Treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection (CDI). *Clinical Microbiology and Infection*, 15(12), pp.1067–1079. Available at: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.03099.x>.
- Di Bella, S. et al., 2016. *Clostridium difficile* toxins A and B: Insights into pathogenic properties and extraintestinal effects. *Toxins*, 8(5), pp.1–25.
- Bender, J.K. et al., 2016. Detection of a cfr ( B ) Variant in German *Enterococcus*

*faecium* Clinical Isolates and the Impact on Linezolid Resistance in Enterococcus. , pp.1–18.

Bidet, P. et al., 2000. Comparison of PCR-Ribotyping , Arbitrarily Primed PCR , and Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Typing *Clostridium difficile* Comparison of PCR-Ribotyping , Arbitrarily Primed PCR , and Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Typing *Clostridium difficile*. , 38(7), pp.1–5.

Biedenbach, D.J. et al., 2010. In vitro activity of fidaxomicin (OPT-80) tested against contemporary clinical isolates of *Staphylococcus spp. and Enterococcus spp.* *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(5), pp.2273–2275.

Brierley, R., 2005. *Clostridium difficile*. , 5(9), p.535.

Britt, N.S. et al., 2014. Tigecycline for the Treatment of Severe and Severe Complicated *Clostridium difficile* Infection. *Infectious Diseases and Therapy*, 3(2), pp.321–331.

Buonomo, E.L. & Petri, W.A., 2016. The microbiota and immune response during *Clostridium difficile* infection. *Anaerobe*, pp.1–6. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.05.009>.

Camacho-Ortiz, A. et al., 2015. First report of *Clostridium difficile* NAP1/027 in a Mexican hospital. *PLoS ONE*, 10(4), pp.1–11.

Carroll, K.C. & Bartlett, J.G., 2011. Biology of *Clostridium difficile*: implications for epidemiology and diagnosis. *Annual review of microbiology*, 65, pp.501–21.

Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21682645>.

Carter, G.P. et al., 2011. The anti-sigma factor tcdc modulates hypervirulence in an epidemic BI/NAP1/027 clinical isolate of *Clostridium difficile*. *PLoS Pathogens*, 7(10).

Chaparro-Rojas, F. & Mullane, K.M., 2013. Emerging therapies for *Clostridium difficile* infection - Focus on fidaxomicin. *Infection and Drug Resistance*, 6, pp.41–53.

Chen, S. et al., 2015a. The role of Rho GTPases in toxicity of *Clostridium difficile* toxins. *Toxins*, 7(12), pp.5254–5267.

Chen, S. et al., 2015b. The Role of Rho GTPases in Toxicity of *Clostridium difficile* Toxins. , (December), pp.5254–5267.

Chen, X. & Lamont, J.T., 2013. Overview of *Clostridium difficile* infection: implications for China. *Gastroenterology report*, 1(3), pp.153–8.

Cheng, J. et al., 2016. The First Two *Clostridium difficile* Ribotype 027 / ST1 Isolates Identified in Beijing , China – an Emerging Problem or a Neglected. *Nature Publishing Group*, (August 2015), pp.1–8. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/srep18834>.

Chopra, I. & Roberts, M., 2001. Tetracycline Antibiotics : Mode of Action , Applications , Molecular Biology , and Epidemiology of Bacterial Resistance Tetracycline Antibiotics : Mode of Action , Applications , Molecular Biology , and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and Molecular Biology*

*Reviews*, 65(2), pp.232–260. Available at: <http://www.facm.ucl.ac.be/Full-texts-FACM/Vanbambeke-2006-4.pdf>.

Cohen, S., Gerding, D. & Johnson, S., 2010. Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults: 2010 update by the society for healthcare epidemiology of America (SHEA) and the infectious. *Infection Control & Control*. Available at: [http://journals.cambridge.org/abstract\\_S0195941700029064](http://journals.cambridge.org/abstract_S0195941700029064) [Accessed November 4, 2016].

Cohen, S.H. et al., 2010. Guías de práctica clínica para la infección por *Clostridium difficile* en adultos: actualización 2010 realizada por la Sociedad de Salud Epidemiológica de Norteamérica (SHEA) y la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de Norteamérica (IDSA). *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 31(5), pp.T1–T28. Available at: [http://www.idsociety.org/uploadedFiles/IDSA/Guidelines-Patient\\_Care/PDF\\_Library/C-Diff\\_Guideline\\_Spanish\\_Ver.pdf](http://www.idsociety.org/uploadedFiles/IDSA/Guidelines-Patient_Care/PDF_Library/C-Diff_Guideline_Spanish_Ver.pdf).

Collins, D.A., Hawkey, P.M. & Riley, T. V, 2013. Epidemiology of *Clostridium difficile* infection in Asia. *Antimicrobial resistance and infection control*, 2(1), p.21. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3718645&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.

Cowardin, C.A. et al., 2015. Inflammasome activation contributes to interleukin-23 production in response to *Clostridium difficile*. *mBio*, 6(1), pp.1–9.

- Depestel, D.D. & Aronoff, D.M., 2013. Epidemiology of *Clostridium difficile* infection. *Journal of pharmacy practice*, 26(5), pp.464–75. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24064435>  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4128635>.
- Dhalluin, A. et al., 2003. Genotypic Differentiation of Twelve *Clostridium* Species by Polymorphism Analysis of the Triosephosphate Isomerase (tpi) Gene. *Systematic and Applied Microbiology*, 26(1), pp.90–96.
- Dingle, K.E. et al., 2014. Evolutionary history of the *Clostridium difficile* pathogenicity locus. *Genome Biology and Evolution*, 6(1), pp.36–52.
- Dingle, T.C., Mulvey, G.L. & Armstrong, G.D., 2011. Mutagenic analysis of the *Clostridium difficile* flagellar proteins, flic and flid, and their contribution to virulence in hamsters. *Infection and Immunity*, 79(10), pp.4061–4067.
- Dubberke, E.R. et al., 2008. Short- and Long-Term Attributable Costs of *Clostridium difficile*-Associated Disease in Nonsurgical Inpatients. *Clinical Infectious Diseases*, 46(4), pp.497–504. Available at: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/526530>.
- Dupuy, B. et al., 2008. *Clostridium difficile* toxin synthesis is negatively regulated by TcdC. *Journal of Medical Microbiology*, 57(6), pp.685–689.
- Erikstrup, L.T. et al., 2015. Treatment of *Clostridium difficile* infection in mice with vancomycin alone is as effective as treatment with vancomycin and metronidazole in combination. *BMJ open gastroenterology*, 2(1), p.e000038.

Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4641438&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.

Ferreyra Jessica, Wu Katherine, H.A. and S.J., 2014. Gut microbiota-produced succinate promotes *C. difficile* infection after antibiotic treatment or motility disturbance. *JAMA* Public Access. , 1848(6), pp.3047–3054. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2130899&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.

Freeman, J. et al., 2015. Pan-European longitudinal surveillance of antibiotic resistance among prevalent *Clostridium difficile* ribotypes. *Clinical Microbiology and Infection*, 21(3), p.248.e9-248.e16.

Freeman, J. et al., 2010. The changing epidemiology of *Clostridium difficile* infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(3), pp.529–549.

Gene, M. et al., 2015. *Clostridium difficile* Isolates with High Linezolid MICs Harbor the. , 59(1), pp.586–590.

Goudarzi, M. et al., 2014. *Clostridium difficile* Infection: Epidemiology, Pathogenesis, Risk Factors, and Therapeutic Options. *Scientifica*, 2014, pp.1–9. Available at: <http://www.hindawi.com/journals/scientifica/2014/916826/>.

Gough, E., Shaikh, H. & Manges, A.R., 2011. Systematic review of intestinal microbiota transplantation (fecal bacteriotherapy) for recurrent *Clostridium*

- difficile* infection. *Clinical Infectious Diseases*, 53(10), pp.994–1002.
- Govind, R. & Dupuy, B., 2012. Secretion of *Clostridium difficile* toxins A and B requires the holin-like protein tcdE. *PLoS Pathogens*, 8(6), pp.1–14.
- Griffiths, D. et al., 2010. Multilocus sequence typing of *Clostridium difficile*. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(3), pp.770–778.
- Hansen, L.H. & Vester, B., 2015. A cfr-like gene from *Clostridium difficile* confers multiple antibiotic resistance by the same mechanism as the cfr gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(9), pp.5841–5843.
- He, M. et al., 2012. Europe PMC Funders Group Emergence and global spread of epidemic healthcare-associated *Clostridium difficile*. , 45(1), pp.109–113.
- Heinlen, L. & Ballard, J.D., 2011. *Clostridium difficile* infection. *Am. J. Med. Sci.*, 340(3), pp.247–252.
- Hourigan, S.K., Sears, C.L. & Oliva-Hemker, M., 2016. *Clostridium difficile* Infection in Pediatric Inflammatory Bowel Disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 22(4), pp.1020–1025.
- Huang, H. et al., 2009. Distinct ribotypes and rates of antimicrobial drug resistance in *Clostridium difficile* from Shanghai and Stockholm. *Clinical Microbiology and Infection*, 15(12), pp.1170–1173. Available at: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02992.x>.
- Huber, C.A. et al., 2013. Challenges for standardization of *Clostridium difficile* typing methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(9), pp.2810–2814.

- Ionesco, H., 1981. [Transferable tetracycline resistance in “*Clostridium difficile*” (author’s transl)]. *Annales de microbiologie*, 131A(2), pp.171–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6247949>.
- Jank, T., Belyi, Y. & Aktories, K., 2015. Bacterial glycosyltransferase toxins. *Cellular Microbiology*, 17(12), pp.1752–1765.
- Karlowsky, J.A. et al., 2012. Multidrug-resistant North American pulsotype 2 *Clostridium difficile* was the predominant toxigenic hospital-acquired strain in the province of Manitoba, Canada, in 2006-2007. *Journal of Medical Microbiology*, 61(5), pp.693–700.
- Kasendra, M. et al., 2013. *Clostridium difficile* toxins facilitate bacterial colonization by modulating the fence and gate function of colonic epithelium. *The Journal of infectious diseases*, 209, pp.1095–1104. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24273043>.
- Kelly, C.P., 2012. Can we identify patients at high risk of recurrent *Clostridium difficile* infection *Clinical Microbiology and Infection*, 18(SUPPL.6), pp.21–27. Available at: <http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12046>.
- Kelly, C.P. & Kyne, L., 2011. The host immune response to *Clostridium difficile*. *Journal of Medical Microbiology*, 60(8), pp.1070–1079.
- Khanna, S. & Pardi, D.S., 2014. *Clostridium difficile* infection: management strategies for a difficult disease. *Therapeutic advances in gastroenterology*, 7(2), pp.72–86. Available at:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24587820>  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3903088>.

Kilic, A. et al., 2015. Multiplex real-time PCR method for simultaneous identification and toxigenic type characterization of *Clostridium difficile* from stool samples. *Annals of Laboratory Medicine*, 35(3), pp.306–313.

Killgore, G. et al., 2008. Comparison of seven techniques for typing international epidemic strains of *Clostridium difficile*: Restriction endonuclease analysis, pulsed-field gel electrophoresis, PCR-ribotyping, multilocus sequence typing, multilocus variable-number tandem-repeat an. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(2), pp.431–437.

Kim, H. et al., 2014. Evaluation of a rapid membrane enzyme immunoassay for the simultaneous detection of glutamate dehydrogenase and toxin for the diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *Annals of Laboratory Medicine*, 34(3), pp.235–239.

Van Kleef, E. et al., 2014. Nosocomial transmission of *C. difficile* in English hospitals from patients with symptomatic infection. *PLoS ONE*, 9(6).

Knapp, O., Benz, R. & Popoff, M.R., 2016. Pore-forming activity of clostridial binary toxins. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1858(3), pp.512–515.  
Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.08.006>.

Knecht, H. et al., 2014. Effects of B-lactam antibiotics and fluoroquinolones on human gut microbiota in relation to *Clostridium difficile* associated diarrhea.

*PloS one*, 9(2).

Knoop, F.C., Owens, M. & Crocker, I.C., 1993. *Clostridium difficile*: Clinical disease and diagnosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 6(3), pp.251–265.

Kuijper, E.J., Coignard, B. & Tu, P., 2006. Emergence of *Clostridium difficile* - associated disease in North America and Europe. *Clinical Microbiology and Infections*, 12(6), pp.2–18.

Lanis, J.M. et al., 2013. *Clostridium difficile* 027/BI/NAP1 Encodes a Hypertoxic and Antigenically Variable Form of TcdB. *PLoS Pathogens*, 9(8).

Leber, A. et al., 2015. Systems modeling of interactions between mucosal immunity and the gut microbiome during *Clostridium difficile* infection. *PLoS ONE*, 10(7), pp.1–20.

Lemee, L. et al., 2004. Multiplex PCR targeting tpi (triose phosphate isomerase), tcdA (toxin A), and tcdB (toxin B) genes for toxigenic culture of *Clostridium difficile*. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(12), pp.5710–5714.

Li, R. et al., 2015. Efficacy and safety of metronidazole monotherapy versus vancomycin monotherapy or combination therapy in patients with *Clostridium difficile* infection: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*, 10(10), pp.1–14.

Lopardo, G. et al., 2015. Epidemiology of *Clostridium difficile*: A hospital-based descriptive study in Argentina and Mexico. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 19(1), pp.8–14. Available at:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2014.07.004>.

Lopez-Urena, D. et al., 2014. Spread of epidemic *Clostridium difficile* NAP1/027 in Latin America: Case reports in panama. *Journal of Medical Microbiology*, 63(PART 2), pp.322–324.

López-Ureña, D. et al., 2016. Predominance and high antibiotic resistance of the emerging *Clostridium difficile* genotypes NAPCR1 and NAP9 in a Costa Rican hospital over a 2-year period without outbreaks. *Emerging microbes & infections*, 5(5), p.e42. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27165560>  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4893543>.

Marín, M. et al., 2015. *Clostridium difficile* Isolates with High Linezolid MICs Harbor the Multiresistance Gene *cfr*: TABLE 1. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(1), pp.586–589. Available at:  
<http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.04082-14>.

Marín, M. et al., 2014. First case of autochthonous *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 detected in Spain. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clinica*, 32(6), pp.355–358. Available at:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2013.07.004>.

Martin, H. et al., 2008. Characterization of *Clostridium difficile* Strains Isolated from Patients in Ontario , Canada , from 2004 to 2006 □. , 46(9), pp.2999–3004.

Martin, J.S.H., Monaghan, T.M. & Wilcox, M.H., 2016. *Clostridium difficile* infection:

epidemiology, diagnosis and understanding transmission. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 13(4), pp.206–16. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26956066>.

Matamouros, S., England, P. & Dupuy, B., 2007. *Clostridium difficile* toxin expression is inhibited by the novel regulator TcdC. *Molecular Microbiology*, 64(5), pp.1274–1288.

McFarland, L. V., 2005. Alternative treatments for *Clostridium difficile* disease: What really works? *Journal of Medical Microbiology*, 54(2), pp.101–111.

McGlone, S., Bailey, R. & Zimmer, S., 2012. The economic burden of *Clostridium difficile*. *Clin Microbiol Infect*, 18(3), pp.282–289.

Monot, M. et al., 2015. *Clostridium difficile*: New Insights into the Evolution of the Pathogenicity Locus. *Scientific reports*, 5, p.15023. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26446480>  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4597214>.

Mullany, P. & Roberts, A.P., 2010. *Clostridium difficile - Methods and Protocols*, Available at: [www.springer.com/series/7651](http://www.springer.com/series/7651).

Murray, R. et al., 2009. Truncation in the tcdC region of the *Clostridium difficile* PathLoc of clinical isolates does not predict increased biological activity of Toxin B or Toxin A. *BMC infectious diseases*, 9, p.103.

Nap, T., 2010. Emergence of *Clostridium difficile* NAP1 in Latin America □. , 48(2), pp.669–670.

- Ngamskulrungrroj, P. et al., 2015. Molecular epidemiology of *Clostridium difficile* infection in a large teaching hospital in Thailand. *PLoS ONE*, 10(5).
- van Nood, E. et al., 2009. Struggling with recurrent *Clostridium difficile* infections: is donor faeces the solution? *Euro surveillance : bulletin europe sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 14(34), pp.1–6.
- O'Connor, J.R. et al., 2008. Rifampin and rifaximin resistance in clinical isolates of *Clostridium difficile*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(8), pp.2813–2817.
- O'Horo, J.C. et al., 2012. Molecular techniques for diagnosis of *Clostridium difficile* infection: Systematic review and meta-analysis. *Mayo Clinic Proceedings*, 87(7), pp.643–651. Available at:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.mayocp.2012.02.024>.
- Paredes-Sabja, D., Shen, A. & Sorg, J.A., 2014. *Clostridium difficile* spore biology: Sporulation, germination, and spore structural proteins. *Trends in Microbiology*, 22(7), pp.406–416. Available at:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2014.04.003>.
- Péchiné, S. & Collignon, A., 2016. Immune responses induced by *Clostridium difficile*. *Anaerobe*, pp.1–11.
- Pepin, J. et al., 2006. Management and outcomes of a first recurrence of *Clostridium difficile*-associated disease in Quebec, Canada. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*,

42(6), pp.758–764.

Persson, S., Torpdahl, M. & Olsen, K.E.P., 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(11), pp.1057–1064. Available at: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02092.x>.

Price, a B., Larson, H.E. & Crow, J., 1979. Morphology of experimental antibiotic-associated enterocolitis in the hamster: a model for human pseudomembranous colitis and antibiotic-associated diarrhoea. *Gut*, 20(6), pp.467–475.

Pruitt, R.N. et al., 2012. Structural determinants of *Clostridium difficile* toxin A glucosyltransferase activity. *Journal of Biological Chemistry*, 287(11), pp.8013–8020.

Quesada-Gómez, C. et al., 2015. Emergence of an outbreak-associated *Clostridium difficile* variant with increased virulence. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(4), pp.1216–1226.

Ramírez-Vargas, G. et al., 2017. A *Clostridium difficile* lineage endemic to Costa Rican hospitals is multidrug-resistant by acquisition of chromosomal mutations and novel mobile genetic elements. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, (January), p.AAC.02054-16. Available at: <http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.02054-16>.

- Rodríguez-Pardo, D., Mirelis, B. & Navarro, F., 2013. Infecciones producidas por *Clostridium difficile*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31(4), pp.254–263. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2012.12.010>.
- Rodriguez, C. et al., 2016. *Clostridium difficile* infection: Early history, diagnosis and molecular strain typing methods. *Microbial Pathogenesis*, 97, pp.59–78. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2016.05.018>.
- Rothman, S.W. et al., 1984. Differential cytotoxic effects of toxins A and B isolated from *Clostridium difficile*. *Infection and Immunity*, 46(2), pp.324–331.
- Rupnik, M. et al., 1997. Characterization of polymorphisms in the toxin A and B genes of *Clostridium difficile*. *FEMS Microbiology Letters*, 148(2), pp.197–202.
- Rupnik, M. & Janezic, S., 2016. An Update on *Clostridium difficile* Toxinotyping. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(1), pp.13–18.
- Rupnik, M., Wilcox, M.H. & Gerding, D.N., 2009. *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. *Nature reviews. Microbiology*, 7(7), pp.526–36. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19528959>.
- Ryan, A. et al., 2011. A role for TLR4 in *Clostridium difficile* infection and the recognition of surface layer proteins. *PLoS Pathogens*, 7(6).
- Saliba, W. et al., 2014. Statins use and risk of mortality in patient with *Clostridium difficile* infection. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 20(10),

pp.1061–6. Available at:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X14653799>.

Schwarz, S. & Wang, Y., 2015. Nomenclature and functionality of the so-called cfr gene from *Clostridium difficile*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(4), pp.2476–2477.

Siller-Ruiz, M. et al., 2014. Epidemiología de la enfermedad asociada a *Clostridium difficile* (EACD) en Salamanca. *Revista Espanola de Quimioterapia*, 27(2), pp.122–126.

Singh, M. et al., 2017. Toxinotyping and Sequencing of *Clostridium difficile* Isolates from Patients in a Tertiary Care Hospital of Northern India. *Frontiers in Medicine*, 4(March), pp.1–6. Available at:  
<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmed.2017.00033/full>.

Solomon, K., 2013. The host immune response to *Clostridium difficile* infection. , pp.19–35.

Spigaglia, P. et al., 2011. Multidrug resistance in European *Clostridium difficile* clinical isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(10), pp.2227–2234.

Spigaglia, P., 2016. Recent advances in the understanding of antibiotic resistance in *Clostridium difficile* infection. *Therapeutic advances in infectious disease*, 3(1), pp.23–42. Available at:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4735502&tool=pmc>

entrez&rendertype=abstract.

- Spigaglia, P., Barbanti, F. & Mastrantonio, P., 2006. New variants of the tet(M) gene in *Clostridium difficile* clinical isolates harbouring Tn916-like elements. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(6), pp.1205–1209.
- Spigaglia, P. & Mastrantonio, P., 2002. Molecular analysis of the pathogenicity locus and polymorphism in the putative negative regulator of toxin production (TcdC) among *Clostridium difficile* clinical isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(9), pp.3470–3475.
- Stevens, D.L. et al., 2007. Impact of antibiotics on expression of virulence-associated exotoxin genes in methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Journal of infectious diseases*, 195(2), pp.202–211.
- T., S.S., 2015. Diarrea Asociada a Antibióticos. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 26(5), pp.687–695. Available at:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0716864015001339>.
- Tang-Feldman, Y.J. et al., 2005. Prevalence of the ermB gene in *Clostridium difficile* strains isolated at a university teaching hospital from 1987 through 1998. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 40(10), pp.1537–40. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15844079>.
- Tenover, F.C., Tickler, I.A. & Persing, D.H., 2012. Antimicrobial-resistant strains of

*Clostridium difficile* from North America. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(6), pp.2929–2932.

Turnidge, J. & Paterson, D.L., 2007. Setting and revising antibacterial susceptibility breakpoints. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(3), pp.391–408.

Underwood, S. et al., 2009. Characterization of the sporulation initiation pathway of *Clostridium difficile* and its role in toxin production. *Journal of Bacteriology*, 191(23), pp.7296–7305.

Vaishnavi, C., 2015. Fidaxomicin - the new drug for *Clostridium difficile* infection. *Indian J Med Res*, 141(April), pp.398–407.

Village, E.G., 2013. *Clostridium difficile* Infection in Infants and Children. *Pediatrics*, 131(1), pp.196–200. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23277317>.

van der Waaij, D., Berghuis-de Vries, J.M. & Lekkerkerk-van der Wees, J.E.C., 1971. Colonization resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic-treated mice. *The Journal of hygiene*, 69(3), pp.405–11. Available at:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2130899&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.

Wasels, F. et al., 2015. Fluoroquinolone resistance does not impose a cost on the fitness of *Clostridium difficile* in Vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(3), pp.1794–1796.

Weber, D.J. et al., 2013. Role of the environment in the transmission of *Clostridium*

*difficile* in health care facilities. *American Journal of Infection Control*, 41(5 SUPPL.), pp.S105–S110. Available at:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajic.2012.12.009>.

Zar, F.A. et al., 2007. A comparison of vancomycin and metronidazole for the treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea, stratified by disease severity. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 45(3), pp.302–7. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17599306>.

Zhang, Y. et al., 2015. Masking autoprocessing of *Clostridium difficile* toxin A by the C-terminus combined repetitive oligo peptides. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 459(2), pp.259–263. Available at:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.02.095>.

Zhao, S. et al., 2014. Immune-based treatment and prevention of *Clostridium difficile* infection. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 10(12), pp.3522–3530. Available at:  
<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.4161/21645515.2014.980193>.

## Anexos

### Anexo 1. Solicitudes de ética aprobadas



**UNAH**  
FACULTAD DE CIENCIAS  
COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN  
MAESTRÍA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS

#### CONSTANCIA DE RESOLUCIÓN PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN No. 01-2016

Por este medio el Comité de Ética de Investigación de la Maestría de Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas (CEI-MEIZ) hace CONSTAR que el proyecto de investigación:

**Título:** "Caracterización Molecular y Epidemiología de las cepas de *Clostridium difficile* aisladas de pacientes hospitalizados en el Instituto Hondureño de Seguridad Social y el Hospital Escuela Universitario, Tegucigalpa, Honduras. Febrero 2015 – junio 2016"

**Equipo de Investigación:** Dr. Edgardo Tzoc (Investigador principal), Fanny Hidalgo Villeda (Estudiante Co-investigadora), Dr. Carlos Quesada (Co-investigador) y Marco Tulio Luque (Co-investigador)

**Institución (es):** Escuela de Microbiología, UNAH; Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas, UNAH; Laboratorio de Investigación en Bacterias Anaerobias (LIBA), Universidad de Costa Rica; Instituto Hondureño de Seguridad Social, Tegucigalpa; y Hospital Escuela Universitario.

**Fecha de presentación al comité:** 18 de enero de 2016

Fue sometido a un proceso de revisión y análisis y en consecuencia fue **APROBADO**

Duración de la aprobación: 30 / 05 / 2016 al 30 / 05 / 2017

Para los fines de los interesados se les extiende la presente a los treinta días del mes de mayo de 2016.

Dra. Wendy Murillo  
Presidente CEI-MEIZ



Lic. Judith Buñes Borjas  
Secretaría CEI-MEIZ

**OFICIO No. 007 – GNDI-HE/IHSS - 2016**

Tegucigalpa MDC, 18 de Febrero, 2016

Doctora  
**FANNY MARIELA HIDALGO VILLEDA**  
Microbióloga con Orientación en Análisis Clínicos  
Facultad de Ciencias  
Escuela de Microbiología  
UNAH

Estimado Doctora Hidalgo:

Por medio de la presente notifico a usted, que el Protocolo de estudio, "**CARACTERIZACION MOLECULAR Y EPIDEMIOLOGICA DE LAS CEPAS DE CLOSTRIDIUM DIFFICILE AISLADAS DE PACIENTES HOSPITALIZADOS EN EL INSTITUTO HONDUREÑO DE SEGURIDAD SOCIAL Y EL HOSPITAL ESCUELA UNIVERSITARIO, TEGUCIGALPA, HONDURAS, FEBRERO 2016-MAYO 2016**" ha sido aprobado por el Comité de Bioética y por la Gerencia de Docencia, solicitándoles siempre y cuando nos mantengan informados de los avances del estudio.

Se adjunta acta recibida por el Comité de Bioética para tomar en cuenta las recomendaciones.

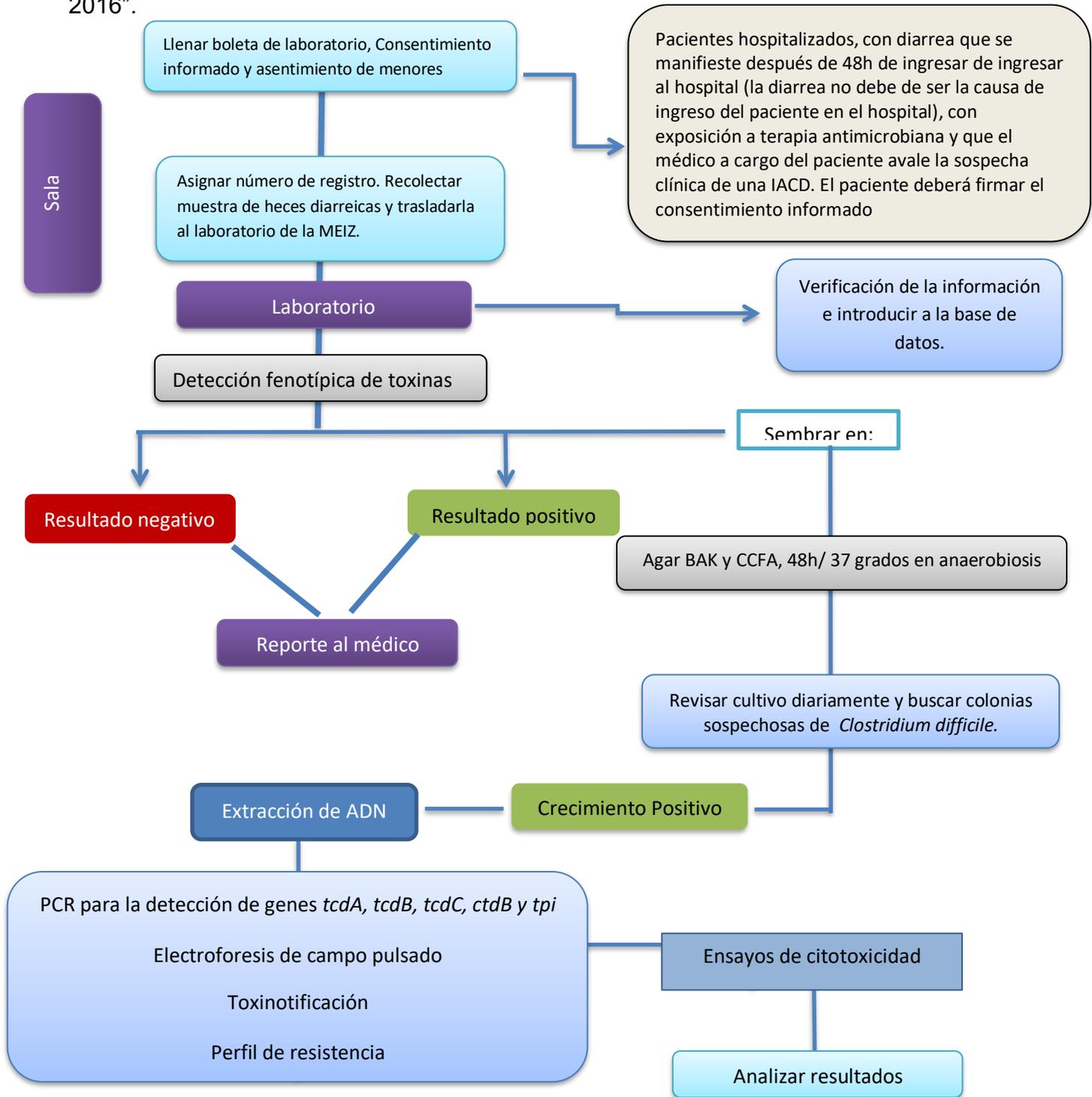
Atentamente,

  
**DRA. LUCIA ANGELICA CARMENTO**  
GERENTE NACIONAL DOCENCIA E INVESTIGACION IHSS  
[Docencia.investigacion2012@gmail.com](mailto:Docencia.investigacion2012@gmail.com)

**GERENCIA DE DOCENCIA E INVESTIGACION HE, EXT.: 5176**  
[docencia.investigacion2012@gmail.com](mailto:docencia.investigacion2012@gmail.com)

## Anexo 2. Flujograma de trabajo

“Caracterización molecular y epidemiológica de las cepas de *Clostridium difficile* aisladas de pacientes hospitalizados en el Instituto Hondureño de Seguridad Social y el Hospital Escuela Universitario, Tegucigalpa, Honduras. Febrero 2015 - junio 2016”.



### Anexo 3. Consentimiento informado para los participantes



#### Consentimiento informado

Número de registro:

Hospital: \_\_\_\_\_

Sala: \_\_\_\_\_

“Caracterización molecular y epidemiológica de las cepas de *Clostridium difficile* aisladas de pacientes hospitalizados en el Instituto Hondureño de Seguridad Social y el Hospital Escuela Universitario, Tegucigalpa, Honduras. Febrero 2016 – mayo 2016”.

**Realizado por:** Escuela de Microbiología, UNAH

**Investigador principal:** Edgardo Tzoc, M.Sc. –Escuela de Microbiología, UNAH

**Colaboradores:** Fanny Hidalgo, MQC  
Carlos Quesada, M.Sc

#### Introducción:

*Clostridium difficile* es un patógeno entérico de importancia a nivel mundial, se ha demostrado que es uno de los principales patógenos responsable de infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS) y es la causa principal de la diarrea asociada al uso de antibióticos en un 20 a 30% de los casos. Las Infecciones intrahospitalarias por *Clostridium difficile* en los últimos años ha sido un problema creciente en la atención de salud, sobre todo por la aparición de cepas hipervirulentos (pulsotipo NAP1) que produce un incremento de entre 3-5 veces en los niveles de producción de toxinas durante la fase estacionaria, factor que podría estar contribuyendo a la elevada virulencia de las cepas NAP1. En este estudio se recolectará una muestra de heces a la cual se le realizarán las siguientes pruebas:

- En el laboratorio se realizarán las siguientes pruebas:
- Detección de toxinas A y B
- Cultivo de la muestra en agar CCFA y agar BAK.
- Extracción de ADN.

- PCR Multiplex para la detección de genes tcdA, tcdB, tcdC, ctdB y tpi
- Electroforesis de campo pulsado
- Toxinotipificación
- Ensayos de citotoxicidad y determinación del efecto citopático
- Pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos

**¿De qué se trata este estudio?**

**¿Quiénes pueden participar?**

**¿Qué implica para mí participar?**

**¿Mi participación tendrá algún costo para mí o recibiré algún pago por mi participación?**

**¿Qué muestras serán recolectadas durante el estudio y para qué serán utilizadas?**

**¿Cuáles son los beneficios de mi participación?**

**¿Cuáles son los riesgos de mi participación?**

**¿La información que voy a brindar es confidencial?**

**Instituciones, aprobaciones, seguimientos, preguntas adicionales y futuros contactos**

He leído el consentimiento informado y este formulario.

Iniciales \_\_\_\_\_

Y sé lo siguiente:

- Que en este estudio se investigará la presencia de *Clostridium difficile*, sus toxinas, genes productores de esas toxinas, pulsotipo, citotoxicidad y mecanismos de resistencia.
- Que como parte de los procedimientos del estudio, se me darán instrucciones para recolectar mi muestra de heces, que posteriormente entregaré a la persona encargada del estudio, para su posterior análisis e investigación.
- Que mi participación es voluntaria y no tendrá ningún costo y que no me pagarán por participar
- Los riesgos y beneficios de participar en este estudio
- A quién puedo llamar si tengo dudas o preguntas acerca del estudio
- Que me puedo retirar del estudio en cualquier momento o negarme a cualquier parte del estudio y que esto no representará ningún problema para mí.

Sí, yo acepto participar

Nombre completo del participante: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

Firma: \_\_\_\_\_

Nombre completo del administrador del consentimiento: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

Firma: \_\_\_\_\_

Nombre completo del testigo: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

Firma: \_\_\_\_\_

## Anexo 4. Consentimiento de los padres (menores de edad)



### Consentimiento informado De los padres (Menores de edad)

Número de registro:

Hospital: \_\_\_\_\_

Sala: \_\_\_\_\_

“Caracterización molecular y epidemiológica de las cepas de *Clostridium difficile* aisladas de pacientes hospitalizados en el Instituto Hondureño de Seguridad Social y el Hospital Escuela Universitario, Tegucigalpa, Honduras. Febrero 2016 – mayo 2016”.

**Realizado por:** Escuela de Microbiología, UNAH

**Investigador principal:** Edgardo Tzoc, M.Sc. –Escuela de Microbiología, UNAH

**Colaboradores:** Fanny Hidalgo, MQC  
Carlos Quesada, M.Sc

### Introducción:

*Clostridium difficile* es un patógeno entérico de importancia a nivel mundial, se ha demostrado que es uno de los principales patógenos responsable de infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS) y es la causa principal de la diarrea asociada al uso de antibióticos en un 20 a 30% de los casos. Las Infecciones intrahospitalarias por *Clostridium difficile* en los últimos años ha sido un problema creciente en la atención de salud, sobre todo por la aparición de cepas hipervirulentos (pulsotipo NAP1) que produce un incremento de entre 3-5 veces en los niveles de producción de toxinas durante la fase estacionaria, factor que podría estar contribuyendo a la elevada virulencia de las cepas NAP1. En este estudio se recolectará una muestra de heces a la cual se le realizarán las siguientes pruebas:

- En el laboratorio se realizarán las siguientes pruebas:
- Detección de toxinas A y B
- Cultivo de la muestra en agar CCFA y agar BAK.
- Extracción de ADN.
- PCR Multiplex para la detección de genes tcdA, tcdB, tcdC, ctdB y tpi
- Electroforesis de campo pulsado

- Toxinotipificación
- Ensayos de citotoxicidad y determinación del efecto citopático
- Pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos

**¿De qué se trata este estudio?**

**¿Quiénes pueden participar?**

**¿Qué implica para mí participar?**

**¿Mi participación tendrá algún costo para mí o recibiré algún pago por mi participación?**

**¿Qué muestras serán recolectadas durante el estudio y para qué serán utilizadas?**

**¿Cuáles son los beneficios de mi participación?**

**¿Cuáles son los riesgos de mi participación?**

**¿La información que voy a brindar es confidencial?**

**Instituciones, aprobaciones, seguimientos, preguntas adicionales y futuros contactos**

He leído el consentimiento informado y este formulario.

Iniciales \_\_\_\_\_

Y sé lo siguiente:

- Que en este estudio se investigará la presencia de *Clostridium difficile*, sus toxinas, genes productores de esas toxinas, pulsotipo, citotoxicidad y mecanismos de resistencia.
- Que, como parte de los procedimientos del estudio, se me darán instrucciones para recolectar mi muestra de heces, que posteriormente entregaré a la persona encargada del estudio, para su posterior análisis e investigación.
- Que mi participación es voluntaria y no tendrá ningún costo y que no me pagarán por participar
- Los riesgos y beneficios de participar en este estudio
- A quién puedo llamar si tengo dudas o preguntas acerca del estudio
- Que me puedo retirar del estudio en cualquier momento o negarme a cualquier parte del estudio y que esto no representará ningún problema para mí.

**Declaración de consentimiento:**

Yo entiendo el contenido de este consentimiento informado, y estoy de acuerdo con la participación de mi hijo en este estudio de investigación. He tenido la oportunidad de preguntar en la sesión de información y todas mis dudas han sido contestadas satisfactoriamente. Se me ha dado suficiente tiempo para considerar la información brindada y buscar consejo si decido hacerlo. Al firmar este consentimiento informado, no he renunciado a ninguno de mis derechos legales, únicamente accedo a que mi hijo/a participe en este estudio.

Acepto participar que mi hijo participe en el estudio:  Sí  No

Estoy de acuerdo que mi hijo/a provea una muestra de heces:  Sí  No

Nombre completo del niño: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

Nombre completo del Padre/Guardián: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

Firma: \_\_\_\_\_

Nombre completo del administrador del consentimiento: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

Firma: \_\_\_\_\_

Nombre completo del testigo: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

Firma: \_\_\_\_\_

## Anexo 5. Asentimiento de menores de edad



### Asentimiento de menores

Número de registro:

Hospital: \_\_\_\_\_

Sala: \_\_\_\_\_

“Caracterización molecular y epidemiológica de las cepas de *Clostridium difficile* aisladas de pacientes hospitalizados en el Instituto Hondureño de Seguridad Social y el Hospital Escuela Universitario, Tegucigalpa, Honduras. Febrero 2016 – mayo 2016”.

**Realizado por:** Escuela de Microbiología, UNAH

**Investigador principal:** Edgardo Tzoc, M.Sc. –Escuela de Microbiología, UNAH

**Colaboradores:** Fanny Hidalgo, MQC  
Carlos Quesada, M.Sc

En este estudio se recolectará una muestra de heces del menor a la cual se le realizarán las siguientes pruebas:

- En el laboratorio se realizarán las siguientes pruebas:
- Detección de toxinas A y B
- Cultivo de la muestra en agar CCFA y agar BAK.
- Extracción de ADN.
- PCR Multiplex para la detección de genes *tcdA*, *tcdB*, *tcdC*, *ctdB* y *tpi*
- Electroforesis de campo pulsado
- Toxinotipificación
- Ensayos de citotoxicidad y determinación del efecto citopático
- Pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos

### El niño/a proveyó asentimiento verbal a:

Ser entrevistado en la escuela por un cuestionario (10-15 min): Sí  No

Proveer una muestra de heces: Sí  No

Autorizar a los investigadores a guardar sus resultados aun cuando se retire del estudio:

Sí           No

**El niño esta consiente de:**

Ser capaz de cambiar de opinión sobre los acuerdos anteriores, e informar su decisión a los investigadores sin penalidad o pérdida de los beneficios a los cuales tuviese derecho:

Sí           No

Nombre completo del menor participante: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_ Asentimiento: Sí \_\_\_\_\_ No: \_\_\_\_\_

Nombre completo del padre o madre del menor: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_ Firma: \_\_\_\_\_

Nombre completo del administrador del consentimiento: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_ Firma: \_\_\_\_\_

Nombre completo del testigo: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_ Firma: \_\_\_\_\_

**Anexo 6. Cuestionario Clínico Individual**  
**Universidad Nacional Autónoma de Honduras**



**Escuela de Microbiología**  
**Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas**

Infecciones por *Clostridium difficile*

Cuestionario de información clínico-epidemiológico

Número de registro:

**Hospital:**

\_\_\_\_\_

**Sala:** \_\_\_\_\_

**1.**

**Edad:** \_\_\_\_\_

**2.**

Género:

Femenino     Masculino     Desconocido

**3.**

Fecha de ingreso al hospital

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_ (dd/mm/aaaa)

**Fecha de egreso al hospital**

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_ (dd/mm/aaaa)

**Principal diagnóstico inicial o motivo de ingreso:**

Gastrointestinal

Respiratorio

SNC

Renal y/o urinario

Cardiovascular

Trauma

Malignidad

Metabólico

Diabetes

Musculoesquelético

Ginecológico

Sepsis

Otro: \_\_\_\_\_

Diagnóstico específico de ingreso: \_\_\_\_\_

4. Servicio del hospital donde se presentó la primera descarga diarreica. Fecha:

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_ (dd/mm/aaaa)

5. **Evolución clínica del paciente:**

Temp Máxima : \_\_\_\_\_ °C

Recuento total de leucocitos (Valor más alto): \_\_\_\_\_

Descargas diarreicas promedio por día: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_ (dd/mm/aaaa)

6. **Inmunocompromiso del paciente:**

Sí

No

7. **Presencia o evidencia de (durante o después de la diarrea):**
- Shock
  - Ileo parálítico
  - Colitis pseudomembranosa
  - Megacolon tóxico
  - Perforación intestinal
8. **Paciente requirió admisión en la UCI/UTI**
- No
  - Sí, admitido por complicaciones asociadas a *C. difficile*
  - Sí, admitido por otra razón. ¿Cuál? \_\_\_\_\_
9. **Antibióticos u otros fármacos usados hasta 8 semanas ANTES del inicio de la diarrea:**
- Clindamicina
  - Cefalosporinas.  
¿Cuál(es)? \_\_\_\_\_
  - Fluoroquinolonas.  
¿Cuál(es)? \_\_\_\_\_
  - Penicilinas. ¿Cuál(es)? \_\_\_\_\_
  - Macrólidos. ¿Cuál(es)? \_\_\_\_\_
  - Metronidazol
  - Carbapenems. ¿Cuál(es)? \_\_\_\_\_
  - Vancomicina intravenosa
  - Aminoglicósidos.  
¿Cuál(es)? \_\_\_\_\_
  - Otro antibiótico.  
¿Cuál(es)? \_\_\_\_\_

Inhibidores de bombas de protones

Antagonistas de H<sub>2</sub>

Corticoesteroides

Laxantes

Anti-inflamatorios no esteroideos

**Días de tratamiento con  
antibióticos antes del inicio de la  
diarrea:**

**10. Tratamiento contra infección por  
*C. difficile***

Vancomicina (IV\_\_\_ VO\_\_\_)

Metronidazol (IV\_\_\_ VO\_\_\_)

Prebióticos y/o probióticos

Colostomía

Otro(s): \_\_\_\_\_

**12. Si el paciente murió:**

Infección por *C. difficile* fue la causa de muerte

Infección por *C. difficile* contribuyó directamente a la muerte

Con base en el criterio del  
médico tratante

Causa fue completamente diferente a infección por

*C. difficile*

Fue imposible determinar la causa de muerte

**13. Fecha del fallecimiento**

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_ (dd/mm/aaaa)

FIN

## Anexo 7. Detección de toxinas A y B de *Clostridium difficile*

<b>Universidad Nacional Autónoma de Honduras</b> <b>Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas</b> <b>Laboratorio Teasdale-Corti</b>		
Procedimiento Operativo Estándar para la detección de Toxinas A y B, prueba Xpect <i>Clostridium difficile</i> toxinas A/B test de Remel®		Número de páginas <hr/> 2
Elaborado por: Fanny Hidalgo Villeda Fecha: Diciembre de 2015	Revisado por: Edgardo Tzoc	

**Objetivo:** Determinar la presencia de toxinas A y B producidas por *Clostridium difficile*, de muestras de heces diarreicas.

**Definición:**

**Unidad de análisis:** muestras de heces diarreicas.

**Reactivos:**

- ✓ Reactivo conjugado 1
- ✓ Reactivo conjugado 2
- ✓ Diluyente de la muestra
- ✓ Control positivo
- ✓ Control negativo

**Material y equipo:**

- ✓ Bata de Laboratorio
- ✓ Guantes
- ✓ Mascarilla
- ✓ Papel toalla
- ✓ Dispositivos de ensayo
- ✓ Pipetas de transferencia desechables
- ✓ Tubos de dilución
- ✓ Gradilla para tubos de dilución
- ✓ Varillas aplicadoras de madera
- ✓ Instrucciones de uso
- ✓ Temporizador
- ✓ Recipientes para descartar material

**Procedimiento previo al ensayo:**

1. Dejar que los componentes del kit se estabilicen a temperatura ambiente antes de su uso.
2. Mezclar bien la muestra de heces antes de realizar el ensayo.
3. Cuando esté listo para realizar el ensayo, retire el dispositivo de ensayo de la bolsa de papel aluminio y colóquelo sobre una superficie plana.

4. Rotular el dispositivo y los tubos de dilución con el nombre o código de la muestra.

#### **Preparación de la muestra:**

1. Añada diluyente de muestra hasta la marca del tubo de dilución (0.5ml) (tubo1) y añadir 0.2g de la muestra de heces.
2. Mezclar bien y dejar que las partículas grandes se sedimenten.
3. Con una pipeta de transferencia coloque 0.1ml de esta preparación a otro tubo de dilución (tubo2).

#### **Procedimiento del ensayo:**

1. Añadir 5 gotas del reactivo conjugado 1 al tubo de dilución que contiene la muestra diluida (tubo2).
2. Añadir 5 gotas del reactivo conjugado 2 al tubo de dilución que contiene la muestra diluida (tubo2).
3. Mezclar bien el contenido del tubo.
4. Colocar del tubo 2 0.2ml con una pipeta de transferencia en el pocillo de muestra del dispositivo de ensayo.
5. Leer y anotar los resultados del ensayo después de 20 minutos, los resultados no son válidos después de 20 minutos.

#### **Interpretación de resultados:**

1. Resultado positivo: se indica por dos líneas color negro de cualquier intensidad, en la zona del ensayo (TEST) y en la zona de control (CTRL). Un resultado positivo indica la presencia de toxinas A y B de *Clostridium difficile* en la muestra.
2. Resultado negativo: se indica por una sola línea de color negro en la zona de control (CTRL). Un resultado negativo indica que no hay presencia de toxinas A y B de *Clostridium difficile* en la muestra.
3. Resultado no valido: se indica cuando la línea de ensayo (TEST) es parcial o está incompleta, cuando la línea en la zona de control (CTRL) no aparece a los 20 minutos o está incompleta.

#### **Referencias:**

Carter, G. P., Douce, G. R., Govind, R., Howarth, P. M., Mackin, K. E., Spencer, J., . . . Lyras, D. (2011). The anti-sigma factor TcdC modulates hypervirulence in an epidemic BI/NAP1/027 clinical isolate of *Clostridium difficile*. *PLoS Pathog*, 7(10), e1002317. doi: 10.1371/journal.ppat.1002317.

## Anexo 8. Medios de cultivo para el cultivo e identificación de *Clostridium difficile*

<b>Universidad Nacional Autónoma de Honduras</b> <b>Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas</b> <b>Laboratorio Teasdale-Corti</b>		
Procedimiento Operativo Estándar para medios de cultivo para el cultivo e identificación <i>Clostridium difficile</i> .		Número de páginas
		4
Elaborado por: Fanny Hidalgo. Fecha: Diciembre de 2015	Revisado por: Carlos Quesada-Gómez	

**Objetivo:** Describir el procedimiento para la preparación de los medios de cultivo necesarios para el cultivo, aislamiento e identificación de *Clostridium difficile* a partir de muestras clínicas y de carnes para consumo humano.

### Reactivos y medios de cultivo:

- ✓ Agar base Brucella (BBL)
- ✓ Solución de Vitamina K1 (40 mg/ml)
- ✓ Agua destilada
- ✓ Eritrocitos lisados de cordero o caballo
- ✓ Peptona proteosa
- ✓ Fosfato disódico
- ✓ Fosfato monopotásico
- ✓ Fructuosa
- ✓ Rojo neutro
- ✓ Agar base *Clostridium difficile*
- ✓ Cicloserina
- ✓ Cefoxitina
- ✓ Extracto de levadura
- ✓ Peptona Mix
- ✓ Tioglicolato
- ✓ Cloruro de sodio
- ✓ L-cisteína
- ✓ Resazurina
- ✓ Bicarbonato de sodio
- ✓ Solución de hemina (5 mg/ml)
- ✓ Solución de vitamina K1 (40 mg/ml)
- ✓ Agar FAB

### Material y equipo:

- ✓ Bata de Laboratorio
- ✓ Guantes
- ✓ Mascarilla
- ✓ Papel toalla
- ✓ Placas Petri estériles
- ✓ Autoclave

- ✓ Refrigeradora a 4°C
- ✓ Estufa

### **Agar BAK**

**Descripción:**

Agar Brucella con sangre lisada de caballo o cordero al 5% y suplementado con vitamina K.

**Composición:**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidad</b>
Agar base Brucella (BBL)	43 g
Solución de Vitamina K1 (40 mg/ml)	1 ml
Agua destilada	1000 ml
Eritrocitos lisados de cordero o caballo	50 ml

**Preparación:**

- ✓ Combinar todos los ingredientes, excepto los eritrocitos.
- ✓ Ajustar el pH a 7,0.
- ✓ Hervir hasta disolver todos los ingredientes.
- ✓ Autoclavar el medio a 121 °C por 15 min.
- ✓ Enfriar el medio a 50 °C, agregar los eritrocitos y colocar 20ml en placas de Petri estériles.
- ✓ El medio es viable hasta por dos semanas a 4 °C

### **Agar CCFA**

**Descripción:**

Agar Clostridium difficile con fructosa, cicloserina y cefoxitina.

**Composición:**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidad</b>
Peptona proteosa	40 g
Fosfato disódico	5 g
Fosfato monopotásico	1 g
Fructuosa	6 g
Rojo neutro	3 g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 ml
Cicloserina	500 mg
Cefoxitina	16 mg

**Preparación:**

- ✓ Combinar todos los ingredientes, excepto la cicloserina y la cefoxitina.
- ✓ Ajustar el pH a 7,6.
- ✓ Hervir hasta disolver todos los ingredientes.
- ✓ Autoclavar el medio a 121 °C por 15 min.
- ✓ Enfriar el medio a 50 °C, agregar la cicloserina y cefoxitina. Colocar 20ml en placas de Petri.
- ✓ El medio es viable hasta por ocho semanas a 4 °C.

**Agar CDMN****Descripción:**

Agar *Clostridium difficile* monoxalactam y norfloxacin.

**Composición:**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidad</b>
Agar base <i>C. difficile</i> CM0601 (Oxoid®)	34,5 g
Agua destilada	500 ml
Suplemento selectivo <i>C. difficile</i> SR0173 (Oxoid®)	1 frasco reconstituido en 2 ml de agua destilada estéril
Sangre de caballo o carnero	35 ml

**Preparación:**

- ✓ Hervir el medio base en el agua destilada hasta disolver todos los ingredientes.
- ✓ Autoclavar el medio a 121 °C por 15 min.
- ✓ Enfriar el medio a 50 °C, agregar los 2 ml del suplemento reconstituido (que contiene
- ✓ cisteína, monoxalactam y norfloxacin). Y agregar la sangre de caballo (obteniendo 7%
- ✓ v/v). Chorrear en placas de Petri.
- ✓ El medio es viable hasta por 4 semanas a 4 °C.

**Solución de extracto de levadura al 0.05 %****Descripción:**

Solución de extracto de levadura al 0.05% para el tratamiento con alcohol.

**Composición:**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidad</b>
Extracto de levadura	0.05g

Agua destilada	500 ml
----------------	--------

**Preparación:**

- ✓ Combinar todos los ingredientes.
- ✓ Ajustar el pH a 7,0.
- ✓ Hervir hasta disolver todos los ingredientes.
- ✓ Autoclavar el medio a 121 °C por 15 min.
- ✓ Mantenerlo en botellas rotuladas en refrigeración a 4 °C.

**Caldo FAB**

**Descripción:**

Caldo de enriquecimiento para anaerobios fastidiosos.

**Composición:**

Ingredientes	Cantidad
Peptona Mix	15 g
Extracto de levadura	10 g
Tioglicolato	0.5 g
Cloruro de sodio	0.75 g
L-cisteína	0.5 g
Resazurina	0.001 g
Bicarbonato de sodio	0.4 g
Solución de hemina (5 mg/ml)	1 ml
Solución de vitamina K1 (40 mg/ml)	1 ml
Agar	0.75 g
Agua destilada	1 000 ml

**Preparación:**

- ✓ Combinar todos los ingredientes.
- ✓ Ajustar el pH a 7,2.
- ✓ Hervir hasta disolver todos los ingredientes.
- ✓ Transferir 5 ml en tubos de taparroca.
- ✓ Autoclavar el medio a 121 °C por 15 min.
- ✓ Mantener los tubos de taparroca a temperatura ambiente y en la oscuridad.

**Referencias:**

Carlos Quesada-Gómez, Laboratorio de Investigación en Bacteriología Anaerobia, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.

## Anexo 9. Aislamiento en cultivo anaerobio de *Clostridium difficile*

<b>Universidad Nacional Autónoma de Honduras</b> <b>Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas</b> <b>Laboratorio Teasdale-Corti</b>		
Procedimiento Operativo Estándar para el aislamiento de <i>Clostridium difficile</i> a partir de muestras de heces.		Número de páginas
		5
Elaborado por: Fanny Hidalgo. Fecha: Diciembre de 2015		Revisado por: Carlos Quesada-Gómez

**Objetivo:** Obtener aislamientos de *Clostridium difficile* en los medios CCFA y Agar BAK.

**Unidad de análisis:** muestras de heces diarreicas.

### Reactivos y medios de cultivo:

- ✓ Extracto de levadura
- ✓ etanol al 96%
- ✓ placa de agar BAK
- ✓ placa de agar CCFA
- ✓ caldo FAB
- ✓ Set de coloración Gram
- ✓ Glicerol

### Material y equipo:

- ✓ Bata de Laboratorio
- ✓ Guantes
- ✓ Mascarilla
- ✓ Papel toalla
- ✓ Asas bacteriológicas
- ✓ Lámpara de luz UV
- ✓ Microscopio
- ✓ Mechero o incinerador
- ✓ Hielo seco ó ice packs
- ✓ Congelador a -20 °C
- ✓ Tubos cónicos de 15ml
- ✓ Centrifuga
- ✓ Torundas estériles
- ✓ Incubadora
- ✓ Bolsas de anaerobiosis
- ✓ Vortex

### **Procedimiento con las muestras de heces:**

1. Las muestras de heces serán recibidas en el laboratorio en viales de 2 ml y transportados en hielo seco.
2. Si la muestra de heces no puede ser cultivada el mismo día de su recolección, se puede congelar a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 5 a 7 días y luego ser transportadas en frío al laboratorio el día de su cultivo.

**Shock con alcohol de las muestras de heces:** Realizar el tratamiento con alcohol a las muestras de heces, para eliminar la mayoría de células vegetativas y dejar sólo las esporas bacterianas:

1. Dispense 1 ml de la muestra de heces líquida en tubos rotulados cónicos para centrifuga de 15 ml.
2. Si la muestra es semi-sólida, dispense 1 ml de una solución estéril de 0.05% de extracto de levadura en el vial de 2 ml en que se recibió la muestra. Luego, dispense 1 ml de la muestra de heces con extracto de levadura en tubos rotulados cónicos para centrifuga de 15 ml.
3. Si la muestra es totalmente sólida, dispense 0.5 ml (500 ul) de una solución estéril de 0.05% de extracto de levadura a tubos rotulados cónicos para centrifuga de 15 ml y con una torunda estéril pasar un igual volumen de la muestra de heces sólida.
4. Congelar la muestra original a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

5. Agregar 1 ml de etanol al 96% a la suspensión de heces en los a los tubos de 15 ml cónicos.
6. Mezclar con el vortex vigorosamente y luego incubarlo a temperatura ambiente por 35 minutos.
7. Centrifugar a 3500 rpm por 5 minutos.
8. Decantar el etanol en tubos de desecho. Este líquido descartado debe ser tratado como material biopeligroso (pasar el punto Cultivo de la muestra de heces y respaldo del cultivo).

#### **Cultivo de la muestra de heces:**

1. Usando una torunda estéril inocular el sedimento del centrifugado anterior en platos de agar CCFA. Sembrar o rayar con asas estériles para obtener colonias aisladas.
2. Incubar en jarra de anaerobiosis por 72 horas a 37 C.
3. Después de los 3 días de incubación, examinar cada plato de agar en busca de colonias sospechosas (las colonias en CCFA con translucidas, irregulares y tornar el medio amarillo. El medio de cultivo CCFA es muy selectivo, prácticamente solo *C. difficile* y algunos otros clostridios pueden crecer.

#### **Respaldo del cultivo de la muestra de heces:**

1. Tomar otra torunda del sedimento obtenido en el punto 1 e introducirla en el caldo FAB.

2. Incubar la torunda dentro del caldo FAB en anaerobiosis, a 37 C por 7 días. Este medio funcionará como un respaldo en caso que el cultivo primario sea negativo.
3. Después de una semana, usar la torunda del caldo FAB e inocular en platos de agar CCFA. Sembrar o rayar con asas estériles para obtener colonias aisladas.
4. Incubar en jarra de anaerobiosis por 72 horas a 37 C.
5. Después de los 3 días de incubación, examinar cada plato de agar en busca de colonias sospechosas prácticamente solo *C. difficile* y algunos otros clostridios pueden crecer.

#### **Aislamiento de *Clostridium difficile*:**

1. Las colonias sospechosas del medio CCFA pasarlos y sembrarlos en medio de agar BAK y en un caldo 5 ml de BHI. Incubar en jarra de anaerobiosis por 72 horas a 37 C.
2. Después de este tiempo, determinar la pureza del cultivo macroscópicamente (puede usarse un estereoscopio), y mediante una tinción de Gram (*C. difficile* es un bacilo Gram positivo, recto, uniforme y que casi NO produce esporas). Además, NO tiene un olor putrefacto, sino más bien a heces de caballo y tiene fluorescencia verde ante la luz UV.
3. Si no creció en la placa de agar BAK, tomar un inóculo del caldo BHI y sembrarlo en otro plato de agar BAK, incubar por 72h a 37C en anaerobiosis.
4. A las colonias sospechosas de *C. difficile* realizar la prueba de la tolerancia al oxígeno: Tomar una colonia y sembrar en 3 placas de BAK. Incubar una

en jarra con vela, otra en aerobiosis y otra en anaerobiosis por 72 horas a 37 C.

5. Después de este tiempo determinar que la colonia o el aislamiento esté puro y sólo tenga crecimiento en el BAK incubado en anaerobiosis.

**Identificación rápida o presuntiva de *C. difficile*:**

1. La identificación fenotípica de los aislamientos se realizó utilizando el sistema RapID 32A (bioMérieux).
2. De la placa de agar en BAK tomar todas las colonias posibles y puras, inocular en caldo BHI + 20% de glicerol por triplicado. Guardar a -80 C.

**Referencias:**

Carlos Quesada-Gómez, Laboratorio de Investigación en Bacteriología Anaerobia, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.

## Anexo 10. Crioconservación y recuperación del congelado de cepas de

### *Clostridium difficile* a -80 °C.

<b>Universidad Nacional Autónoma de Honduras</b> <b>Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas</b> <b>Laboratorio Teasdale-Corti</b>		
Procedimiento Operativo Estándar para la Crioconservación y recuperación del congelado de cepas de <i>Clostridium difficile</i> a -80 °C.		Número de páginas
		5
Elaborado por: Fanny Hidalgo. Fecha: Marzo 2016	Revisado por: Carlos Quesada-Gómez	

**Objetivo:** Describir el procedimiento para el congelamiento o crioconservación de cepas de *Clostridium difficile* a partir de aislamientos puros en el laboratorio.

#### **Definición:**

- ✓ **Aislamientos:** Cepas en Agar BAK, con prueba de aerotolerancia, Coloración de Gram y fluorescencia; que sugieran que se trata de una cepa de *Clostridium difficile*.

**Unidad de análisis:** aislamiento de *Clostridium difficile* en Agar BAK.

#### **Reactivos y aislamientos:**

- ✓ 1,5 ml de BHI + 20% glicerol
- ✓ Set de coloración de Gram
- ✓ colonias de *C. difficile* cultivada en Agar BAK
- ✓ caldo BHI + vitamina K.
- ✓ agar BAK y agar CCFA
- ✓ Solución de Vitamina K
- ✓ Agar base *C. difficile* CM0601
- ✓ Rojo Neutro
- ✓ Agua destilada
- ✓ Suplemento selectivo *C. difficile* SR0096E
- ✓ Eritrocitos lisados de caballo
- ✓ Agar base Brucella (BBL)

#### **Material y equipo:**

- ✓ Bata de Laboratorio
- ✓ Guantes
- ✓ Mascarilla
- ✓ Papel toalla
- ✓ Campana de bioseguridad
- ✓ Incubadora

- ✓ Jarra y sobres de anaerobiosis
- ✓ Lámpara con luz UV
- ✓ Tubos de 2ml
- ✓ Congelador
- ✓ Microscopio
- ✓ Baño maría
- ✓ Placas Petri
- ✓ Autoclave
- ✓ Micropipeta 10-100 µl
- ✓ Micropipeta 100-1000 µl
- ✓ Puntas estériles para micropipetas

## **Procedimientos**

### **1. Cultivo previo de *C. difficile*:**

- ✓ Antes de congelar o crioconservar cepas de *C. difficile* se debe asegurar que estas estén puras y viables.
- ✓ Las cepas a congelar cultivarlas en agar BAK. Incubar en anaerobiosis, a 37 °C por 48 horas.
- ✓ Verificar la pureza del cultivo (morfología colonial, tinción de Gram, fluorescencia a UV, olor). Tomar varias colonias del cultivo puro y sembrar abundantemente en otro agar BAK. Incubar en anaerobiosis, a 37 °C por 72 horas.

### **2. Crioconservación o congelamiento de *C. difficile*:**

- ✓ Tener preparados criotubos con 1,5 ml de BHI + 20% glicerol, estériles.
- ✓ Tomar todas las colonias aisladas y puras del segundo agar BAK (después de la incubación) con un aplicador de algodón o torunda e inocular abundantemente el caldo BHI + glicerol con cada una de las cepas. En una cámara de bioseguridad o al lado de la llama.

- ✓ Es recomendable congelar cada cepa por triplicado y que ubicarlos en cajas diferentes en un congelador de -80 °C.

### **3. Recuperación de cepas de *C. difficile* a partir del congelado:**

- ✓ Tomar los criotubos de las cepas a descongelar (que se encuentran en el congelador a – 80 °C). Colocarlas en hielo, para evitar su descongelamiento total.
- ✓ Procurando que NO se descongelen totalmente, en una cámara de bioseguridad o a la par de la llama raspar la superficie de cada uno de las cepas congeladas y sembrarlas en un agar BAK e inocularlas en 5 ml de un caldo BHI + vitamina K. Volver las cepas rápidamente al congelador de -80 °C.
- ✓ Incubar las placas de agar BAK y los tubos de BHI en anaerobiosis, por 72 horas a 37 °C.
- ✓ Después de ese período de incubación verificar la pureza (morfología colonial, tinción de Gram, olor, fluorescencia en UV) de las cepas crecidas en BAK, el cultivo debería estar puro. Si no estar puro usar medios de re-aislamiento sembrando UNA colonia en nuevo BAK o utilizar otras técnicas que se verán en otro protocolo (como medios selectivos).
- ✓ Si no hubo crecimiento en el agar BAK a partir del congelado. Tomar un inóculo del caldo BHI turbio y sembrarlo en un agar BAK y en un CCFA, incubar ambos en anaerobiosis, a 37 °C por 72 horas.
- ✓ Después de este período de tiempo verificar la pureza de los cultivos y obtener cultivos puros de *C. difficile* como se ha indicado en otros protocolos.

- ✓ Si aún así no hay crecimiento, entonces volver a otro tubo congelado (se habían crioconservado por triplicado) e iniciar el protocolo de nuevo.

#### 4. Medios de cultivo

**CCFA agar** – *Clostridium difficile* cicloserina cefoxitina agar; medio de cultivo selectivo para el aislamiento primario de *C. difficile*.

Composición:

Ingredientes	Cantidad
Agar base <i>C. difficile</i> CM0601	34,5 g
Rojo Neutro	3g
Agua destilada	500 ml
Suplemento selectivo <i>C. difficile</i> SR0096E	1 frasco reconstituido en 2 ml de agua destilada

Preparación:

- ✓ En un erlenmeyer de mezclar el Agar base Oxoid + Rojo neutro + Agua destilada
- ✓ Autoclavar el medio a 121 °C por 15 min.
- ✓ Enfriar el medio a 50 °C, agregar los 2 ml del suplemento reconstituido (que contiene cicloserina y cefoxitina).
- ✓ Chorrear en placas de Petri.
- ✓ El medio es viable hasta por ocho semanas a 4 °C.

**BAK** – Agar Brucella con 5% sangre lisada de caballo y vitamina K

Ingredientes	Cantidad
Agar base Brucella (BBL)	43 g

Solución de Vitamina K1 (40 mg/ml)	1 ml
Agua destilada	1000 ml
Eritrocitos lisados de caballo	50 ml

Preparación:

- ✓ Combinar todos los ingredientes, excepto la sangre de caballo
- ✓ Ajustar el pH a 7,0.
- ✓ Autoclavar el medio a 121 °C por 15 min.
- ✓ Enfriar el medio a 50 °C, agregar la sangre lisada de caballo
- ✓ Chorrear en placas de Petri estériles.
- ✓ El medio es viable hasta por 4 semanas a 4 °C

**BIH + Vitamina K** – Caldo BHI convencional utilizado en bacteriología con una concentración final de 1 ug/ml de Vitamina K.

**BIH + Vitamina K + Glicerol** – Caldo BHI convencional utilizado en bacteriología con una concentración final de 1 ug/ml de Vitamina K y un 20% de glicerol, estéril.

**Solución de Vitamina K** – Generalmente se prepara una solución de 40mg/ml de Vitamina K. Se mezcla la vitamina K con etanol absoluto (no es necesario autoclavar) y se mantiene a 4 C.

**Referencias:** Carlos Quesada-Gómez, Laboratorio de Investigación en Bacteriología Anaerobia, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.

## Anexo 11. Extracción de ADN

<b>Universidad Nacional Autónoma de Honduras</b> <b>Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas</b> <b>Laboratorio Teasdale-Corti</b>		
Procedimiento Operativo Estándar para la extracción del ADN de <i>Clostridium difficile</i> usando InstaGene Matrix® de Biorad.		Número de páginas
		2
Elaborado por: Fanny Hidalgo Villeda Fecha: Diciembre de 2015	Revisado por: Carlos Quesada Aprobado por: Carlos Quesada	

**Objetivo:** Obtener ADN genómico de alta calidad y concentración a partir de aislamiento de *Clostridium difficile* en Agar BAK.

### Definición:

- ✓ DNAg: Ácido desoxirribonucleico genómico

**Unidad de análisis:** aislamiento de *Clostridium difficile* en Agar BAK.

### Reactivos y aislamientos:

- ✓ 9 ml de caldo BHI pre-reducido, inoculado 6-8 horas.
- ✓ colonia de *C. difficile* cultivada en Agar BAK
- ✓ 200 µl de Instagene Matrix® Biorad (Catálogo número 732-6030)

### Material y equipo:

- ✓ Bata de Laboratorio
- ✓ Guantes
- ✓ Mascarilla
- ✓ Papel toalla
- ✓ Incubadora
- ✓ Centrifuga
- ✓ Vortex
- ✓ Baño maría
- ✓ Tubos eppendorf de 1,5 ml (estériles y libres de nucleasas)
- ✓ Micropipeta 10-100 µl
- ✓ Micropipeta 100-1000 µl
- ✓ Puntas estériles para micropipetas
- ✓ Thermomixer

### Procedimiento:

1. Inocular una colonia de *C. difficile* cultivada en Agar BAK en un tubo con 10 ml de caldo BHI pre-reducido. Incubar por 6 – 8 horas a 37 °C.

2. Calentar el Thermomixer a 56°C.
3. Preparar un set de tubos eppendorf (estériles y libres de nucleasas) de 1,5 ml rotulados con el número de las muestras.
4. Homogenizar cada tubo de BHI, transferir 400 µl de caldo BHI en cada tubo.
5. Centrifugar a 14.000 rpm por 2 min.
6. Aspirar y descartar el sobrenadante, con el cuidado de no destruir el “pellet”.
7. Resuspender el “pellet” de células en 200 ul de Instagene Matrix® Biorad (Catálogo número 732-6030) y vortexear.
8. incubar a 56 °C en el Thermomixer por 15 minutos.
9. Mezclar con el vortex a alta velocidad por 10 segundos y entonces colocar los tubos en un baño seco (“heating block”) o en un baño de agua hirviendo (100°C) por 8 minutos. Nota: vigilar que los tubos Eppendorf no se destapen.
10. Mezclar con el vortex a alta velocidad por 10 segundos
11. Centrifugar a 14.000 rpm por 2 minutos, hasta obtener un sedimentado de la matriz.
12. Usar 2 µl del sobrenadante que queda por encima de la matriz en reacciones de 25 µl de PCR.
13. El ADN se puede usar en el momento, o almacenar a -20°C (centrifugar 2min a 14,000 rpm antes de usar).

### Referencias:

Quesada-Gómez, C., López-Urena, D., Acuna-Amador, L., Villalobos-Zúniga, M., Du, T., Freire, R., . . . Chaves-Olarte, E. (2015). Emergence of an outbreak-associated *Clostridium difficile* variant with increased virulence. *J Clin Microbiol*, 53(4), 1216-1226. doi: 10.1128/JCM.03058-14. (Quesada-Gómez et al., 2015).

## Anexo 22. Detección de genes *tcdA*, *tcdB*, *tcdC*, *ctdB* y *tpi*

<b>Universidad Nacional Autónoma de Honduras</b> <b>Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas</b> <b>Laboratorio Teasdale-Corti</b>		
Procedimiento Operativo Estándar para la detección de genes <i>tcdA</i> , <i>tcdB</i> , <i>tcdC</i> , <i>ctdB</i> y <i>tpi</i> .		Número de páginas 4
Elaborado por: Fanny Hidalgo Villeda Fecha: Diciembre de 2015	Revisado por: Carlos Quesada Aprobado por: Carlos Quesada	

**Objetivo:** Amplificar fragmento DNA de los genes *tcdA*, *tcdB*, *tcdC*, *ctdB* y *tpi* por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR multiplex), a partir de DNA extraído de aislamientos de *Clostridium difficile*.

### Definición:

En la reacción Multiplex I, se determina la presencia de los genes de la toxina A (*tcdA*), toxina B (*tcdB*), del dominio de unión de la toxina binaria (*ctdB*). En la reacción Multiplex II, se busca la presencia del regulador negativo del PaLoc (*tcdC*) y de la triosa fosfato isomerasa (*tpi*) para confirmar la identidad de *Clostridium difficile*.

**Unidad de análisis:** Muestras de DNA.

### Reactivos y aislamientos:

- ✓ Control positivo de amplificación una cepa NAP1 (A+B+ con una deleción de 18 pb en el *tcdC* y CDT+).
- ✓ Control positivo NAP7 (A+B+, con una deleción de >18 pb en el *tcdC* y CDT+)
- ✓ Control cepa A-B+ (sin deleción en el *tcdC* y CDT+).
- ✓ Agua grado molecular
- ✓ ADN
- ✓ Primer cdtB-F1- 5'-TGGACAGGAAGAATAATTCCTTC-3'
- ✓ Primer cdtB-F2- 5'-TGCAACTAACGGATCTCTTGC-3'
- ✓ Primer tcdA-F- 5'-AGATTCCTATATTTACATGACAATAT-3'
- ✓ Primer tcdA-RA3B- 5'-ACCATCAATCTCGAAAAGTCCAC-3'
- ✓ Primer tcdB-F3- 5'-AATGCATTTTTGATAAACACATTG-3'
- ✓ Primer tcdB-F4- 5'-AAGTTTCTAACATCATTCCAC-3'
- ✓ Primer tpi-F- 5'-AAAGAAGCTACTAAGGGTACAAA-3'
- ✓ Primer tpi-R- 5'-CATAATATTGGGTCTATTCCTAC-3'
- ✓ Primer Pal-F15- 5'-TCTCTACAGCTATCCCTGGT-3'
- ✓ Primer Pal-F16- 5'-AAAATGAGGGTAACGATTT-3'
- ✓ gel al 1,5% de agarosa
- ✓ buffer TBE 0.5X.
- ✓ bromuro de etidio a 0,5 ug/ml ó Gelred 3x
- ✓ Alcohol al 70%

### Material y equipo:

- ✓ Bata de Laboratorio
- ✓ Guantes
- ✓ Mascarilla
- ✓ Papel toalla
- ✓ Erlenmeyer
- ✓ Tubos eppendorf de 1,5 ml (estériles y libres de nucleasas)
- ✓ Microcentrifuga para tubos de 1.5ml y 0.2ml
- ✓ Termociclador
- ✓ Cámara electroforética
- ✓ Micropipeta 10-100 µl
- ✓ Micropipeta 100-1000 µl
- ✓ Puntas con filtro estériles para micropipetas
- ✓ Microondas
- ✓ Marcador indeleble.
- ✓ Gradilla para tubos eppendorf
- ✓ Baño maría

#### Primers:

Nombre	Secuencia	Tm(°C)	Gen	Tamaño producto (bp)	Descripción
<i>cdtB</i> -F1 <i>cdtB</i> -F2	5'- TGGACAGGAAGAATAATTCCT TC-3' 5'- TGCAACTAACGGATCTCTTGC -3'	68,2 68,9	<i>cdtB</i>	582	Subunidad B Toxina Binaria
<i>tcdA</i> -F <i>tcdA</i> - RA3B	5'- AGATTCCTATATTTACATGAC AATAT-3' 5'- ACCATCAATCTCGAAAAGTCC AC-3'	65,0 70,0	<i>tcdA</i>	420	Toxina A
<i>tcdB</i> -F3 <i>tcdB</i> -F4	5'- AATGCATTTTTGATAAACACA TTG-3' 5'- AAGTTTCTAACATCATTTCCA C-3'	63,9 63,9	<i>tcdB</i>	329	Toxina B
<i>tpi</i> -F <i>tpi</i> -R	5'- AAAGAAGCTACTAAGGGTACA AA-3' 5'- CATAATATTGGGTCTATTCCT AC-3'	66,4 66,4	<i>tpi</i>	230	Triosa fosfato isomerasa*

Pal-F15	5'-	68,2	<i>tcd</i>	673	Regulador negativo del PaLoc.
Pal-F16	TCTCTACAGCTATCCCTGGT- 3' 5'- AAAAATGAGGGTAACGATTT- 3'	61,1	C		

### Controles:

NAP1	Cepa A-B+	NAP7
-Delección en <i>tcdC</i> de 18 bp - <i>cdtB</i> + - <i>tcdA</i> + - <i>tcdB</i> + - <i>tpi</i> +	- <i>tcdC</i> + SIN delección - <i>cdtB</i> - - <i>tcdA</i> - - <i>tcdB</i> + - <i>tpi</i> +	-Delección en <i>tcdC</i> >18 bp - <i>cdtB</i> + - <i>tcdA</i> + - <i>tcdB</i> + - <i>tpi</i> +

### Procedimiento:

- ✓ Verificar tener todo el material, reactivos y equipos disponibles.
- ✓ Limpiar la cámara de flujo laminar, micropipetas con alcohol al 70%.
- ✓ Con anticipación se descongelan en hielo o a 4 °C los primers, controles y ADN.
- ✓ Una vez descongelado el ADN, centrifugar 1 minuto a 14,000 rpm para separar los remanentes del ADN.
- ✓ Colocar los primers, ADN, controles, micropipetas, puntas, tubos eppendorf y tubos para PCR dentro de la cámara de flujo laminar.
- ✓ Los primers se preparan a partir del stock comercial correspondiente, que se encuentra en el congelador de -20 °C. En tubos eppendorf de 1.5 MI, realizar una dilución 1:10 (10 µl del primer más 90 µl de agua libre de nucleasas) para los primers forward y reverse por separado.
- ✓ Rotular un tubo eppendorf estéril de 1.5 MI, para cada uno de los multiplex a realizar.
- ✓ Prepara las reacciones del Multiplex I y II respectivamente, siguiendo las siguientes tablas. **Nota:** se debe tomar en cuenta la cantidad de muestras por cada reacción, se deben incluir los controles por duplicado, 6 controles (2 de cada control) por cada reacción multiplex.

La confirmación de la especie *C. difficile* y de la presencia de los genes de las toxinas se realiza por medio de dos PCRs multiplex (MPI y MPII en la siguiente tabla).

MPI		MPII	
Componente	Volumen (ul)	Componente	Volumen (ul)
2X Master Mix*	12,5	2X Master Mix*	12,5
<i>cdtB</i> F1/R1 (10 uM)	0,75	<i>tpi</i> F/R (10 uM)	1.25

<i>tcdA</i> F/R-A3B (10 uM)	0,75	( <i>pal</i> ) <i>tcdC</i> F-15/R-16 (10 uM)	0,50
<i>tcdB</i> F3/R4 (10 uM) 0.75			
Agua grado molecular	8,25	Agua grado molecular	8,75
ADN	2,00	ADN	2,00

**Tabla para el PCR Multiplex I y II según cantidad de muestras:**

Componentes	Número de Muestras				
	10	15	20	25	30
<b>Multiplex I</b>					
<i>cdtB</i> F/R	7.5 µl	11.25 µl	15 µl	18.75 µl	22.5 µl
<i>tcdA</i> F/R					
<i>tcdB</i> F/R					
Agua	82.5 µl	123.75 µl	165 µl	206.25 µl	247.5 µl
Mater Mix	125 µl	187.5 µl	250 µl	312.5 µl	375 µl
<b>Multiplex II</b>					
<i>tpi</i> F/R	5 µl	7.5 µl	10 µl	12.5 µl	15 µl
<i>pal</i> F/R ( <i>tcdC</i> )	12.5 µl	18.75 µl	25 µl	31.25 µl	37.5 µl
Agua	87.5 µl	131.25 µl	175 µl	218.75 µl	262.5 µl
Master Mix	125 µl	187.5 µl	250 µl	312.5 µl	375 µl

- ✓ Rotular un juego de tubos eppendorf estériles pequeños: blanco, escalera, controles dobles y muestras.
- ✓ A cada tubo eppendorf colocar 23 µl de la preparación, menos al tubo rotulado como escalera (E). Evitar la formación de burbujas,
- ✓ Agregar a cada tubo 2 µl de ADN correspondiente a cada tubo, menos a los tubos rotulados como escalera (E) y blanco (B).
- ✓ Asegurarse que todos los tubos estén bien cerrados y colocarlos en forma ordenada en el Termociclador.
- ✓ Seguir la siguiente programación:

#### Condiciones de PCR:

- ✓ 1 ciclo – 95 °C por 15 minutos
- ✓ 30 ciclos –
  - 94 °C por 30 segundos
  - 57 °C por 90 segundos
  - 72 °C por 60 segundos
- ✓ Extensión final – 72 °C por 7 minutos
- ✓ Hold – 4 °C.

Nota: idealmente se corre la electroforesis el mismo día, si esto no se puede, se mantiene a 4 °C para correr la electroforesis al día siguiente. Para más tiempo de conservación se almacena a -20 °C.

### Protocolo de corrida en gel de los PCRs de *C. difficile*:

- ✓ Asegurarse tener todo el material, reactivos y equipo necesario.
- ✓ Preparar un baño maría a 50 °C.
- ✓ Para cada reacción de multiplex se corre una electroforesis por separado, por lo que se requiere preparar dos geles.
- ✓ Armar el molde de la cámara electroforética, con respectivo peine.
- ✓ Prepare un gel al 1,5% de agarosa en buffer TBE 0.5X, en un Erlenmeyer de 250 ml, calentar en microondas hasta que la agarosa se funda por completo. Colocarla en el baño maría a 50 °C para que baje su temperatura.
- ✓ Chorrear la agarosa en el molde y esperar a que solidifique completamente.
- ✓ Colocar el buffer de corrida TBE 0.5X en cámara electroforética. Debe de cambiarse el buffer cada tres corridas, verter el volumen necesario para cubrir el gel.
- ✓ Se retira el peine del gel, y se coloca en la cámara con los pocillos en la izquierda.
- ✓ A cada tubo de reacción de PCR, añadir 2,5 µl de “loading dye” 6Xy mezclar bien.
- ✓ Al tubo de la escalera, agregar 5 µl de escalera.
- ✓ Cargar 10 µl de muestra en cada pocillo del gel. Seguir el ejemplo de la corrida.
- ✓ Para visualizar mejor las deleciones, cargar los controles en cada extremo del gel (izquierda y derecha).
- ✓ Usar un “Gen Ruler” de 50 bp en cada extremo del gel.
- ✓ Correr a 100V por 90 minutos.
- ✓ Transferir el gel en 400 ml de una solución de bromuro de etidio a 0,5 µg/ml por 30 minutos.
- ✓ Capturar la imagen mediante un fotodocumentador.
- ✓

### Ejemplo de la corrida:

Multiplex I									
B	E	A·B <sup>+</sup>	NAP 1	NAP 7	Muestra	Muestra	NAP 7	NAP 1	A·B <sup>+</sup>
Multiplex II									
B	E	A·B <sup>+</sup>	NAP 1	NAP 7	Muestra	Muestra	NAP 7	NAP 1	A·B <sup>+</sup>

**Referencias:** Laboratorio en Investigación de Bacteriología Anaerobia, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica. Quesada-Gómez y colaboradores (2015). Emergence of an outbreak-associated *Clostridium difficile* variant with increased virulence. *J Clin Microbiol*, 53(4), 1216-1226. doi: 10.1128/JCM.03058-14.

### Anexo 13. Determinación de pulsotipo de electroforesis por electroforesis en campo pulsante (PFGE).

<b>Universidad Nacional Autónoma de Honduras</b> <b>Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas</b> <b>Laboratorio Teasdale-Corti</b>		
Procedimiento Operativo Estándar para Determinación de pulsotipo por electroforesis en campo pulsante (PFGE).		Número de páginas
		11
Elaborado por: Fanny Hidalgo Villeda Fecha: Diciembre de 2015		Revisado por: Carlos Quesada Gómez

**Objetivo:** Obtener el patrón de macrorestricción de aislamientos de *Clostridium difficile*.

**Definición:** Se determina el patrón de macrorestricción mediante PFGE de cada uno de los aislamientos de *C. difficile* de acuerdo con el método descrito (Quesada-Gómez et al., 2015).

**Unidad de análisis:** Muestras de DNA.

**Reactivos y aislamientos:**

- ✓ ADN de *Clostridium difficile*
- ✓ Proteinasa K
- ✓ Gel de agarosa 1% (Bio-Rad® Pulse Field Certified Agarose)
- ✓ Gel de agarosa al 1% (Sea Kem® Gold Agarosa, for PFGE)
- ✓ SDS al 1%
- ✓ Smal (Roche®)
- ✓ bromuro de etidio
- ✓ Proteinasa K
- ✓ Agua milli Q entérril
- ✓ Buffer T.E 1X
- ✓ Buffer TBE 0.5X
- ✓ EDTA 0.5MN pH 8
- ✓ Lisosima, concentración final 2mg/ mL
- ✓ Tris HCL pH 8
- ✓ ARNasa, concentración final 20 µg/MI
- ✓ Enzima Xbal (Roche®)
- ✓ Enzima Smal (Roche®)
- ✓ Buffer PK
- ✓ Buffer A (para *Smal*)
- ✓ Buffer H (*Xbal*)
- ✓ Buffer de lisis de *Clostridium difficile*
- ✓ Buffer de lisis para *Salmonella*
- ✓ Thiourea, 100 mM
- ✓ ADN obtenido de una cepa *Salmonella* ser. Braenderup H9812

**Material y equipo:**

- ✓ Bata de Laboratorio
- ✓ Guantes
- ✓ Mascarilla
- ✓ Papel toalla
- ✓ Espátulas
- ✓ Pinzas
- ✓ Screen caps
- ✓ Tubos cónicos de 50mL
- ✓ Bisturí
- ✓ Baño maría
- ✓ Tubos eppendorf de 1,5 ml (estériles y libres de nucleasas)
- ✓ Microcentrifuga para tubos de 1.5ml y 0.2ml
- ✓ Incubadora
- ✓ Fotómetro
- ✓ Microondas
- ✓ refrigeradora
- ✓ Equipo CHEF-DRIII (Bio-Rad® Laboratories)
- ✓ software BioNumerics v4.6 (Applied Maths)
- ✓ Micropipeta 10-100 µl
- ✓ Micropipeta 100-1000 µl
- ✓ Puntas estériles para micropipetas

**Procedimiento:****Plugs de *Salmonella* ser. Braenderup H9812:****1. Preparación de los plugs de agarosa.**

- Preparar el baño de la ventana a 55 °C y el del cuarto de autoclaves a 54 °C a 175 rpm.
- Preparar agarosa: en una botella de vidrio con tapa de rosca de 100 ml, colocar 20 ml de buffer TE 1X con SDS al 1% (200 µL), agregar 0.2g de agarosa (SeaKem Gold PFGE agarosa) y fundir en el microondas del CIET

con intervalos de 5 segundos (igual que para los plugs de *C. difficile*), colocar en el baño de la ventana a 55 °C.

- Limpiar bien los moldes a utilizar para plugs con alcohol de 70<sup>0</sup>.
- Suspensión de células bacterianas: tomar un tubo cónico, colocarle 2ml de buffer de suspensión celular para PFGE, resuspender 2 a 4 colonias bacterianas (turbidez similar a tubo de la escala de McFarland 5).
- Llevar al fotómetro de Biotecnología del CIET para medir la densidad óptica de la suspensión bacteriana, colocando 200 µL en una cubeta de fondo estrecho limpia. No tocar la cubeta en los lados lisos y transparentes. Colocar el fotómetro en la opción #4 OD 600. Se coloca primero el blanco (buffer de suspensión), presionar Enter- Blank, luego se vortexea la suspensión, se coloca en la cubeta y se presiona Sample. La densidad óptica debe ser de 2.0, si esta no está en ese parámetro, ajustar agregando más bacterias o más buffer, todas las veces que se retira la suspensión de la cubeta para realizar una nueva medición.
- Sacar la proteinasa K, de la caja 1 del congelador a -20 °C.
- Tomar de 3-5 tubos Eppendorf de 1.5 mL estériles rotulados correctamente. Homogenizar el tubo con la suspensión bacteriana, agregar a cada tubo 150 µL de la suspensión.
- Agregar a cada tubo 10 µL de proteinasa K y homogenizar.

- Cerca del baño, mezclar 150  $\mu$ L de agarosa con el contenido de cada tubo Eppendorf, pipeteando rápidamente para evitar que la agarosa gelifique y tener cuidado de no hacer burbujas. **Nota:** En todo momento se mantiene la agarosa dentro del baño a 55  $^{\circ}$ C.
- Colocar 150  $\mu$ L de cada preparación a cada cuadro del molde de plugs, colocando la punta de la micropipeta en la esquina. **Nota:** no hacer burbujas de la agarosa en los moldes.
- Rotular los moldes plugs para distinguir el orden en que se colocaron los las muestras y anotar el orden de las mismas.
- Colocar los moldes con la agarosa en la refrigeradora unos 5-10 minutos para permitir que se solidifique. **Nota:** Los moldes con agarosa no se deben de dejar más de 30 minutos en la refrigeradora.
- Guardar la agarosa que sobre en la refrigeradora, tapada y rotulada. **Nota:** La agarosa no debe fundirse más de 3 veces.

## 2. Lisis celular.

- En tubos cónicos de 50 mL, colocar 10 mL de buffer de lisis para *Salmonella*.  
Nota: Este volumen es para 10-15 plugs aproximadamente.
- Agregar 25  $\mu$ L de proteinasa K a cada tubo. Nota: esta cantidad es para cada 2 plugs, hacer cálculos dependiendo de la cantidad de plugs del proceso.
- Incubar toda la noche los tubos con los plugs en el baño del cuarto de autoclavado a 55  $^{\circ}$ C a 175 rpm. **Nota:** Comienza el proceso de lisis.

### 3. Lavado.

- Verificar tener todo a utilizar: agua Milli Q autoclavada, buffer TE 1X, baño del cuarto de autoclavado en 50 °C.
- Colocar en el baño del cuarto de autoclavado en 50 °C, agua Milli Q autoclavada, buffer TE 1X.
- Lavar con alcohol de 70% los screen caps a utilizar.
- Colocar los screen caps a cada tubo con los plugs.
- En un beaker dentro de la cámara, descartar el buffer de lisis de cada tubo escurriendo con la screen cap.
- Agregar 15 mL de agua que está en el baño del cuarto de autoclavado en 50 °C, vertiéndola por el screen cap con una pipeta plástica desechable de 25 mL. Nota: verificar que los plugs no estén en las paredes del tubo ni en el screen cap. Se bota el agua y hacer otro enjuague igual, pero este se realiza por 10 minutos en el baño a 175 rpm, con las tapas puestas encima de los screen caps.
- Escurrir el agua, hacer el mismo procedimiento por 4 veces más, pero con el buffer TE 1X que se tiene en el baño. **Nota:** mantener entre cada lavado el buffer TE 1X dentro del baño.
- Rotular tubos Eppendorf de 1.5 mL autoclavados.
- Agregar a cada tubo Eppendorf 1 mL de buffer TE 1X.

- Con ayuda de una espátula metálica, transferir los plugs a los tubos Eppendorf. Nota: colocar dos plugs por tubo Eppendorf.
- Almacenar a 4 °C. **Nota:** los plugs duran almacenado 1 mes.

### **Plugs a partir de cepas de *Clostridium difficile*:**

#### **1. Preparación de los plugs de agarosa.**

- Preparar el baño de la ventana a 55 °C y el del cuarto de autoclaves a 54 °C a 175 rpm.
- Preparar agarosa: en una botella de vidrio con tapa de rosca de 100 ml, colocar 20 ml de buffer TE 1X con SDS al 1% (200 µL), agregar 0.2g de agarosa (SeaKem Gold PFGE agarosa) y fundir en el microondas del CIET con intervalos de 5 segundos (igual que para los plugs de *C. difficile*), colocar en el baño de la ventana a 55 °C.
- Tomar 1 mL de caldo BHI inoculados con la cepa de 8 – 10 horas, y colocarlo en tubos eppendorf de 1.5 mL, previamente rotulados. **Nota:** resuspender 2 a 4 colonias bacterianas (turbidez similar a tubo de la escala de McFarland 5).
- Centrifugar los tubos eppendorf por 2 minutos a 14,000 rpm, descartar el sobrenadante en un beaker dentro de la cámara.
- Agregar a cada tubo 150 µL de buffer de lisis de *Clostridium difficile* y mezclar en el vortex.

- Limpiar bien los moldes a utilizar para plugs con alcohol de 70<sup>0</sup>, marcar los moldes y anotar el orden en que se colocaran los plugs en un cuaderno.
- Cerca del baño, mezclar 150  $\mu$ L de agarosa con el contenido de cada tubo Eppendorf, pipeteando rápidamente para evitar que la agarosa gelifique y tener cuidado de no hacer burbujas. **Nota:** En todo momento se mantiene la agarosa dentro del baño a 55 <sup>0</sup>C.
- Colocar 150  $\mu$ L de cada preparación a cada cuadro del molde de plugs, colocando la punta de la micropipeta en la esquina. **Nota:** no hacer burbujas de la agarosa en los moldes.
- Rotular tubos eppendorf vacíos y estériles con los nombres de cada plug.
- Agregar a cada tubo eppendorf, 500  $\mu$ L de buffer de lisis de *C. difficile*, 50  $\mu$ L de lisosima (concentración final de 2mg/mL), 1  $\mu$ L de ARNasa (concentración final de 20  $\mu$ g/mL), 1.25  $\mu$ L de mutanolisina (concentración final de 12.5 U/mL).
- Agregar el plug correspondiente a cada tubo eppendorf con la mezcla anterior.
- Colocar los tubos eppendorf con los plugs y la mezcla en el baño maría a 37 <sup>0</sup>C por toda la noche.

## 2. Lisis celular y lavado.

- Remover el buffer.
- Agregar 495  $\mu\text{L}$  de buffer PK (concentración final de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y 5  $\mu\text{L}$  de proteinasa K (20mg/mL) a cada tubo. **Nota:** Los plugs no deben quedar secos por mucho tiempo.
- Incubar los tubos eppendorf con los plugs en el baño a 55  $^{\circ}\text{C}$  por 2 horas.
- Realizar siete lavados (2 enjuagues y 5 lavados)
- Agregar buffer TE 1X a cada tubo eppendorf con los plugs (2 veces) descartando el primer volumen.
- Agregar buffer TE 1X 4 veces (5, 10, 15 y 20 minutos) en agitación constante y descartando entre cada vez el volumen anterior.
- Agregar buffer TE 1X y dejar.
- Almacenar a 4  $^{\circ}\text{C}$ . **Nota:** los plugs duran almacenado 1 mes.

### **Procedimiento de corrida de PFGE:**

#### **1. Digestión**

- Sacar un juego de espátulas, una hoja de bisturí.
- Sacar del congelador, enzimas XbaI y SmaI, buffer A (SmaI), buffer B (XbaI) y mantener en frío.
- Colocar la hoja de bisturí, espátulas, 2 placas Petri estériles y abiertas en luz UV de 10 a 15 minutos.

- Sacar en una gradilla de la refrigeradora los plugs de *Salmonella* y *Clostridium difficile*.
- Sacar y rotular respectivamente tubos eppendorf de 1.5 mL.
- Colocar 100  $\mu$ L de buffer para *Salmonella* dentro de los tubos eppendorf rotulados con *Salmonella*. Nota: son tres controles de *Salmonella*.
- Colocar 100  $\mu$ L de buffer para *Clostridium difficile* dentro de los tubos eppendorf rotulados con *C. difficile*.
- Agregar medio o un plug de *Salmonella* al tubo eppendorf correspondiente.
- Colocar medio plug de *Clostridium difficile* en el tubo eppendorf correspondiente. **Nota:** los plugs se cortan simétricamente por la mitad con la hoja de bisturí dentro de la placa Petri estéril, y el medio plug sobrante se regresa con la espátula al tubo eppendorf original.
- Realizar un lavado con el buffer correspondiente.
- Agregar 1  $\mu$ L de la enzima (40 unidades) correspondiente a cada tubo eppendorf. **Nota:** plugs de *Salmonella* (*Xba*I), plugs de *C. difficile* (*Sma*I).
- Incubar toda la noche. **Nota:** plugs de *Salmonella* (37°C), plugs de *C. difficile* (25°C).

## 2. Corrida.

- Llevar Thiourea PFGE a 100mM y buffer TBE 0.5X al cuarto donde se encuentra el equipo de electroforesis CHEF-DRIII (Bio-Rad® Laboratories).
- Colocar en la cámara de electroforesis 2 litros de buffer TBE 0.5X, tapar la cámara, encender el módulo principal y el módulo cooling, verificar que quede a 14°C.

- Agregar en la cámara de electroforesis 1 mL de Thiourea de 100Mm.
- Programar corrida electroforética: apretar botones **1 y 2** (block volts, CM) que debe quedar en 1, luego apretar botones **2 y 3** (volts y CM) que debe quedar en 40, seguidamente apretar el botón **2** (volts/CM) que debe quedar en 6, para finalizar apretar el botón **3** (run time, HRS) que debe quedar en 21 horas.
- Preparar agarosa: 1 g de agarosa (Bio-Rad® Pulse Field Certified Agarose), disolver la agarosa en 100 mL de buffer TBE 0.5X y fundir en el microondas cada 5 segundos. **Nota:** para evitar que se solidifique la agarosa, debe mantenerse en el baño maría a 50°C hasta ser utilizada.
- Limpiar con alcohol a 70<sup>0</sup> la cámara de flujo laminar y colocar dentro: papel lente, guantes espátulas y los plugs a utilizar.
- Limpiar la cámara de flujo laminar con lockout de Sigma, para eliminar ADNasas.
- Limpiar todo a utilizar con el papel lente.
- Armar la base para el gel, ubicar los peines hacia arriba y colocar los plugs en los peines respectivos, seguir el siguiente esquema:

<i>Salmonella</i>	MX	MX	MX	<i>Salmonella</i>	MX	MX	MX	MX	<i>Salmonella</i>
-------------------	----	----	----	-------------------	----	----	----	----	-------------------

**Nota:** Asegurarse de escurrir bien el buffer sobrante de cada plug y acomodarlos bien en el peine.

- Chorrear la agarosa en la base y dejar solidificar.
- Quitar el peine, poner la base con la agarosa y los plugs en la cámara electroforética.

- Verificar la programación de la cámara electroforética y presionar el botón de start. **Nota:** verificar que las mangueras que unen los diferentes módulos de la cámara electroforética no tengan burbujas.

### 3. Lectura de PFGE:

- Sacar el gel y limpiar bien la cámara electroforética.
- Teñir el gel con bromuro de etidio y se foto documentan usando ChemiDoc™ XRS.
- Con las fotos obtenidas del gel, hacer en Power Point una presentación donde se indique el número de cada pocito y en una leyenda colocar a que muestra pertenece cada pocito.
- Analizar con el software BioNumerics v4.6 (Applied Maths) con las bases de datos del National Microbiology Laboratory of Canadá, Public Health Agency.
- Un aislamiento reproducible de *C. difficile* se incluye en cada corrida electroforética. Además, como control estándar se utiliza ADN obtenido de una cepa Salmonella ser. Braenderup H9812.

### Referencias:

Quesada-Gómez, C., López-Urena, D., Acuna-Amador, L., Villalobos-Zúniga, M., Du, T., Freire, R., Chaves-Olarte, E. (2015). Emergence of an outbreak-associated *Clostridium difficile* variant with increased virulence. *J Clin Microbiol*, 53(4), 1216-1226. doi: 10.1128/JCM.03058-14. (Quesada-Gómez et al., 2015).

## Anexo 14. Toxinotipificación

<b>Universidad Nacional Autónoma de Honduras</b> <b>Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas</b> <b>Laboratorio Teasdale-Corti</b>		
Procedimiento Operativo Estándar para Determinación de Toxinotipo de cepas de <i>Clostridium difficile</i> .		Número de páginas
		4
Elaborado por: Fanny Hidalgo Villeda Fecha: octubre 2016	Revisado por: César Rodríguez	

**Objetivo:** Determinar el toxinotipo de cepas de *Clostridium difficile*.

**Definición:** Se amplifican el segmento B1 de la toxina B y el segmento A3 de la toxina A.

**Unidad de análisis:** Muestras de DNA.

### Reactivos y aislamientos:

- ✓ Caldos BHI de 8 horas inoculados con las cepas
- ✓ ADN de *Clostridium difficile*
- ✓ Gel de agarosa al 1%
- ✓ buffer de lisis
- ✓ Lisozima
- ✓ ARNasa
- ✓ Kit QUIAGEN-DNeasy® Blood & Tissue (50)
- ✓ proteinasa K
- ✓ etanol puro
- ✓ agarosa
- ✓ buffer TAE 1X
- ✓ Gel red 3x

### Material y equipo:

- ✓ Bata de Laboratorio
- ✓ Guantes
- ✓ tubos eppendorf de 1.5 ml
- ✓ Mascarilla
- ✓ Papel toalla
- ✓ Micropipeta 0.5-10 µl
- ✓ Micropipeta 10-100 µl
- ✓ Micropipeta 100-1000 µl
- ✓ baños secos a (37°C y 56°C)
- ✓ campana de flujo laminar

- ✓ Puntas estériles para micropipetas
- ✓ Cámara electroforética
- ✓ Centrifuga
- ✓ software GeneiousR10

En este estudio, se escogieron tres cepas una cepa representante por cada patrón de macrorestricción, para el patrón 0461 la cepa HON11, para el patrón 1056 la cepa HON10, para el patrón 1057 la cepa HON06 para secuenciar su genoma completo y así determinar su toxinotipo in silico.

**Procedimiento extracción de ADN utilizando un Kit comercial (QUIAGEN-DNeasy® Blood & Tissue Kit):**

- ✓ Sacar de la cámara de anaerobiosis los caldos BHI de 8 horas inoculados con las cepas HON06.HON10 y HON11.
- ✓ Preparar dos baños secos (37°C y 56°C)
- ✓ Abrir y preparar la campana de flujo laminar y rotular los tubos eppendorf de 1.5 ml con los códigos de las cepas.
- ✓ Colocar a cada tubo eppendorf 1,400 µl del caldo BHI de la cepa correspondiente.
- ✓ Centrifugar 10,000 rpm, 3 minutos.
- ✓ Descartar el sobrenadante, dejar solo el pellet
- ✓ Agregar a cada tubo eppendorf 250 µl de buffer de lisis con lisozima fresca (3.750 de buffer de lisis más 188mg de lisozima) y vortexear.
- ✓ Agregar a cada tubo eppendorf 5 µl de ARNasa y vortexear.
- ✓ Colocar los tubos eppendorf en el baño seco a 37°C por 30 minutos.

- ✓ Sacar el Kit **QUIAGEN-DNeasy® Blood & Tissue (50)**
- ✓ Agregar a cada tubo eppendorf 250 µl de buffer AL del kit.
- ✓ Colocar los tubos eppendorf en el baño seco a 37°C por 30 minutos (vortexear cada 10 min)
- ✓ Agregar a cada tubo eppendorf 20 µl de proteinasa K
- ✓ Colocar los tubos eppendorf en el baño seco a 56°C por 1 hora.
- ✓ Agregar a cada tubo eppendorf 200 µl de etanol puro y mezclar por inversión 10 veces.
- ✓ Trasladar todo el contenido de los tubos eppendorf a las columnas previamente rotuladas.
- ✓ Centrifugar 8,000 rpm por 1 minuto; descartar lo que pase por las columnas (sobrenadante) y volver a colocar la columna en el tubo (hacer este procedimiento dos veces).
- ✓ Agregar 500 µl de buffer AW1 y centrifugar 8,000 rpm por 1 minuto; descartar lo que pase por las columnas (sobrenadante) y volver a colocar la columna en el tubo.
- ✓ Centrifugar la columna sin nada 10,000 rpm por 3 minuto
- ✓ Poner a calentar el buffer AE
- ✓ Pasar la columna a un tubo eppendorf previamente rotulado con: número de la muestra, gDNA y fecha.
- ✓ Agregar 200 µl de buffer AE y dejar reposar por 1 minuto.
- ✓ Cargar el eluido nuevamente en la columna y centrifugar 10,000 rpm por 1 minuto.
- ✓ Separar la columna del tubo y descartarla.

- ✓ Preparar un gel de agarosa al 1% con buffer TAE 1X
- ✓ Preparar la cámara y chorrear el gel
- ✓ Medir las extracciones en el Nano Drop y anotar las concentraciones de cada una de ellas.
- ✓ Preparar 2 µl de Gel red 3x más 5 µl de las extracciones de ADN y preparar la escalera.
- ✓ Cargar el gel y correr 90v por 1 hora.
- ✓ Capturar imagen con un fotodocumentador.
- ✓ Conservar los tubos eppendorf a -20 °C hasta su uso.
- ✓ Enviar el ADN fue enviado vía FedEx a MicrobesNG en el Reino Unido para su secuenciación.
- ✓ Al obtener la secuencia completa de cada cepa, ingresar las secuencias al software GeneiousR10, poner a digerir in silico con las enzimas; para los dos fragmentos para A3 (*EcoRI*, 1403 bp+ 1688 bp) y para los dos 2 fragmentos para B1 (*HincII* sí, 1681 bp + 1408 bp), obteniendo finalmente un gel virtual.

## Anexo 15. Ensayos de citotoxicidad y determinación del efecto citopático.

<b>Universidad Nacional Autónoma de Honduras</b> <b>Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas</b> <b>Laboratorio Teasdale-Corti</b>		
Procedimiento Operativo Estándar para la determinación de títulos de citotoxicidad de cepas de <i>Clostridium difficile</i> .		Número de páginas
		2
Elaborado por: Fanny Hidalgo Villeda Fecha: noviembre 2016	Revisado por: Carlos Quesada Gómez	

**Objetivo:** Determinar los títulos de citotoxicidad de cepas de *Clostridium difficile*.

**Definición:** Se usan células HeLa para determinar los aislamientos que presentan el efecto citopático (CPE) variante y determinar los títulos de citotoxicidad de cada una de cada una de las cepas.

**Unidad de análisis:** Fragmento de toxina A y B.

### Reactivos y aislamientos:

- ✓ Células HeLa
- ✓ DMEM
- ✓ suero bovino fetal al 5%
- ✓ *tcdB*-antisuero específico (TechLab, Blacksburg, VA)

### Material y equipo:

- ✓ Bata de Laboratorio
- ✓ Guantes
- ✓ Mascarilla
- ✓ Papel toalla
- ✓ Micropipeta 10-100  $\mu$ l
- ✓ Micropipeta 100-1000  $\mu$ l
- ✓ Puntas estériles para micropipetas
- ✓ microscopio invertido

### **Procedimiento:**

- ✓ Inocular los sobrenadantes de 24 horas en diluciones seriadas decimales hasta 10<sup>-12</sup> en monocapas de cultivo celular de células HeLa cultivadas en DMEM suplementado con suero bovino fetal al 5%.
- ✓ El CPE se determina por deformación redondeada con ramificaciones para el efecto clásico arborizante o por deformación más marcadamente redondeada sin ramificaciones para el efecto variante, mediante la observación en un microscopio invertido.
- ✓ Utilizar *tcdB*-antisuero específico (TechLab, Blacksburg, VA) para neutralizar el efecto de la toxina.
- ✓ El título de citotoxicidad será establecido como la máxima dilución positiva en la que se presente un efecto citopático.
- ✓ Reportar el título de citotoxicidad como el promedio  $\pm$  desviación estándar de los resultados de los experimentos en células HeLa por triplicado.
- ✓ Reportar el CPE<sub>50%</sub> (que se establece como el inverso de la dilución en la que se afecta a un 50% de las células) de cada una de las cepas en estudio, evaluando así en porcentajes la presencia del CPE en la monocapa del cultivo celular de HeLa

### **Referencias:**

Quesada-Gómez, C., López-Urena, D., Acuna-Amador, L., Villalobos-Zúniga, M., Du, T., Freire, R., Chaves-Olarte, E. (2015). Emergence of an outbreak-associated *Clostridium difficile* variant with increased virulence. *J Clin Microbiol*, 53(4), 1216-1226. doi: 10.1128/JCM.03058-14. (Quesada-Gómez et al., 2015).

## Anexo 16. Pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos

<b>Universidad Nacional Autónoma de Honduras</b> <b>Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas</b> <b>Laboratorio Teasdale-Corti</b>		
Procedimiento Operativo Estándar para la determinación de susceptibilidad a los antimicrobianos de cepas de <i>Clostridium difficile</i> .		Número de páginas
		2
Elaborado por: Fanny Hidalgo Villeda Fecha: Diciembre de 2015	Revisado por: Carlos Quesada Gómez.	

**Objetivo:** Determinar la susceptibilidad a los antimicrobianos de cepas de *Clostridium difficile*.

**Definición:** Determinar las MIC's de clindamicina, ciprofloxacina, moxifloxacina, vancomicina, rifampicina, linezolid, levofloxacina, tetraciclina y metronidazol mediante el uso de tiras E-test® (AB bioMérieux) según los lineamientos establecidos (M11-A7, M100-S21). cepas de *Clostridium difficile*.

**Unidad de análisis:** Cepas de *Clostridium difficile*.

### Reactivos y aislamientos:

- ✓ Cepas de *Clostridium difficile*
- ✓ tiras E-test® de Clindamicina
- ✓ tiras E-test® de ciprofloxacina
- ✓ tiras E-test® de moxifloxacina
- ✓ tiras E-test® de vancomicina
- ✓ tiras E-test® de rifampicina
- ✓ tiras E-test® de linezolid
- ✓ tiras E-test® de metronidazol
- ✓ tiras E-test® de levofloxacina
- ✓ tiras E-test® de tetraciclina
- ✓ tiras E-test® de tigeciclina
- ✓ tiras E-test® de cefoxitina
- ✓ agar Brucella con 5% de sangre
- ✓ vitamina K
- ✓ hemina
- ✓ Escala 3 MacFarland
- ✓ cepa *C. difficile* ATCC® 700057

### Material y equipo:

- ✓ Bata de Laboratorio
- ✓ Guantes
- ✓ Mascarilla

- ✓ Papel toalla
- ✓ Hisopos estériles
- ✓ Incubadora
- ✓ Bolsas y jarras de anaerobiosis
- ✓ lineamientos del CSLI (M11-A7, M100-S21, 2011).

#### **Procedimiento:**

- ✓ Realizar una suspensión de la bacteria (equivalente a 3 MacFarland), a partir de sus colonias crecidas en agar Brucella durante 18-24 horas a 37°C en anaerobiosis (90% N<sub>2</sub>, 5% H<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>; Bactron II, Shell Lab®)
- ✓ Extender la suspensión en tres direcciones sobre la placa de agar Brucella con 5% de sangre, vitamina K (1 ug/ml), hemina (5 ug/ml) y con 4 mm de espesor (Agar E-test).
- ✓ Colocar las tiras del antibiótico en los 5 minutos siguientes; como control se emplea la cepa *C. difficile* ATCC® 700057.
- ✓ Incubar las placas inoculadas en anaerobiosis por 48 horas a 37°C.
- ✓ Interpretar los resultados de acuerdo a los lineamientos del CSLI (M11-A7, M100-S21, 2011), obteniendo las concentraciones mínimas inhibitorias para cada antimicrobiano.

#### **Referencias:**

Quesada-Gómez, C., López-Ureña, D., Acuna-Amador, L., Villalobos-Zúniga, M., Du, T., Freire, R., Chaves-Olarte, E. (2015). Emergence of an outbreak-associated *Clostridium difficile* variant with increased virulence. *J Clin Microbiol*, 53(4), 1216-1226. doi: 10.1128/JCM.03058-14. (Quesada-Gómez et al., 2015).

## Anexo 17. Detección de los genes *tetM* y *cfr*

<b>Universidad Nacional Autónoma de Honduras</b> <b>Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas</b> <b>Laboratorio Teasdale-Corti</b>		
<b>Procedimiento Operativo Estándar para la detección de los genes <i>tetM</i> y <i>cfr</i></b>		Número de páginas <hr/> 5
Elaborado por: Fanny Hidalgo Villeda Fecha: septiembre de 2016	Revisado por: César Rodríguez Aprobado por: César Rodríguez	

**Objetivo:** Amplificar fragmento DNA de los genes *tetM* y *cfr* por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), a partir de DNA extraído de aislamientos de *Clostridium difficile*.

**Definición:**

En la reacción de PCR, se determina la presencia de los genes *tetM* y *cfr* como posible explicación de resistencia fenotípica a tetraciclina y linezolid en *Clostridium difficile*.

**Unidad de análisis:** Muestras de DNA de *Clostridium difficile*.

**Reactivos y aislamientos:**

- ✓ Agua grado molecular
- ✓ ADN (extracción del ADN de *Clostridium difficile* usando InstaGene Matrix® de Biorad).
- ✓ Primer *TetM*
- ✓ Primer *TetMR*
- ✓ Primer *cfr*- cd- exF
- ✓ Primer cd- ex- R
- ✓ gel al 1,5% de agarosa
- ✓ buffer TBE 0.5X.
- ✓ bromuro de etidio a 0,5 ug/ml ó Gelred 3x
- ✓ Alcohol al 70%
- ✓ Control negativo de amplificación (cepa R- 20291, NAP1, A<sup>+</sup>B<sup>+</sup> con delección de 18 pb en *tcdC*, CDT<sup>+</sup> y *cfr*<sup>-</sup>).
- ✓ Control positivo de amplificación (Cepa HON08, NAP1, A<sup>+</sup>B<sup>+</sup> con delección de 18 pb en *tcdC*, CDT<sup>+</sup> y *cfr*<sup>+</sup>).
- ✓ Control positivo de amplificación (Cepa NAPCR 5701, A<sup>+</sup>B<sup>+</sup> con *TetM*).

**Material y equipo:**

- ✓ Bata de Laboratorio
- ✓ Guantes
- ✓ Mascarilla
- ✓ Papel toalla
- ✓ Erlenmeyer
- ✓ Tubos eppendorf de 1,5 ml (estériles y libres de nucleasas)

- ✓ Microcentrifuga para tubos de 1.5ml y 0.2ml
- ✓ Termociclador
- ✓ Cámara electroforética
- ✓ Micropipeta 10-100 µl
- ✓ Micropipeta 100-1000 µl
- ✓ Puntas con filtro estériles para micropipetas
- ✓ Microondas
- ✓ Marcador indeleble.
- ✓ Gradilla para tubos eppendorf
- ✓ Baño maría

### Primers:

Nombre	Secuencia	Gen	Tamaño producto (bp)
<i>cfr-cd-exF</i>	5'- TCC TCT ACG GCA AAC AAA CC-3'	<i>cfr</i>	1200
<i>cd-ex -R</i>	5'- GCT CCA CTT GAG TGA TGC CTA-3'		
<i>TetMI</i>	5'- ACA CGC CAG GAC ATA TGG AT-3'	<i>TetM</i>	529
<i>TetMR</i>	5'- ATT TCC GCA AAG TTC AGA CG-3'		

### Procedimiento:

#### 1. Preparación de primers:

- ✓ Verificar tener todo el material, reactivos y equipos disponibles.
- ✓ Limpiar la cámara de flujo laminar, micropipetas con alcohol al 70%.
- ✓ Centrifugar cada tubo a 10,000 rpm por 2 minutos.
- ✓ Preparar un stock a 100 mM: del número de nmoles de cada tubo de primer liofilizado multiplicar por 10 y colocar esa cantidad de agua PCR. **Ejemplo:** # del tubo= 20.49 nmol, colocar 205 µl de agua PCR.
- ✓ Colocar los tubos en el Thermo Mixer a 55 °C, 850 rpm por 5 minutos.
- ✓ Centrifugar 2 minutos.
- ✓ Preparar solución de trabajo mediante dilución 1:10 del stock 100 mM en tubos eppendorf de 1.5 mL, con volumen final de 30 µl. Agregar 3µl del stock más 27µl de agua PCR.
- ✓ Se pueden utilizar los primers inmediatamente o guardar a – 20 °C hasta su uso.

#### 2. Reacción de PCR

- Verificar tener todo el material, reactivos y equipos disponibles.
- Limpiar la cámara de flujo laminar, micropipetas con alcohol al 70%.
- Con anticipación se descongelan en hielo o a 4 °C los primers, control y ADN.
- Una vez descongelado el ADN, centrifugar 1 minuto a 14,000 rpm para que todo el volumen se vaya al fondo del tubo.
- Colocar los primers, ADN, controles, micropipetas, puntas, tubos eppendorf y tubos para PCR dentro de la cámara de flujo laminar.
- Rotular un tubo eppendorf estéril de 1.5 ml, como reacción cfr.
- Prepara la reacción de PCR, siguiendo las siguientes tablas. **Nota:** se debe tomar en cuenta la cantidad de muestras por cada reacción, se deben incluir además el control positivo, negativo, y el blanco de reacción.

**Tabla de reacción de PCR para UNA amplificación de *tetM* y *cfr* de *Clostridium difficile*:**

Componente	Volumen (µl)
2X Master Mix*	12,5
Primer forward	0,75
Primer reverse	0,75
Agua grado molecular	9,0
ADN	2,0
Volumen final	25

**Tabla para el PCR según cantidad de muestras:**

Componentes	Número de Muestras				
	04	07	10	15	20
Primer forward para <i>tetM</i> o <i>cfr</i>	3 µl	5,25 µl	7.5 µl	11,25 µl	15 µl
Primer reverse para <i>tetM</i> o <i>cfr</i>					
Agua grado molecular	36 µl	63 µl	90 µl	135 µl	180 µl
Mater Mix	50 µl	87,5 µl	125 µl	187,5 µl	250 µl

- Rotular un juego de tubos de PCR 0.2 ml de capacidad estériles: blanco, control positivo, control negativo, y muestras.
- A cada tubo eppendorf colocar 23 µl de la preparación. **Nota:** evitar la formación de burbujas,
- Agregar 2 µl de ADN correspondiente a cada tubo, Asegurarse que todos los tubos estén bien cerrados y colocarlos en forma ordenada en el Termociclador.
- Seguir la siguiente programación:

**Condiciones de PCR para el gen *cfr*:**

- 1 ciclo – 94 °C por 5 minutos
- 30 ciclos –
  - 94 °C por 30 segundos
  - 52 °C por 30 segundos
  - 72 °C por 60 segundos
- Extensión final – 72 °C por 5 minutos
- Hold – 4 °C.

**Condiciones de PCR para los genes *tetM*:**

- 1 ciclo – 94 °C por 5 minutos
- 30 ciclos –
  - 94 °C por 30 segundos
  - 50 °C por 30 segundos
  - 72 °C por 60 segundos
- Extensión final – 72 °C por 5 minutos
- Hold – 4 °C.

**Nota:** idealmente se corre la electroforesis el mismo día, si esto no se puede, se mantiene a 12°C para correr la electroforesis al día siguiente. Para más tiempo de conservación se almacena a -20 °C.

**Protocolo de corrida en gel del PCR para los genes *tetM* y *cfr* de *C. difficile*:**

- ✓ Asegurarse tener todo el material, reactivos y equipo necesario.
- ✓ Preparar un baño maría a 50 °C.
- ✓ Armar el molde de la cámara electroforética, con respectivo peine.
- ✓ Prepare un gel al 1,5% de agarosa en buffer TBE 0.5X, en un erlenmeyer de 250 ml, calentar en microondas hasta que la agarosa se funda por completo.
- ✓ Colocarla en el baño maría a 50 °C para que baje su temperatura.
- ✓ Chorrear la agarosa en el molde y esperar a que solidifique completamente.
- ✓ Colocar el buffer de corrida TBE 0.5X en cámara electroforética. Debe de cambiarse el buffer cada tres corridas, verter el volumen necesario para cubrir el gel.
- ✓ Se retira el peine del gel, y se coloca en la cámara con los pocillos cerca del ánodo (rojo).
- ✓ Mezclar 5 ul de producto de PCR con 2 µl de “gel red” 3X y mezclar bien.
- ✓ Cargar en un pocillo terminal 5 µl de la escalera (100 pb, Fermentas).
- ✓ Cargar las muestras. Seguir el ejemplo de la corrida.
- ✓ Correr a 100V por 90 minutos.
- ✓ Capturar la imagen mediante un fotodocumentador.

**Ejemplo de la corrida:**

B	E	Control +	Control -	Muestra	Muestra
---	---	-----------	-----------	---------	---------

## Anexo 18. Ficha de bioseguridad



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE HONDURAS  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE MICROBIOLOGÍA  
MAESTRÍA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS**

### FORMULARIO DE BIOSEGURIDAD PROMOCIÓN 2015-2017

Si tiene alguna consulta o requiere asistencia para completar este formulario, favor contactar a la Oficial de Bioseguridad de la MEIZ al correo electrónico <lourdesenriquez10@gmail.com>

Datos Generales	
<b>Nombre de proyecto:</b> "Caracterización molecular y epidemiológica de las cepas de <i>Clostridium difficile</i> aisladas de pacientes hospitalizados en el Instituto Hondureño de Seguridad Social y el Hospital Escuela Universitario, Tegucigalpa, Honduras. Febrero 2015 - junio 2016".	<b>Departamento o unidad ejecutora:</b> Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas, Escuela de Microbiología, UNAH.
<b>Alumno (s) responsable de la investigación:</b>  Fanny Hidalgo Villeda	<b>Asesor (s) responsable:</b>  Edgardo Tzoc, MSc.
<b>Laboratorio (s) en que se llevará a cabo la investigación:</b> 1. Laboratorio Teasdale – Corti, Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas, Escuela de Microbiología, UNAH. 2. Laboratorio de Investigación en Bacteriología Anaerobia	<b>Instituciones participantes:</b> 1. UNAH 2. LIBA, UCR

(LIBA), Universidad de Costa Rica (UCR), Costa Rica.	
Naturaleza de la Investigación	
<p><b>Nombre de los agentes infecciosos que manipulará:</b></p> <hr/> <p style="text-align: center;"><i>Clostridium difficile</i></p> <hr/> <p><b>Toda muestra biológica se considera potencialmente infecciosa por lo que deberán tratarse como si lo estuvieran</b></p> <hr/> <p>¿Cuenta con las hojas de seguridad (MSDS) impresas de los agentes que manipulará?</p> <p>Sí <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/></p>	<p><b>¿En que nivel de riesgo están clasificados Los agentes infecciosos que manipulará?</b></p> <p>1 <input type="checkbox"/> 2 <input checked="" type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/></p> <p>¿Cuál es el nivel de bioseguridad con que trabaja el laboratorio en el que desarrollará la investigación?</p> <p>1 <input type="checkbox"/> 2 <input checked="" type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/></p>
<p>¿Utilizará reactivos químicos?</p> <p>Si <input checked="" type="checkbox"/> o <input type="checkbox"/></p> <p>Enumere las sustancias químicas que utilizará con mayor frecuencia</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Etanol al 96%</li> <li>2. Glicerol</li> <li>3. buffer TBE 0.5X</li> <li>4. Proteinasa K</li> <li>5. Smal (Roche®)</li> <li>6. Aceite mineral</li> <li>7. TMA</li> </ol>	<p>¿Cuenta con las hojas de seguridad (MSDS) de los reactivos químicos que utilizará?</p> <p>Si <input type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/></p> <p><b>Revisar las MSDS de cada reactivo y comentar su riesgo potencial y las medidas básicas de seguridad si es necesario</b></p>

8. Taq-polimerasa 9. dNTP 10. PBS 1X. 11. Agarosa 12. Bromuro de etidio	
<p>¿En que estado manipulará el o los agentes infecciosos?</p> <p>Cultivos puros en placa <input checked="" type="checkbox"/> Cultivos en tubo <input checked="" type="checkbox"/> ADN <input checked="" type="checkbox"/></p> <p>Cultivo de tejidos <input type="checkbox"/> Otros <input type="checkbox"/></p> <p><b>No Aplica</b></p>	
<p>Tipo de muestras que manipulará</p> <p>Tejidos <input type="checkbox"/></p> <p>Sangre <input type="checkbox"/></p> <p>Orina <input type="checkbox"/></p> <p>Animales <input type="checkbox"/></p>	<p>Heces <input checked="" type="checkbox"/></p> <p>Otros líquidos biológicos <input type="checkbox"/></p> <p>Muestras ambientales <input type="checkbox"/></p> <p>Cultivos puros <input checked="" type="checkbox"/></p> <p>Otras</p> <p>_____</p> <p>*Tipo de muestras ambientales</p> <p>_____</p> <p>_____</p>
<p><b>Describe las técnicas que utilizará:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Detección de toxinas A y B</li> </ul>	

- Cultivo de la muestra en agar CCFA y agar BAK.
- Extracción de ADN.
- PCR Multiplex para la detección de genes tcdA, tcdB, tcdC, ctdB y tpi
- Electroforesis de campo pulsado
- Toxinotipificación
- Ensayos de citotoxicidad y determinación del efecto citopático
- Pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos

### CONTROLES PRIMARIOS

#### Controles de Ingeniería

¿El laboratorio en que desarrollará la investigación cuenta con cabina de seguridad biológica?

Si

Si su respuesta es negativa ¿Cómo suplirá esta carencia?

---



---

¿El laboratorio en que desarrollará la investigación cuenta con autoclave dentro del laboratorio?

Si

Si su respuesta es negativa ¿Cómo suplirá esta carencia?

---



---

¿El laboratorio en que desarrollará la investigación cuenta con campana de seguridad química?

Si

Si su respuesta es negativa ¿Cómo suplirá esta carencia?

---



---

¿El laboratorio en que desarrollará la investigación cuenta con espacio adecuado para realizar la investigación?

Si

Si su respuesta es negativa ¿Cómo suplirá esta carencia?

---



---

#### Equipo de Protección Personal (EPP)

¿Qué tipo Equipo y materiales de protección personal usará en su investigación?

Gabacha bioseguridad

Guantes

Cabina

Mascarilla quirúrgica

Mascarilla N95

Lentes

### Procedimientos Operativos Estándar (POE)

¿Cuenta con los POE`s siguientes?	Si	No	No aplica
1.- Toma de muestras	<b>X</b>		
2.- Manejo de desechos bioinfecciosos	<b>X</b>		
3.- Transporte de muestras	<b>X</b>		
4.- Uso de la CSB	<b>X</b>		
5.- Almacenamiento de muestras	<b>X</b>		
6.- Puesta y quitado de EPP	<b>X</b>		
7.- Limpieza de derrames	<b>X</b>		
8.-Otro:			

### Controles Administrativos

	Si	No	No aplica
1.- ¿Ha recibido entrenamiento para el uso de la CSB?	<b>X</b>		
2.- ¿Ha recibido entrenamiento para el uso del autoclave?	<b>X</b>		

3.- ¿Ha recibido entrenamiento para puesta y quitado de EPP?	X		
4.- ¿Ha recibido entrenamiento para limpieza de derrames?	X		
5.- ¿Ha sido vacunado contra la Hepatitis B?	X		
6.- ¿Ha recibido entrenamiento para el uso de la campana de seguridad química?	X		
7.- ¿Conoce las características químicas de los reactivos que utilizará en la investigación	X		
8.- Otros			

Este formulario será remitido la Oficial de Bioseguridad de la MEIZ, quien tendrá a su cargo asegurarse de que el proyecto sea implementado con las normas de seguridad biológica apropiadas para el nivel de riesgo. **La presentación de este formulario es requisito obligatorio antes de la aprobación del protocolo de investigación ( Seminario de Tesis II).**

Para uso exclusivo de la MEIZ. UNAH

Fecha de presentación (dd/mm/aaaa)	Nombre y firma de quien revisó	Observaciones

<sup>i</sup> Revisión 2015.MC/LE