



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE MEDICINA

PROGRAMA EDUCATIVO:

LICENCIATURA EN BIOMEDICINA

TESIS PROFESIONAL

“DETECCIÓN DE *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* EN PORTADORES
ASINTOMÁTICOS”

PARA OBTENER EL TITULO DE LICENCIATURA EN BIOMEDICINA

PRESENTA

MERCEDES URIYAH VELAZQUEZ ROMERO

DIRECTOR EXPERTO:

DC. CLAUDIA FABIOLA MARTÍNEZ DE LA PEÑA

REVISORES:

D.C. MARGARITA MARIA DE LA PAZ ARENAS HERNANDEZ

M.C. ALEJANDRA PAULA ESPINOSA TEXIS

FECHA TESIS:

MARZO, 2021

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS

COORDINADOR: DC. CELSO ENRIQUE CORTES ROMERO

COORDINACIÓN DE TITULACIÓN Y EFICIENCIA TERMINAL

Agradecimientos

Quiero agradecer a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y al Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas (CICM) por el apoyo otorgado en este trabajo y por formar parte de mi desarrollo profesional.

Agradezco a Dios por permitirme la vida y ser mi fortaleza en cada momento.

Gracias a mis padres por ser las principales personas que me impulsaron y guiaron para seguir mis sueños, agradezco su amor y apoyo.

A Josué por ser el mejor hermano y siempre contar con tu apoyo incondicional.

A Julio por estar a mi lado, escucharme siempre con cariño y comprensión.

A la Dra. Claudia por darme la oportunidad para desarrollar este proyecto, gracias por sus enseñanzas, consejos y calidad humana.

A la Dra. Margarita gracias por sus enseñanzas en el aula y en el laboratorio, sobre todo agradezco su comprensión y apoyo en la revisión de este trabajo.

A la Maestra Alejandra gracias por su apoyo en la revisión de este trabajo y su amabilidad.

A todos mis compañeros del laboratorio de Biología molecular de enteropatógenos.

A Nancy por su apoyo y compañía durante este trabajo.

A mis compañeros y amigos de licenciatura Marco, Dani y Monse por hacer muy grato este caminar juntos.

A mis amigos Elisa, Miguel, Alejandro, Guadalupe, Enrique y Karen por su amistad y siempre animarme.

Agradezco también a toda mi familia en general por sus palabras de ánimo, consejos y todo el amor que me brindan además de sus oraciones.

INDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1 <i>Clostridium difficile</i>	3
2.2 Síntomas asociados a la CDI	4
2.3 Factores de riesgo	4
2.4 Factores de Virulencia	5
2.4.1 Toxinas	5
TcdA y TcdB	5
2.4.2 Factores de virulencia no toxigénicos	8
2.5 Fisiopatología.....	10
2.6 Respuesta inmune ante <i>Clostridium difficile</i>	13
2.6.1 Inmunidad innata contra <i>C. difficile</i>	13
2.6.2 Inmunidad adaptativa contra <i>C. difficile</i>	15
2.7 Diagnóstico	15
2.7.1 Detección de glutamato deshidrogenasa (GDH)	16
2.7.2 Detección de toxinas por inmunoensayos	17
2.7.3 Ensayo de citotoxicidad	17
2.7.4 Detección de ácidos nucleicos	18
2.7.5 Cultivo Toxigénico.....	18
2.7.6 Detección del gen <i>tpi</i>	19
2.8 Tratamiento de <i>Clostridium difficile</i>	20
2.8.1 Terapia antimicrobiana.....	20
2.8.2 Bacterioterapia	22
2.8.3 Trasplante de microbiota fecal	23
3. ANTECEDENTES	24
3.1 Antecedentes generales	24
3.1.1 Toxinotipos	24
3.1.2 Ribotipificación.....	25
3.1.3 Epidemiología	26
3.2 Antecedentes específicos	30
3.2.1 Portador asintomático de <i>C. difficile</i>	30
4. JUSTIFICACIÓN	35
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	36
6. HIPÓTESIS CIENTÍFICA	36
7. OBJETIVOS	36
7.1 Objetivo general	36
7.2 Objetivos específicos	36
8. MATERIAL Y MÉTODOS	37
8.1 Estrategia de trabajo	37

8.2 Técnicas y procedimientos.....	38
8.2.1 Recolección y procesamiento de las muestras.....	38
8.2.3 Aislamiento y purificación de las cepas.....	38
8.2.4 Extracción de ADN genómico de <i>C. difficile</i> : Lisis con Buffer 10 X.....	39
8.2.6 Detección del gen <i>tpi</i> para la identificación de <i>C. difficile</i>	39
8.2.7 Detección de los genes <i>tcdA</i> , <i>tcdB</i> , <i>cdtA</i> y <i>cdtB</i> de <i>C. difficile</i>	39
8.2.8 Confirmación de especie basado en RNA ribosomal 16S (<i>16S rRNA</i>).....	39
8.2.9 Técnica de Electroforesis.....	40
9. RESULTADOS	40
9.1 Recolección de muestras.....	40
9.2 Aislamiento de colonias de <i>C. difficile</i> en medio CCFA-TC.....	42
9.3 Tinción de Gram.....	45
9.4 Detección del gen <i>tpi</i> para la identificación de <i>Clostridium difficile</i>	46
9.5 Detección de los genes correspondientes a las toxinas de <i>Clostridium difficile</i> : <i>tcdA</i> , <i>tcdB</i> , <i>cdtA</i> y <i>cdtB</i>	48
9.6 Identificación basada en ARN ribosomal 16S (<i>16S rRNA</i>).....	52
9.6.1 Alineamientos del gen <i>16S rRNA</i> de <i>Clostridium perfringens</i> ATCC 13124 y <i>Clostridium difficile</i> ATCC 9689.....	55
9.6.2 Alineamiento Múltiple en Clustal Omega.....	57
9.6.3 Alineamientos de las secuencias del gen <i>tpi</i> de <i>Clostridium difficile</i> cepa E12 y <i>Clostridium perfringens</i> cepa F262.....	62
10. DISCUSION	64
11. CONCLUSIONES.....	69
12. PERSPECTIVAS.....	69
13. BIBLIOGRAFÍA	70
14. ANEXOS	77
14.1 formulario de datos clínicos de los donadores.....	77
14.2 Estandarización de la PCR para la amplificación del gen <i>tpi</i>	78
14.3 Estandarización de la PCR para la amplificación de los genes <i>tcdA</i> , <i>tcdB</i> , <i>cdtA</i> y <i>cdtB</i> correspondientes a las toxinas de <i>C. difficile</i>	78
14.4 Estandarización de la PCR para la confirmación de especie basado en la identificación molecular del <i>16S rRNA</i>	80
14.5 Purificación de Banda por kit.....	81
14.6 Tinción de Gram.....	81
14.7 Tabla Recolección de Datos Muestras de Adultos.....	83
14.8 Tabla Recolección de Datos Muestras de Infantes.....	84
14.9 Secuencias de las muestras aisladas positivas al gen <i>tpi</i>	85
14.10 Resultados de la secuenciación (Análisis mediante BLAST).....	87
14.10.1 Análisis de la secuencia 033 CI en GenBank NCBI mediante BLAST.....	87
14.10.2. Análisis de la secuencia 001 CI en GenBank NCBI mediante BLAST.....	88
14.10.3 Análisis de la secuencia 018 CI en GenBank NCBI mediante BLAST.....	88
14.10.4 Análisis de la secuencia 025 CA en GenBank NCBI mediante BLAST.....	89

14.10.5 Análisis de la secuencia 015 CI en GenBank NCBI mediante BLAST	89
14.10.6 Análisis de la secuencia 002 CA en GenBank NCBI mediante BLAST.....	90
14.11 Secuencias obtenidas de la base de datos NCBI.	90
14.12 Secuencias obtenidas de la base de datos ENA.....	94

ABREVIATURAS

Símbolo	Definición
CDI	Infección causada por <i>clostridium difficile</i>
TcdA	Toxina A
TcdB	Toxina B
PaLoc	Locus de patogenicidad
CDT	Toxina binaria de <i>C. difficile</i>
CdtLoc	Locus de CDT
PMC	Colitis pseudomembranosa
tcdC	Regulador negativo
tcdR	Regulador positivo
tcdE	Holina
GTD	Dominio Glucosiltransferasa
GTPasas	Guanosin trifosfatasa
cdtR	Regulador positivo
Di-GMPc	Di-guanosín monofosfato cíclico
<i>fglB</i>	Operón relacionado con la expresión del Flagelo
Spo0A	Regulador principal para la esporulación
CspC	Receptor germinativo
FMT	Trasplante de microbiota fecal
DACD	Diarrea asociada a <i>C. difficile</i>
REA	Patrón de restricción

1. RESUMEN

Clostridium difficile es una bacteria Gram positiva, anaerobia obligada, formadora de esporas y es la causa más común de diarrea infecciosa asociada con el uso de antibióticos. La infección causada por *Clostridium difficile* (CDI) es una enfermedad mediada por las toxinas que produce; los síntomas varían de diarrea leve a severa, colitis pseudomembranosa (PMC), megacolon tóxico o incluso la muerte. El aumento en la incidencia y severidad de la CDI resulta en una carga económica significativa sobre los sistemas de salud debido a los costos asociados con el tratamiento y las estadías prolongadas. En la comunidad también existe un incremento notable de las infecciones causadas por este patógeno especialmente en personas jóvenes y sin antecedentes de uso de antibióticos. La infección por *C. difficile* en América del Norte y Europa está bien documentada estimándose que *C. difficile* coloniza a adultos sanos en un 3-15% de los residentes de la comunidad y a más del 20% de los adultos hospitalizados. Sin embargo, se sabe muy poco sobre la propagación de esta bacteria en América Latina. En México hay pocos informes sobre la presencia de *C. difficile* y no existen estudios enfocados sobre este patógeno en personas sanas de la comunidad, las cuales podrían representar un papel importante en la transmisión de este patógeno. En el presente trabajo recolectamos 63 muestras de heces de infantes y adultos sanos, durante el periodo de julio 2018 a junio del 2019 provenientes de las ciudades de Puebla y Tehuacán. Realizamos un pretratamiento de la muestra con alcohol con el fin de reducir el crecimiento de la microbiota habitual y posteriormente se llevó a cabo el cultivo toxigénico en medio selectivo CCFA-TC (agar de cicloserina-cefoxitina-fructosa) adicionado con taurocolato. El 60.31% n=38 de las muestras dieron positivo al cultivo en condiciones de anaerobiosis. Posteriormente se detectó el gen *tpi* (que tiene una alta especificidad para la identificación de *C. difficile*) en 16% n=6 de las 38 muestras que resultaron positivas al cultivo, el gen *tpi* se encontró en 6 individuos (2 infantes y 4 adultos). Después determinamos por PCR los genes de las toxinas *tcdA*, *tcdB*, *cdtA* y *cdtB* a partir del DNA de las 6 muestras positivas al gen *tpi* para identificar *C. difficile* toxigénico. De este modo, se encontraron 2 cepas de *C. difficile*

toxigénico (la de un infante que amplificó el gen *tcdA* y la muestra de un adulto que amplificó solamente el gen *cdtA*), mientras que 4 muestras (3 adultos y 1 infante) se definieron como *C. difficile* no toxigénico ya que ninguna amplificó los genes *tcdA*, *tcdB*, *cdtA* y *cdtB*. Con nuestros resultados es probable que las infecciones causadas por *C. difficile* se conviertan en un problema importante en América Latina. En México, la prevalencia de *Clostridium difficile* se informa poco, y es una enfermedad subestimada por lo que es importante conocer la prevalencia de esta bacteria en personas asintomáticas ya que representan un riesgo epidemiológico y así evitar problemas graves de salud pública.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 *Clostridium difficile*

Clostridium difficile es un bacilo anaerobio (figura 1), Gram positivo, formador de esporas, que se encuentra en el medio ambiente y en el tracto intestinal de animales y seres humanos. Es la causa más común de enfermedad asociada a diarrea infecciosa y ha emergido como un patógeno líder nosocomial en países desarrollados (Desai et al., 2016). Esta bacteria fue descrita por primera vez en 1935 tras su aislamiento en las heces de recién nacidos y fue nombrada *Bacillus difficilis* para reflejar la dificultad de su aislamiento y cultivo (HALL & O'TOOLE, 1935). Se estima que *C. difficile* se encuentra colonizando adultos sanos de entre 3-15% de los residentes de la comunidad y más del 20% de los adultos hospitalizados en América del Norte, Europa y Japón (Crobach et al., 2018; Shannon-Lowe et al., 2010)).



Figura 1. Microscopía de *Clostridium difficile*. Se observan células vegetativas con morfología bacilar y zonas de esporulación (Martínez- De la Peña).

La infección causada por *Clostridium difficile* (CDI) es una enfermedad mediada por toxinas y caracterizada por diarrea (Donskey et al., 2015).

2.2 Síntomas asociados a la CDI

Los síntomas clínicos asociados con la CDI van desde diarrea leve a colitis fulminante, y pueden incluir colitis pseudomembranosa, megacolon tóxico (dilatación intensa del colon), perforación, sepsis intestinal, así como el síndrome de disfunción orgánica múltiple (Leffler & Lamont, 2015). La diarrea grave asociada a *C. difficile* a menudo va acompañada de una imagen endoscópica típica de colitis pseudomembranosa con hemorragia y ulceraciones profundas (figura 2) El megacolon tóxico se considera la entidad más grave de la enfermedad y se caracteriza por toxicidad sistémica y una alta mortalidad. Las manifestaciones extraintestinales de CDI (incluida la bacteriemia) son extremadamente raras, y esto enfatiza que son los efectos localizados de las toxinas, asociados con la pérdida de la microbiota intestinal los que causan los signos y síntomas de CDI (Yu et al., 2015).

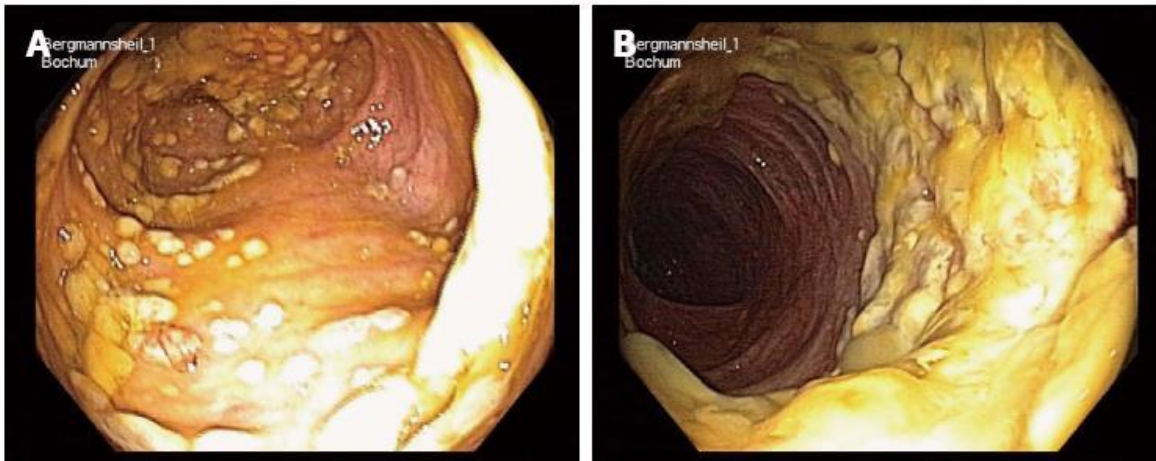


Figura 2. Colonoscopia. A, B: colitis pseudomembranosa grave en el colon después de tratamiento con antibióticos y lavado intestinal (Brechmann et al., 2015).

2.3 Factores de riesgo

Los factores de riesgo conocidos para CDI de acuerdo con el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades de Estados Unidos (CDC) son hospitalización previa, enfermedad previa con *C. difficile*, tener un sistema inmunológico debilitado, como las personas con VIH / SIDA, cáncer o pacientes con trasplante de órganos que toman medicamentos inmunosupresores, edad avanzada (> 65 años) y, el más importante, el uso de antibióticos (figura 3). Todas las clases de antibióticos se

pueden asociar con CDI, pero la clindamicina, las cefalosporinas y las fluoroquinolonas son las más citadas (Slimings & Riley, 2014). Los antibióticos inducen disbiosis de la microbiota intestinal protectora y a menudo subyace al crecimiento de *C. difficile* y la producción de toxinas (Theriot et al., 2016). Dado que la alteración de la flora intestinal persiste por más de 3 meses después de la terapia con antibióticos, los pacientes pueden seguir siendo susceptibles al desarrollo de CDI mucho después de finalizar el tratamiento. La supresión ácida por inhibidores de la bomba de protones (comúnmente utilizada para dispepsia, enfermedad de úlcera péptica y enfermedad por reflujo gastroesofágico) se ha asociado con frecuencia con la CDI (McDonald et al., 2015), pero el papel preciso de los inhibidores de la bomba de protones en CDI sigue siendo poco claro. De todos los pacientes con diarrea asociada a antibióticos, 20-30% es causado por *C. difficile* (Bartlett & Gerding, 2008).



Figura 3. Factores de Riesgo asociados a la Infección por *Clostridium difficile* Tomado de (CDC).

2.4 Factores de Virulencia

Los factores de virulencia para *C. difficile* se clasifican en factores toxigénicos y no toxigénicos los cuales se describen a continuación:

2.4.1 Toxinas

TcdA y TcdB

Todas las cepas de *C. difficile* toxigénico presentan un locus de patogenicidad (PaLoc) de aproximadamente 19,6 kb (figura 4 a). Este locus está formado por 5 genes (*tcdA*, *tcdB*, *tcdC*, *tcdE* y *tcdR*). Los genes *tcdA* y *tcdB* codifican para dos toxinas TcdA y TcdB (toxinas A y B, respectivamente), ambas responsables de la

patogenicidad de *C. difficile*. El gen *tcdR* actúa como regulador positivo de la expresión de *tcdA* y *tcdB*, mientras que *tcdC* actúa como regulador negativo, evitando la expresión de todo el PaLoc. Finalmente, *tcdE* codifica una holina que se encarga de hacer poros en la membrana citoplasmática y permite la liberación de las toxinas (Carroll & Bartlett, 2011; Smits et al., 2016). TcdA es una enterotoxina de 308 kDa y la toxina B es una citotoxina de 270 kDa ambas tienen actividad glucosiltransferasa que inactivan las Rho GTPasas de las células dianas, causando la interrupción de las fibras de actina del citoesqueleto que resulta en una disminución de la resistencia transepitelial, la acumulación de líquido y la destrucción del epitelio intestinal (Gerding et al., 2014; Rupnik et al., 2009).

Las toxinas comparten múltiples dominios conservados que incluyen un dominio catalítico glucosiltransferasa ubicado en el N-terminal, un dominio cisteína proteasa que se requiere para el autoproteasamiento y entrega del dominio catalítico al citosol de la célula intoxicada. Adicionalmente, un dominio de translocación hidrofóbico, ubicado dentro de las toxinas, se cree que está involucrado en la formación de poros e inserción de las toxinas en la membrana endosomal previo a su liberación en el citosol. Finalmente, un dominio C-terminal de unión al receptor (Awad et al., 2014). Las toxinas tras unirse a sus receptores, son introducidas en las células diana mediante endocitosis. Dentro de estos endosomas, en un ambiente ácido, ocurre la digestión autoproteolítica por la que la región N-terminal (con el dominio catalítico) se separa del resto de la toxina. Al parecer solo esta región catalítica es la que será liberada al citosol y ejercerá su función incorporando glucosa a determinadas guanosin trifosfatasa (GTPasas) como las proteínas Rho y Rac, entre otras. Estas GTPasas se encargan, de la regulación de determinados procesos de señalización que están implicados en funciones relacionadas con el mantenimiento de la barrera epitelial y las interacciones intercelulares (formación del citoesqueleto), además de intervenir en la fagocitosis y la producción de citoquinas. Fruto de todo este proceso, es que las células epiteliales se desestructuran separándose entre ellas e incluso mueren, por lo tanto, se facilita la migración de neutrófilos hacia el intestino contribuyendo con la respuesta inflamatoria típica de la colitis (Voth & Ballard, 2005).

Dada la homología entre las dos proteínas, cabe destacar que TcdA y TcdB tienen funciones marcadamente diferentes en los modelos de toxicidad animal. Históricamente, TcdA se ha visto como la enterotoxina más potente, ya que la administración de TcdA purificada en los intestinos de conejos y roedores causa necrosis tisular y una intensa infiltración de células inmunes (Triadafilopoulos et al., 1987). Sin embargo, en estudios que involucran tejido colónico humano, TcdB parece ser una potente toxina inflamatoria, mientras que TcdA es más débil (Riegler et al., 1995).

Toxina binaria CDT

La transferasa de *C. difficile* (CDT o toxina binaria) es una tercera toxina producida por algunas cepas de *C. difficile*, incluidos los ribotipos de PCR epidémicos 027 y 078. CDT ha recibido una mayor atención en los últimos años debido a la prevalencia creciente en aislados de origen humano y animal (Gerding et al., 2014). Esta toxina consiste en dos componentes, un componente enzimático (CDTa) y un componente de unión a receptor (CDTb) (Gülke et al., 2001).

La CDT está codificada por dos genes, *cdtA* y *cdtB*, que están localizados en un operón en el locus *Cdt* (*CdtLoc*) de aproximadamente 6,2 kb (figura 4 b). El locus *Cdt* también alberga un gen regulador de respuesta *cdtR* que es un regulador transcripcional positivo. El mecanismo patogénico de dicha toxina aún no está del todo dilucidado. Probablemente pueda formar protuberancias basadas en microtúbulos en las células epiteliales, que teóricamente podría tener un impacto clínico. Al parecer también interviene, incrementando la adhesión de las cepas de *C. difficile* y además actúa a nivel del citoesqueleto de la célula provocando una mayor pérdida de líquidos. Hay informes de desarrollo severo de CDI causado por cepas TcdA⁻, TcdB⁻, CDT⁺. Así, las cepas portadoras de toxina binaria se han asociado a una mayor virulencia (Carroll & Bartlett, 2011; Carter et al., 2007; Czepiel et al., 2019; Perelle et al., 1997; Smits et al., 2016).

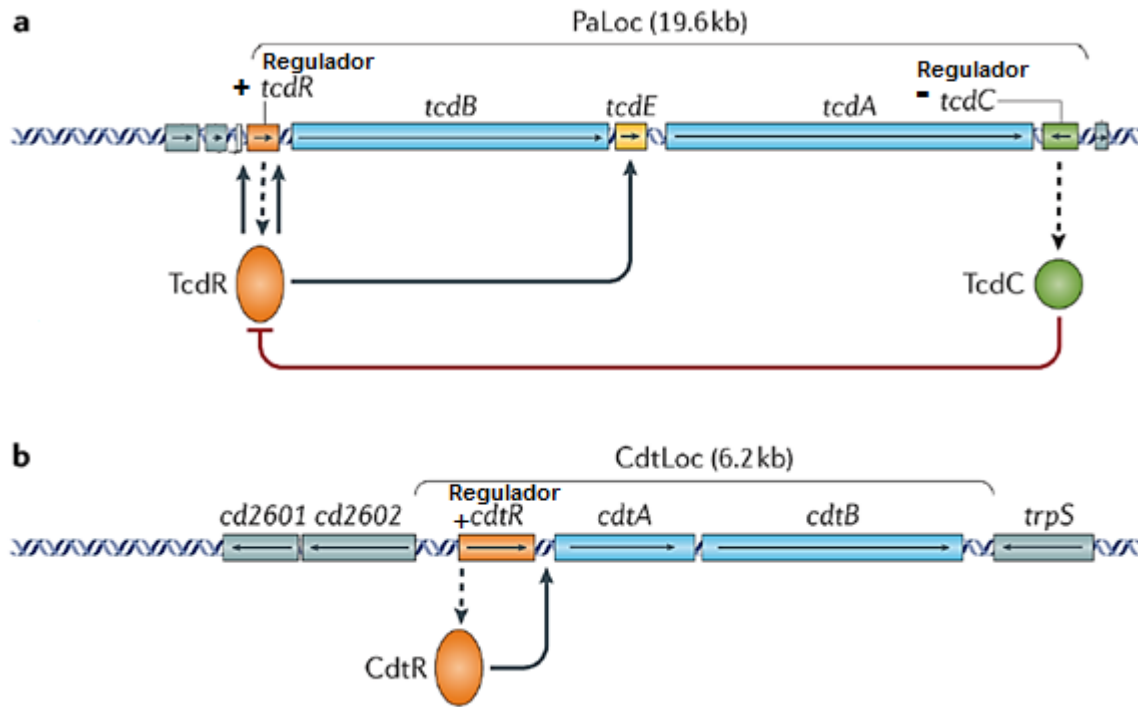


Figura 4. Operones y Regulación de las toxinas de *Clostridium difficile*. a: Representación esquemática del locus de patogenicidad (PaLoc), los genes de toxina *tcdA* y *tcdB* están en azul, los genes reguladores están en naranja (positivo) y verde (negativo); *tcdE* está en amarillo y los genes ubicados fuera de PaLoc están en gris. b: Representación esquemática del locus de la toxina binaria (CdtLoc). Los genes de las toxinas *cdtA* y *cdtB* están en azul, el gen regulador *cdtR* está en naranja y los genes ubicados fuera del CdtLoc están en gris. Modificado de (Smits et al., 2016).

2.4.2 Factores de virulencia no toxigénicos

La regulación de los genes que controlan la motilidad y la adherencia es un factor importante que contribuye a la eficacia de la colonización y la virulencia de *C. difficile* (Awad et al., 2014). La expresión flagelar es muy variable entre las cepas de *C. difficile* y la falta de flagelos se ha relacionado con la alteración de la adherencia al epitelio intestinal. El papel de los componentes del flagelo como adhesinas que median la unión bacteriana a las células del huésped no se limita a *C. difficile*. Por ejemplo, el flagelo de *Escherichia coli* enteropatógena contribuye a la adherencia a las células epiteliales independientemente de la motilidad mediada por el flagelo. Además, la flagelina (FliC) y la proteína de cubierta flagelar (FliD) de *Pseudomonas aeruginosa* se relacionan con la adherencia y colonización en el tracto respiratorio a través del reconocimiento de mucina (Muc1), un componente abundante de la

proteína del moco en las vías respiratorias. Tasteyre y colaboradores observaron que la presencia de flagelos aumenta la capacidad de *C. difficile* de asociarse con el tejido epitelial intestinal. *C. difficile* móvil flagelado se adhiere de manera más eficiente a la pared cecal de ratones que las cepas no flageladas (Tasteyre, Karjalainen, et al., 2001). En otro estudio, se demostró que las proteínas purificadas de cubierta flagelar recombinante (FliD) y flagelina (FliC) se adhieren a las células de manera *in vitro* (Tasteyre, Barc, et al., 2001). Estos estudios llevaron a la conclusión de que la flagelina y la proteína de cubierta flagelar pueden servir como adhesinas de la superficie celular de *C. difficile*.

Curiosamente, las cepas mutantes que carecen de componentes de la maquinaria flagelar muestran una expresión de toxina desregulada y la correspondiente virulencia alterada *in vivo*, lo que sugiere un vínculo entre la expresión flagelar y la regulación de las toxinas (Baban et al., 2013). En *C. difficile*, la expresión del flagelo está regulada por el segundo mensajero intracelular di-guanosínmonofosfato cíclico (di-GMPc). Di-GMPc se sintetiza a partir de GTP por la diguanilatociclasa, actúa como un ligando específico y se une a un riboswitch río arriba del operón *flgB*, que es crucial en la formación temprana del flagelo, y termina la transcripción de *flgB* (Sudarsan et al., 2008). Los niveles elevados de di-GMPc intracelular reprimen la expresión del flagelo y, por lo tanto, la motilidad. También se ha visto que reprime la síntesis de TcdA y TcdB. Al mismo tiempo, el di-GMPc activa otro riboswitch que induce la expresión del Pili tipo IV que interactúa con el epitelio intestinal y contribuyen a la agregación de *C. difficile* y formación de biofilm (Bordeleau et al., 2015). De esta manera, el di-GMPc actúa como una señal clave que puede cambiar *C. difficile* a un estado altamente móvil, productor de toxinas y un estado productor de biofilm fuertemente adherente.

Otro factor de virulencia es la proteína de unión a fibronectina (FbpA), la fibronectina es una glicoproteína de gran peso molecular que es importante en la adhesión de muchos patógenos bacterianos al anfitrión. *C. difficile* se une a proteínas de la matriz extracelular como fibronectina, fibrinógeno, colágeno y vitronectina y posee una proteína de unión a fibronectina (FbpA) cuyo gen codificante parece estar altamente conservado en los aislados de *C. difficile*. El papel de la proteína de unión a

fibronectina en la patogenia de la enfermedad no se entiende completamente. Se ha demostrado que se une a los componentes de la matriz extracelular, incluidos la fibronectina, fibrinógeno y vitronectina, los anticuerpos contra la proteína de unión a fibronectina han demostrado inhibir parcialmente la unión a las células in vitro, por otro lado las proteínas de pared celular como Cwp66, Cwp84 y CwpV, e incluso Spo0A (el regulador principal para la esporulación), contribuyen a la adherencia de *C. difficile* y podrían tener un papel importante en la formación de biofilm (Awad et al., 2014; Dapa et al., 2013).

2.5 Fisiopatología

C. difficile se transmite por la vía fecal-oral (Figura 5). Existen tres fuentes de infección (áreas del cuidado de la salud, los animales y el medio ambiente). Las esporas y células vegetativas de *C. difficile* ingresan por vía oral, el paso por el ambiente ácido del estómago elimina la mayoría de las células vegetativas, pero no a las esporas, éstas germinan y crecen en el duodeno gracias a componentes de los ácidos biliares. Posteriormente *C. difficile* coloniza el colon y es ahí donde comienza la producción de toxinas, nuevas esporas y células vegetativas que serán excretadas por el paciente durante la infección (Smits et al., 2016). Las esporas son células latentes que son altamente resistentes a las condiciones ambientales, incluidos algunos desinfectantes y muchos antimicrobianos que generalmente se dirigen a las células metabólicamente activas. Se cree que las esporas son el vehículo infeccioso dado que las células vegetativas (células metabólicamente activas) de bacterias anaeróbicas obligadas son poco viables para sobrevivir en ambiente oxigenado fuera del anfitrión o en el ambiente ácido del estómago. De hecho, una cepa no esporulada de *C. difficile* es incapaz de persistir en el medio ambiente o transmitirse entre hospederos (Deakin et al., 2012).

La germinación de las esporas depende de la detección primaria de ácidos biliares del hígado como el taurocolato, por el receptor germinativo CspC y es inhibido por ácidos biliares secundarios en el colon como el ácido litocólico o el ácido desoxicólico. Además, la glicina puede actuar como un germinante a través de un mecanismo no caracterizado. Una cascada proteolítica conduce a la degradación

del peptidoglicano de la espora, la liberación del dipicolinato de calcio y la rehidratación de la espora, resultando en el crecimiento de las células (Bhattacharjee et al., 2015).

La propensión de las esporas a crecer y colonizar está muy influenciada por la microbiota del huésped y su metaboloma asociado. Por ejemplo, los cambios inducidos por antibióticos en la microbiota generan un ambiente propicio para la infección por *C. difficile*. En el colon, las bacterias comensales productoras de sialidasa escinden los azúcares de las proteínas glicosiladas que se unen a la membrana de la célula epitelial, esto proceso conduce a la liberación de ácido siálico libre en el lumen. Los fermentadores primarios descomponen los carbohidratos complejos en ácidos grasos de cadena corta. Ambos metabolitos, los azúcares y los ácidos grasos de cadena corta, son rápidamente consumidos como fuentes de energía por bacterias comensales. Sin embargo, el tratamiento con antibióticos puede agotar las bacterias comensales competidoras, lo que conduce a una abundancia de ácido siálico y succinato, un ácido graso de cadena corta que se produce durante la fermentación. *Clostridium difficile* tiene genes para el catabolismo del ácido siálico y los transportadores de succinato, lo que le permite utilizar el exceso de ácido siálico y succinato para su crecimiento (Abt et al., 2016). Las células vegetativas de *C. difficile* producen enzimas mucolíticas como la proteína de pared celular Cwp84, que son secretadas por la bacteria y degradan la mucosa del colon. Estas proteínas de la pared celular han demostrado afectar la adherencia de la bacteria a las células epiteliales del colon *in vitro* ya que ciertas mutaciones en genes que codifican estas proteínas, o en los genes que codifican las proteínas para su procesamiento generalmente atenúan la virulencia (Kovacs-Simon et al., 2014). Se ha visto que la expresión de al menos un subconjunto de factores de colonización por la bacteria, como la proteína de la superficie celular Cwp84 y la proteína de la capa superficial A (SlpA), es estimulada en presencia de los antibióticos ampicilina y clindamicina (Denève et al., 2008).

Por otro lado, las toxinas A y B causan un aumento de la permeabilidad vascular al abrir las uniones estrechas entre las células y causar hemorragia. Ambas también inducen la producción de factor de necrosis tumoral alfa e interleucinas

proinflamatorias que contribuyen a la respuesta inflamatoria y a la formación de pseudomembranas (figura 6). Las pseudomembranas colónicas tienen una apariencia distintiva, con mucosa inflamada tachonada de placas elevadas blancas y amarillas. Histológicamente, las pseudomembranas están compuestas por neutrófilos, fibrina, mucina y restos de células epiteliales (Poutanen & Simor, 2004).

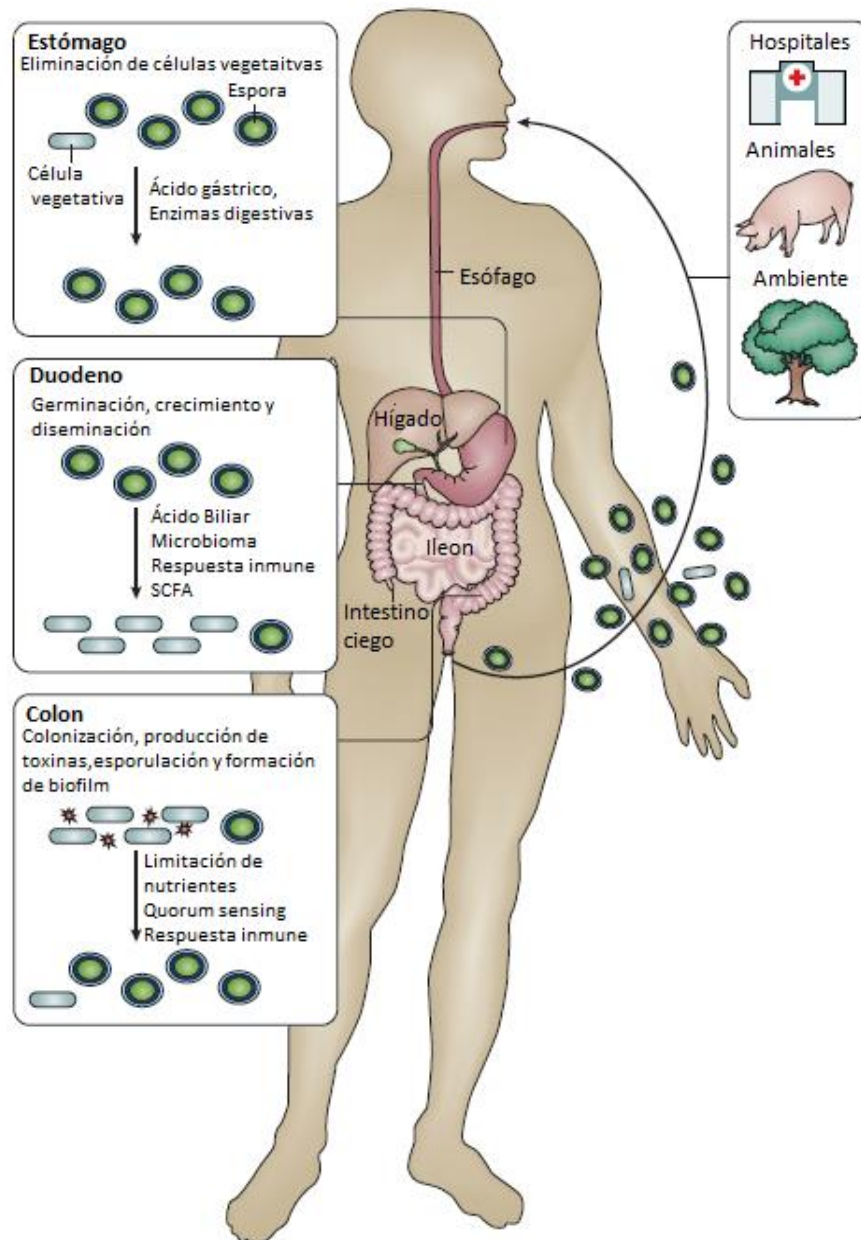


Figura 5. Etapas del ciclo de vida de *Clostridium difficile* en el tracto gastrointestinal humano. SCFA, ácido graso de cadena corta. Modificado de (Smits et al., 2016).

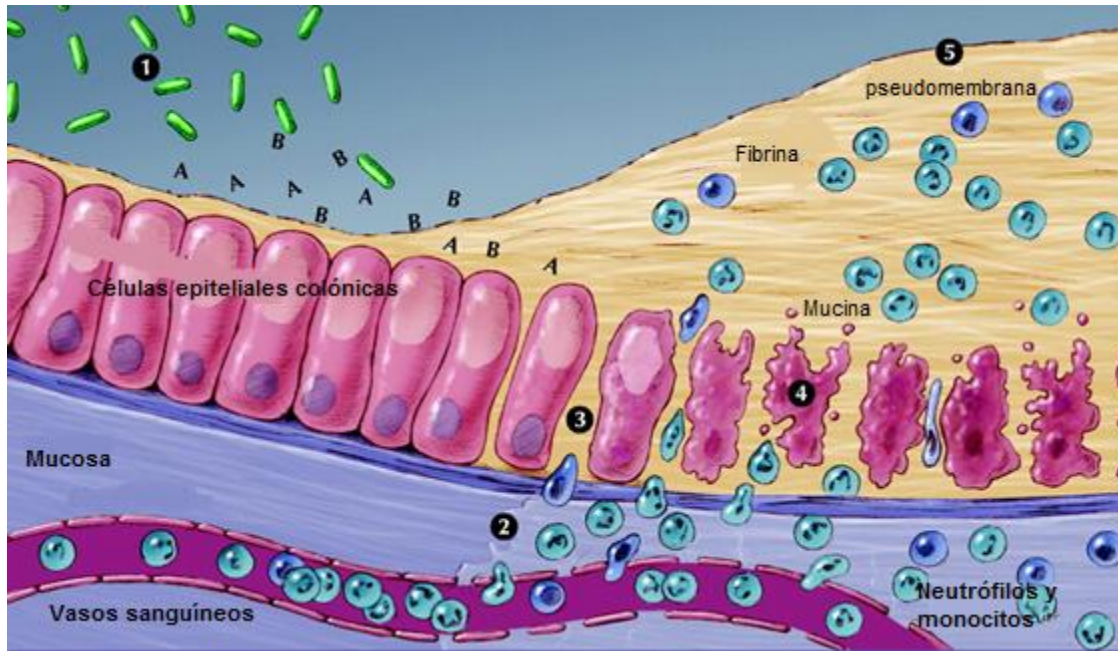


Figura 6. Patogénesis de *Clostridium difficile*. Producción de Toxinas y formación de pseudomembrana. Las células vegetativas de *C. difficile* producen las toxinas A y B y enzimas hidrolíticas (1). Producción local de toxinas A y B conduce a la producción de factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) e interleucina IL-8 y citocinas proinflamatorias como IL-1 β , IL -12 e IL-23, aumento de permeabilidad, reclutamiento de neutrófilos y monocitos (2), apertura de las uniones de células epiteliales (3) y apoptosis (4). La producción local de enzimas hidrolíticas (no mostradas), conduce a la degradación del tejido conectivo, lo que lleva a colitis, formación de pseudomembranas (5) y diarrea acuosa. Tomado de (Poutanen & Simor, 2004).

2.6 Respuesta inmune ante *Clostridium difficile*

2.6.1 Inmunidad innata contra *C. difficile*.

El sistema inmunológico del huésped responde rápidamente a las moléculas microbianas que atraviesan la barrera epitelial, un proceso que se intensifica en el contexto del daño del epitelio colónico mediado por la toxina de *C. difficile*. La pérdida de la integridad epitelial da como resultado un aumento de la permeabilidad intestinal y la translocación de bacterias desde la luz intestinal hacia tejidos más profundos (Figura 7). En respuesta, las células epiteliales intestinales y las células inmunitarias innatas residentes secretan quimiocinas proinflamatorias (como el ligando 1 del motivo de quimiocina CXC (CXCL1), CXCL2 e interleucina-8 (IL-8)) y citocinas proinflamatorias (como IL-1 β , IL -12 e IL-23), lo que conduce al

reclutamiento de neutrófilos y a la activación de células linfoides innatas (ILC). La señalización de IL-12 impulsa la expresión de interferón- γ (IFN γ), mientras que la señalización de IL-1 β e IL-23 induce la producción de IL-22. Las citocinas efectoras IFN γ e IL-22 inducen mecanismos de defensa como el aumento de la actividad fagocítica de macrófagos y neutrófilos y la producción de péptidos antimicrobianos y enzimas que sintetizan especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS). Estos mecanismos de defensa limitan la diseminación bacteriana, atenúan la actividad de la toxina y reparan el daño epitelial (Abt et al., 2016).

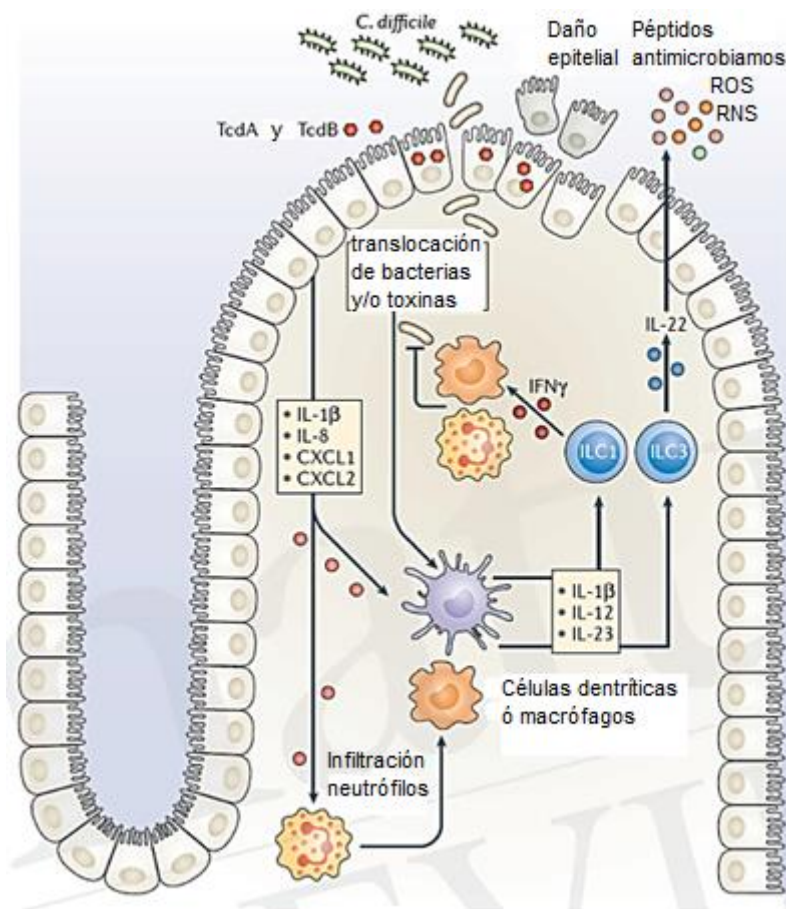


Figura 7. Respuesta inmune innata ante *Clostridium difficile*. Modificado de (Abt et al., 2016).

2.6.2 Inmunidad adaptativa contra *C. difficile*.

Los investigadores que estudian la respuesta inmune adaptativa a la CDI han examinado principalmente las respuestas de anticuerpos, incluidas IgA, IgM e IgG; y las respuestas de las células T se comprenden menos. Las inmunoglobulinas de las clases IgA, IgG e IgM son los principales anticuerpos capaces de proteger contra infecciones bacterianas como la CDI. Tanto la IgA como la IgG de alta afinidad neutralizan las toxinas, mientras que IgM caracteriza la fase temprana de la respuesta inmune y suele tener menor afinidad por el antígeno (Rees & Steiner, 2018).

La mayor parte de la investigación en inmunidad adaptativa se ha limitado a respuestas de anticuerpos y/o células B, mientras que faltan investigaciones sobre el papel de las células T en la CDI. La principal razón de esto es probablemente metodológica; cuantificar los anticuerpos es sencillo, pero medir las respuestas inmunitarias celulares es costoso y, con frecuencia, carece de sensibilidad. Las células T CD4⁺ proporcionan señales críticas a las células B después de la exposición y el procesamiento del antígeno; esta ayuda es necesaria para el cambio de clase, la maduración de la afinidad y el establecimiento de la memoria. Dado que TcdA y TcdB son proteínas, es probable que existan fuertes respuestas específicas del antígeno CD4⁺ a estas toxinas, que pueden ser críticas para la inmunidad protectora (Rees & Steiner, 2018).

2.7 Diagnóstico

El pilar para el diagnóstico de CDI es la presencia de síntomas clínicos más un ensayo de laboratorio bien elegido. Las pruebas de diagnóstico para *C. difficile* se pueden dividir en pruebas para detectar productos de *C. difficile* y pruebas de amplificación de genes de *C. difficile*. Entre las pruebas para productos de *C. difficile* se encuentra la detección de la glutamato deshidrogenasa (GDH), ácidos grasos aromáticos, las toxinas TcdA y/o TcdB; métodos de cultivo para la detección de *C. difficile* productor de toxinas (cultivo toxigénico); identificación de proteínas de la

pared celular y proteínas involucradas en la esporulación. De las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos para genes de *C. difficile* se detectan el gen *16S rRNA*, genes de toxinas, la identificación de genes housekeeping como el gen *tpi* que codifica la enzima triosa fosfato isomerasa (Bartlett & Gerding, 2008; Dhalluin et al., 2003; Muñoz et al., 2019).

La selección de la prueba es importante para diferenciar entre pacientes con CDI y portadores asintomáticos. Las pruebas que detectan toxinas son específicas de CDI, mientras que las que detectan un componente de la bacteria pueden indicar colonización en lugar de enfermedad. Cabe destacar que las pruebas siguen siendo positivas para las toxinas durante el tratamiento e incluso se pueden encontrar toxinas después de un tratamiento exitoso, por lo cual no se recomienda el monitoreo regular con pruebas de toxinas como seguimiento del tratamiento. Si no hay toxinas libres, la CDI es muy poco probable (Planche & Wilcox, 2015). Si *C. difficile* está presente pero el resultado de la prueba de toxina es negativo, CDI no puede ser definitivamente excluido. Los pacientes sin síntomas podrían estar colonizados por *C. difficile* y con diarrea debido a una causa alterna o podrían estar experimentando CDI con niveles de toxina por debajo del límite inferior de detección del ensayo utilizado (Smits et al., 2016).

A continuación, se describen las pruebas más utilizadas para el diagnóstico microbiológico de *Clostridium difficile* (Tabla 1):

2.7.1 Detección de glutamato deshidrogenasa (GDH)

GDH es una enzima denominada también Antígeno Común producida por *C. difficile*. A pesar que otras bacterias expresan una enzima similar, los inmunoensayos comerciales actuales utilizan anticuerpos monoclonales que le otorgan una sensibilidad de 85 a 95% y especificidad de 89 a 99%.

Esta prueba es de utilidad para la detección rápida cuando se combina con un método de detección de toxinas (Flores & Duery, 2017).

La detección de glutamato deshidrogenasa (GDH) se considera altamente específico para la detección de *C. difficile* en muestras clínicas; sin embargo,

problemas potenciales se han destacado con el uso de esta metodología para la notificación de casos asintomáticos de colonización. En un estudio, solo uno de cinco casos positivos determinados por un método de cultivo de enriquecimiento fue positivo por el ensayo de GDH, probablemente debido a niveles bajos de antígeno GDH (por debajo del límite inferior de detección para este ensayo) en heces no diarreicas (Crobach et al., 2018).

2.7.2 Detección de toxinas por inmunoensayos

Son pruebas rápidas y de bajo costo, pueden detectar directamente solo la toxina A, las toxinas A+B o A y B individualmente. Es posible encontrar métodos inmunoenzimáticos con una sensibilidad de 65-85% y especificidad de 95 hasta 100% y métodos inmunocromatográficos con sensibilidad de 87-90% y especificidad de 90- 98%. Además, existen pruebas inmunocromatográficas que incorporan la detección del antígeno GDH lo que favorece el rendimiento del ensayo detectando el microorganismo y sus toxinas (Flores & Duery, 2017).

2.7.3 Ensayo de citotoxicidad

Esta prueba permite detectar la toxina B preformada de *C. difficile* en deposición, se basa en la observación del efecto citopático producido por la toxina B y neutralización de este efecto con antisueros. Requiere el mantenimiento de líneas celulares, por lo tanto, es una técnica costosa y laboriosa con obtención de resultados en 24 a 72 horas. Debido a que la toxina B es termolábil se ve afectada la sensibilidad de la técnica, por lo tanto, la muestra debe procesarse lo antes posible. Fue considerada tradicionalmente como el estándar de oro, siendo desplazada últimamente por el cultivo toxigénico debido a una mejor sensibilidad. La especificidad del ensayo de citotoxicidad es de un 100%, por lo que un resultado positivo siempre se asocia a infección, sin embargo, su sensibilidad se ha informado en un rango de 67 a 100% (Flores & Duery, 2017).

Esta prueba detecta toxinas de *C. difficile* y no la presencia del organismo en sí por lo tanto su utilidad para detectar colonización es limitada (Crobach et al., 2018).

2.7.4 Detección de ácidos nucleicos

En los últimos años se han implementado en los laboratorios ensayos de detección de ácidos nucleicos, ya que son técnicas rápidas y de una alta sensibilidad y especificidad. Entre los métodos disponibles está la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real. En general, los métodos de PCR detectan secuencias del gen de la toxina B (*tcd B*), también algunos detectan regiones conservadas del gen *tcdA* (Flores & Duery, 2017).

Estos métodos han demostrado poseer una sensibilidad mayor al 90% y una especificidad entre un 94% y 99%, según el tipo de método. El resultado positivo en un paciente sintomático puede indicar infección o en menor probabilidad una colonización de CD. Un resultado negativo descarta la infección. La PCR detecta la presencia de un gen que codifica una toxina, por lo que confirma la presencia de la cepa productora de toxina, pero no significa necesariamente que la cepa produzca toxinas en ese momento (Czepiel et al., 2019).

2.7.5 Cultivo Toxigénico

Un estándar de oro alternativo para la CDI es el cultivo toxigénico, que incluye el cultivo del organismo seguido de la detección de su capacidad de producir toxinas mediante un inmunoensayo enzimático (Tox A/B EIA), ensayo de citotoxicidad o una prueba de amplificación de ácidos nucleicos (Crobach et al., 2018).

Es una metodología que tiene una alta sensibilidad y especificidad, que consiste en el cultivo de la muestra de deposición en medios selectivos y enriquecidos, para luego determinar la toxicidad del aislamiento obtenido. El medio más utilizado para el cultivo de *C. difficile* es el Agar Cicloserina-Cefoxitina-Fruktosa (CCFA) con o sin sangre. Para mejorar la selectividad de la técnica, la muestra se somete previamente a un shock etanólico, se incuba en ambiente anaeróbico por 48 horas en un rango de temperaturas que va de los 25 y los 45° C siendo 30-37° C su temperatura óptima de crecimiento.

Las placas son incubadas por 48 horas a 35°C en anaerobiosis, se revisan las placas, el aislamiento se realiza bajo lupa estereoscópica según cantidad y pureza del cultivo. En medios con sangre las colonias alcanzan un tamaño 2 a 5 mm de diámetro, pueden ser de color blanca o amarillentas, no presentan hemólisis, son

planas o levemente convexas, pueden ser circulares o rizoides, opacas y de aspecto granuloso, poseen un olor característico a estiércol debido a la producción de un compuesto orgánico volátil llamado paracresol y muestran fluorescencia bajo la luz UV.

A partir de las colonias se puede realizar la determinación de toxinas mediante ensayo de citotoxicidad, inmunoensayos rápidos o de amplificación molecular.

Existe la posibilidad de presencia de cepas toxigénicas y no toxigénicas, u observar diferentes fenotipos en un mismo cultivo por lo que es recomendable realizar la detección de toxinas simultáneamente sobre diversas colonias de la placa con el fin de detectar la cepa productora de toxinas.

A pesar de que es una técnica de alto rendimiento, es laboriosa y requiere personal entrenado. Es de utilidad para evaluar la implementación de nuevas técnicas de rutina, permite tipificar y conocer la susceptibilidad antimicrobiana de la cepa para estudios epidemiológicos (Flores & Duery, 2017).

2.7.6 Detección del gen *tpi*

El gen *tpi* codifica la enzima triosa fosfato isomerasa que cataliza estereoespecíficamente la conversión de fosfato de dihidroxiacetona (DHAP) en D-gluceraldehído-3-fosfato (G3P). Dhalluin y colaboradores (Dhalluin et al., 2003) compararon los fragmentos internos del gen *tpi* para distinguir 12 especies del género *Clostridium*. Gracias a un trabajo previo (Lemee et al., 2004) diseñaron cebadores específicos para amplificar el gen *tpi* de *Clostridium difficile*. Estos cebadores amplificaron exitosamente en los 72 aislamientos de *Clostridium difficile* de diferentes hospedadores y orígenes geográficos; además, no se amplificó en las otras 11 especies probadas, incluyendo *C. perfringens*, *C. sordellii* y *C. bifermentans*, estas dos últimas son filogenéticamente cercanas a *C. difficile* lo que indicó que el gen *tpi* puede usarse como un buen marcador para la identificación de *C. difficile* (Dhalluin et al., 2003). Muchas investigaciones han empleado la detección de este gen junto con la detección de toxinas (Camorlinga et al., 2019; Ferraris et al., 2019; Lai et al., 2018; Samie et al., 2008).

Prueba de laboratorio	Sensibilidad	Especificidad	Disponibilidad	Habilidad para detectar colonización	Producto detectado
Gold estándar					
Cultivo Toxigénico	Alta	Baja	Limitada	SI	<i>C. difficile</i> toxigénico
Ensayo de citotoxicidad	Alta	Alta	Limitada	NO	Toxinas A o B
Pruebas rápidas					
GDH	Alta	Baja	Amplia	SI	GDH (antígeno común <i>C. difficile</i>)
Detección de toxinas por inmunoensayos	Baja	Moderada	Amplia	NO	Toxinas A o B
Ácidos nucleicos	Alta	Baja/moderada	Limitada por costo	SI	Genes <i>tcdA</i> , <i>tcdB</i> ó <i>tcdC</i>

Tabla 1. Técnicas disponibles para el diagnóstico de CDI. Modificado de (Chen et al., 2017)

2.8 Tratamiento de *Clostridium difficile*

2.8.1 Terapia antimicrobiana

Los antibióticos actualmente disponibles que se recomiendan para el tratamiento de la CDI son metronidazol, vancomicina y fidaxomicina. El antibiótico nitroimidazol metronidazol en su forma parcialmente reducida inhibe la síntesis de ácidos nucleicos al alterar el ADN de las células microbianas anaeróbicas. La vancomicina inhibe la síntesis de la pared celular al unirse al residuo D-Ala-D-Ala del UDP- *N*-acetilmuramil pentapéptido un precursor esencial en la síntesis de peptidoglicano. El antibiótico macrocíclico fidaxomicina se une al complejo de plantilla de ADN-ARN polimerasa y previene la separación inicial de las cadenas de ADN, lo que inhibe la síntesis de ARNm al obstaculizar la ARN polimerasa (Debast et al., 2014; Maaß et al., 2018).

El tratamiento solo debe iniciarse en pacientes con síntomas de CDI. La presencia de la toxina de *C. difficile* sin síntomas de la infección no es una indicación de tratamiento. Las guías publicadas en 2014 por la ESCMID (Sociedad Europea de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas) mencionan el metronidazol como fármaco de primera línea en la CDI no grave, mientras que la vancomicina es el fármaco de elección en la CDI grave, por otro lado, la fidaxomicina es un fármaco

que ha estado disponible desde 2011 y es un antibiótico bactericida macrocíclico de espectro estrecho, dirigido principalmente contra patógenos Gram-positivos. Tiene una alta eficacia frente a *C. difficile*, sin influencia significativa sobre la flora del colon. La fidaxomicina tiene una eficacia comparable a la vancomicina y, en algunos grupos, una mayor eficacia para reducir la recurrencia de la CDI (Czepiel et al., 2019).

Después del tratamiento de un episodio inicial de CDI, la probabilidad de recurrencia en 8 semanas es del 15-25%; para un paciente con 1-2 recurrencias previas, el riesgo de nuevas recurrencias es del 40-65%. Las recurrencias se asocian con una respuesta inmune deteriorada por las toxinas de *C. difficile* y la alteración de la microbiota colónica (Kelly, 2012).

En 2017, la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América (IDSA) y Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA) actualizaron sus directrices, señalando que la vancomicina y la fidaxomicina son la piedra angular del tratamiento de CDI (tabla 2) (Czepiel et al., 2019).

Primer episodio de la infección	
Enfermedad no grave	• Vancomicina 125 mg por vía oral cuatro veces al día durante 10 días
	• Fidaxomicina 200 mg por vía oral dos veces al día durante 10 días
	• Si los agentes anteriores no están disponibles: metronidazol 500 mg por vía oral tres veces al día durante 10 días
Enfermedad severa	• Vancomicina 125 mg por vía oral cuatro veces al día durante 10 días
	• Fidaxomicina 200 mg por vía oral dos veces al día durante 10 días
Enfermedad fulminante (anteriormente denominada grave complicada)	• Vancomicina 500 mg por vía oral o por sonda nasogástrica cuatro veces al día y Metronidazol 500 mg IV 3 veces al día + alternativamente Si hay íleo: vancomicina por recto (vancomicina 500 mg en 100 ml de solución salina como enema) cuatro veces al día * (10 a 14 días)
Primera recurrencia	
Si el primer episodio se trató con metronidazol o fidaxomicina:	
• Vancomicina 125 mg por vía oral cuatro veces al día durante 10 días	
Si el primer episodio se trató con vancomicina:	

• Vancomicina por vía oral (reducción gradual de la dosis, cada dosis 125 mg):
Cuatro veces al día durante 10 a 14 días
Dos veces al día durante 7 días
Una vez al día durante 7 días
Cada 2 o 3 días durante 2 a 8 semanas
• Fidaxomicina 200 mg por vía oral dos veces al día durante 10 días
Segunda recurrencia y posteriores
• Vancomicina por vía oral (régimen de reducción gradual de la dosis como el anterior)
• Fidaxomicina 200 mg por vía oral dos veces al día durante 10 días;
• Vancomicina 125 mg por vía oral cuatro veces al día durante 10 días, seguida de rifaximina 400 mg tres veces al día durante 20 días
• Trasplante de microbiota fecal

Tabla 2. Tratamiento para la infección de CDI. Tomado de (Czepiel et al., 2019) * Si hay íleo parcial, la vancomicina debe administrarse tanto por vía oral como por vía rectal; si el íleo está completo, solo se debe usar vancomicina rectal.

2.8.2 Bacterioterapia

La evidencia apoya el uso de probióticos para disminuir la recurrencia de la CDI (Goldenberg et al., 2017). Los probióticos se han utilizado como terapéuticos para la CDI mediada por antibióticos y son seguros y eficaces para prevenir la diarrea asociada a *C. difficile*. Bacterias como *Bifidobacterium* y *Lactobacillus spp.* pueden inhibir la adhesión de las toxinas de *C. difficile* a las células epiteliales del colon del huésped y pueden actuar como estimuladores de la respuesta inmune. Además, bacterias como *Lactobacillus* pueden tener una actividad antimicrobiana directa mediante la secreción de bacteriocinas y otros péptidos antimicrobianos. En algunos estudios donde los pacientes reciben tratamientos de antibióticos más probióticos se han visto resultados favorables, por ejemplo, en un estudio donde los pacientes recibieron dosis altas de vancomicina más probióticos mostraron una tasa de recurrencia de CDI significativamente menor en comparación con los sujetos que recibieron dosis altas de vancomicina más placebo. Hasta ahora sólo se han informado pocos estudios sobre el uso de probióticos para la ICD asociada a antibióticos y, por lo tanto, se necesitan ensayos clínicos bien diseñados para futuras investigaciones (Rineh et al., 2014).

2.8.3 Trasplante de microbiota fecal

El trasplante de microbiota fecal (FMT) es un tratamiento de rescate altamente efectivo y debe considerarse en pacientes que han tenido > 2 recurrencias, ya que la eficacia de los antibióticos en estos pacientes es ~ 30%. El FMT se reserva mejor para pacientes con recurrencias múltiples de CDI que no respondieron a otras opciones de tratamiento. Es importante destacar que FMT es un procedimiento no estandarizado y las consecuencias a largo plazo de alterar la microbiota intestinal de un paciente son desconocidas (Youngster et al., 2014).

En el FMT, se recolecta material fecal de un donante sano (figura 8). El material se procesa (mezcla, filtración) en pastillas o una solución. Como parte de este proceso, se confirma la ausencia de organismos patógenos y multirresistentes. El material procesado puede almacenarse antes de la administración (única) mediante infusión nasoduodenal donde las heces de los donantes se recolectan el día de la infusión y se diluyen con solución salina estéril, después la solución de heces del donante se administra lentamente al paciente a través de un tubo nasoduodenal, otro método es mediante infusión colonoscópica o enema rectal para formulaciones en solución o por vía oral para formulaciones en píldora. El tratamiento con antibióticos generalmente precede a la administración del FMT para reducir los niveles de *Clostridium difficile*. Sobre la base de análisis de microbiomas y metabolomas, se identifican firmas de resistencia a la colonización por *C. difficile*. Otro método consiste en después de recolectar material fecal de donantes sanos, se cultivan las especies identificadas en estas firmas de microbioma o que se cree que son responsables de la firma metabolómica. Las mezclas definidas de estas cepas se prueban para determinar su seguridad y capacidad para conferir resistencia a la colonización en ensayos preclínicos y posteriormente validadas en estudios clínicos. Las barras coloreadas indican la diversidad de la microbiota, que está severamente reducida en el paciente con infección por *C. difficile* (CDI) en comparación con el sujeto sano (Smits et al., 2016; van Beurden et al., 2017).

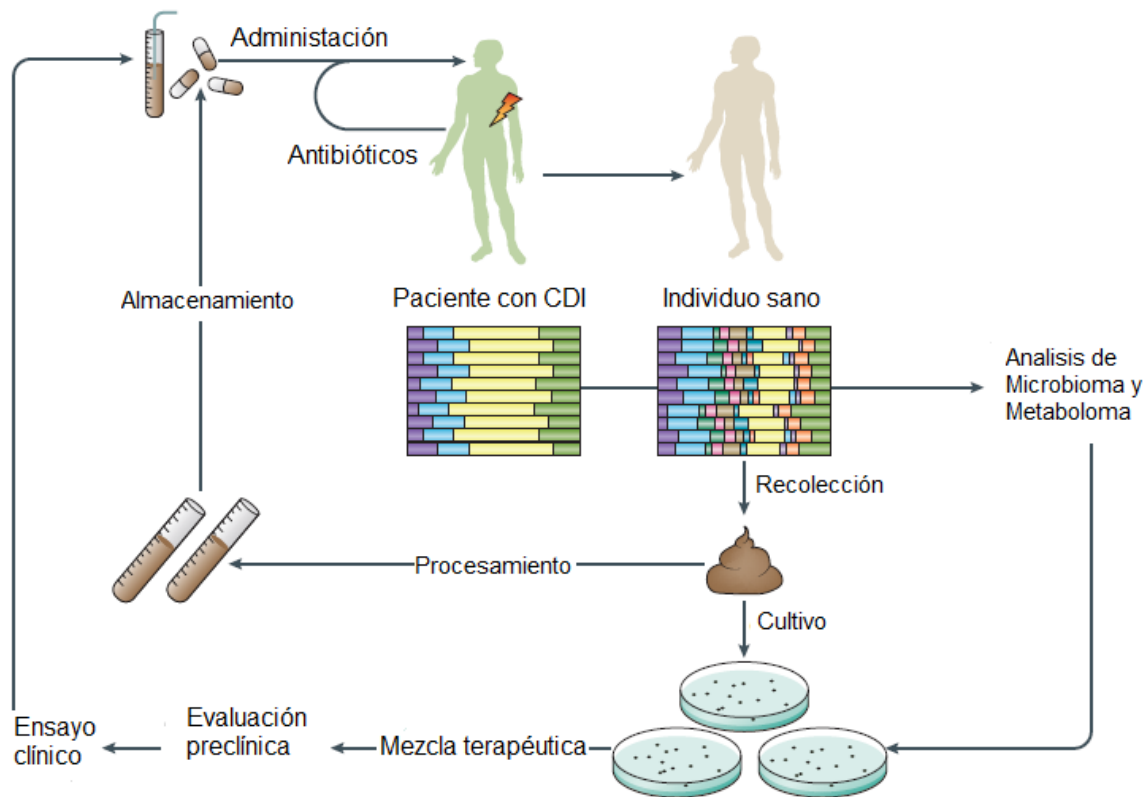


Figura 8. Proceso del trasplante de microbiota fecal. Modificado de (Smits et al., 2016)

3. ANTECEDENTES

3.1 Antecedentes generales

3.1.1 Toxinotipos

La toxinotipificación es un método para clasificar cepas de *C. difficile* en grupos de acuerdo con cambios específicos dentro de los genes de la toxina. A pesar de que TcdA y TcdB son importantes para *C. difficile* virulencia, muchas cepas presentan variaciones en el PaLoc. Los cambios en los genes de las toxinas *tcdA* y *tcdB* pueden variar desde deleciones muy mínimas limitadas a solo *tcdA* y algunas mutaciones puntuales en *tcdB* y deleciones grandes que dejan solo un remanente del PaLoc. Actualmente, diferentes toxinotipos son endémicos o están asociados con brotes en varios países.

La tipificación por toxintipificación de *C. difficile*, un método de tipificación basado en polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) por PCR que distribuye las cepas en toxintipos al compararlas con una cepa de referencia, por ejemplo, VPI 10463, en la que los genes de la toxina se secuenciaron por primera vez. Las cepas similares a VPI 10463 se definen como cepas no variables de toxintipo 0 y las cepas con cambios en los genes *tcdA* y *tcdB* se definen como cepas variantes y se distribuyen en 34 toxintipos designados con números romanos (I a XXXIV). Los toxintipos más prevalentes en aislados humanos son el toxintipo III (PCR ribotipo 027), IV (PCR ribotipo 023), V (PCR ribotipo 078/126) y VIII (PCR ribotipo 017) (Hunt & Ballard, 2013; Rupnik & Janezic, 2016).

3.1.2 Ribotipificación

Para *C. difficile* se han desarrollado diferentes métodos de tipificación, el método más utilizado en Europa, y que también ha recientemente fue adoptado en los EE. UU., es el ribotipado por PCR.

El método se basa en la amplificación de la región espaciadora intergénica (ISR) entre los genes de ARNr 16S y 23S. Los ISR difieren en longitud de 200-600 pb, la amplificación por PCR de los ISR con un solo par de cebadores da como resultado un patrón de bandas, específico para un determinado ribotipo de PCR.

Los ribotipos de PCR se pueden determinar comparando los patrones de bandas con los ribotipos de PCR de referencia utilizando el software apropiado por ejemplo BioNumerics (Applied Maths, Belgium) que se utiliza con mayor frecuencia para el análisis de perfiles de bandas y la creación de bases de datos y bibliotecas de referencia. De tal forma que se considera que los aislados que tienen patrones de bandas idénticos pertenecen al mismo ribotipo de PCR y si dos aislamientos difieren en una sola banda, pertenecen a diferentes ribotipos de PCR (Janezic, 2016).

Se han identificado al menos 375 ribotipos diferentes de *C. difficile* y el número sigue aumentando con cada nuevo estudio epidemiológico (Hunt & Ballard, 2013).

3.1.3 Epidemiología

Desde el punto de vista epidemiológico se han producido cambios importantes desde finales de los años noventa. Entre los años 2000 y 2005 se duplicaron los casos de diarrea asociada a *C. difficile* (DACD) en hospitales estadounidenses y algunos hospitales de Montreal (Quebec, Canadá) donde reportan tasas 4 veces superiores en comparación con las encontradas en el año 2000 (Pépin et al., 2004). Estos cambios son atribuidos a la aparición y diseminación de una cepa epidémica conocida como cepa B1/NAP1/027 (por presentar el patrón de restricción [REA] tipo B1, el patrón de campo pulsado NAP1 y pertenecer al ribotipo 027), la presencia de esta cepa ha sido ampliamente documentada en Estados Unidos, Canadá y en algunos países europeos, como el Reino Unido, Bélgica, Alemania, Holanda, Francia, Italia, Dinamarca, Irlanda, Austria, Polonia, Suiza, Noruega, Finlandia y España ; en Asia, incluyendo Japón, Corea y Hong Kong; y en Australia (Baldan et al., 2010; Freeman et al., 2010; He et al., 2013).

Esta cepa de *C. difficile* B1/NAP1/027 se ha estudiado a profundidad, observando que presenta una mayor virulencia asociada a la expresión de la toxina binaria y a la mutación del gen regulador negativo *tcdC*, mostrando además resistencia a fluoroquinolonas. Su asociación con una mayor morbilidad y mortalidad la llevó a ser etiquetada como “hipervirulenta” (Loo et al., 2005).

Existen diferencias marcadas entre las primeras cepas que se describieron o también llamadas cepas históricas (Hist) y las cepas hipervirulentas/ epidémicas (HV/Ep) de *Clostridium difficile* (Figura 9). Las cepas históricas contienen *tcdC* de longitud completa, pero carecen de la toxina binaria además de ser generalmente sensibles a las fluoroquinolonas, tienen un fenotipo de agregación positivo y no son móviles. Las cepas hipervirulentas carecen del gen *tcdC* de longitud completa y tienen el fenotipo opuesto de las cepas históricas para los factores de virulencia involucrados en la agregación y motilidad. Por otro lado, se analizó el genoma de una cepa histórica con una hipervirulenta y se encontró que comparten un core o ADN central de 3247 genes, 505 genes fueron exclusivos de la cepa histórica y estaban ausentes en las cepas hipervirulentas de *C. difficile*. Mientras que las cepas hipervirulentas portaban 234 genes exclusivos de sus genomas que están ausentes

en la cepa histórica. Además de las diferencias conocidas en *tcdB*, *tcdC* y la presencia de los genes que codifican la toxina binaria, la cepa hipervirulenta exhibió mutaciones en *gyrA* que pueden explicar su resistencia única a las fluoroquinolonas. En otros estudios se encontró que TcdB en las cepas hipervirulentas era capaz de entrar en las células más rápidamente y translocarse al citosol que la toxina de la cepa histórica (Hunt & Ballard, 2013)

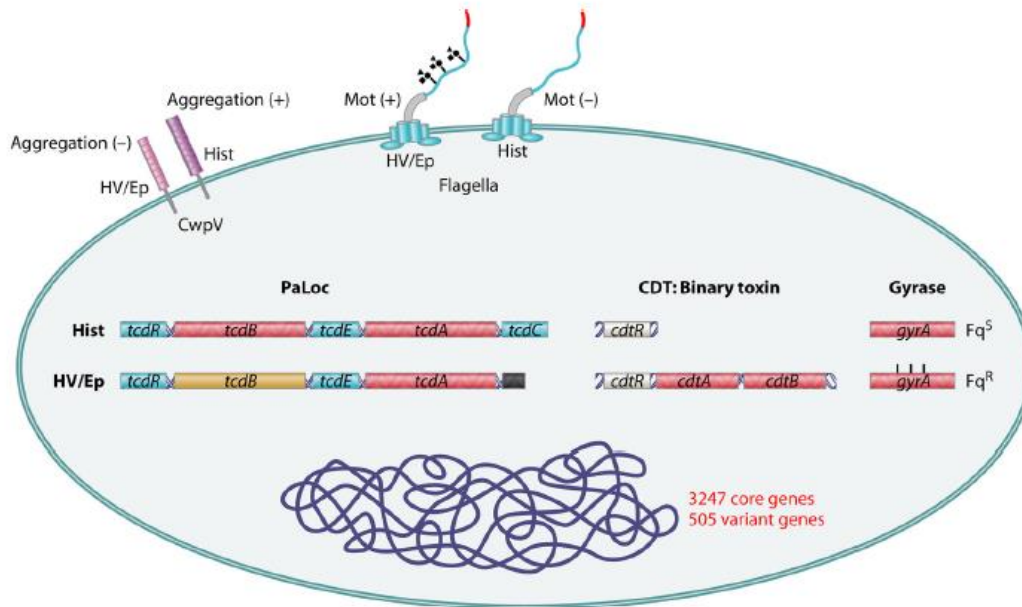


Figura 9. Comparación de factores asociados a la virulencia entre cepas de *C. difficile* históricas e hipervirulentas. Las cepas históricas (Hist) e hipervirulentas / epidémicas (HV / Ep). Las cepas históricas contienen *tcdC* de longitud completa, pero carecen de la toxina binaria, tienen un fenotipo de agregación positivo (+) y no son móviles Mot (-). Las cepas hipervirulentas carecen del gen *tcdC* de longitud completa. CwpV (proteínas de pared celular). Tomado de (Hunt & Ballard, 2013).

En Europa, dependiendo del país, se han descrito otros ribotipos como el 001, 053 y 106, o el 078 que posee un mecanismo similar de hiperproducción de toxinas y, por tanto, también es capaz de producir brotes de la enfermedad (Rupnik et al., 2009). Se espera que el impacto del CDI sea considerable en los próximos años. La evidencia epidemiológica sugiere que un número cada vez mayor de casos de CDI está relacionado con poblaciones que generalmente se consideraban de bajo riesgo (Hensgens et al., 2014). *Clostridium difficile* causó casi medio millón de infecciones entre pacientes en los Estados Unidos en un solo año (Figura 9) aproximadamente

29,000 pacientes murieron dentro de los 30 días posteriores al diagnóstico inicial de *C. difficile*. De ellos, se estima que alrededor de 15.000 muertes son atribuibles directamente a *C. difficile* y más del 80 por ciento de las muertes asociadas con *C. difficile* ocurrieron entre estadounidenses de 65 años o más. Se encontró también que 1 de cada 5 pacientes con una infección por *C. difficile* experimentaron una recurrencia de la infección y 1 de cada 11 pacientes de 65 años o más con una infección por *C. difficile* asociada con la atención médica, murió al mes de haber sido diagnosticado (figura10) (Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades por sus siglas, CDC).

Dada la gravedad de la infección y las estancias prolongadas en hospitales, se estima una carga económica de \$ 5.4 billones de dólares en lugares de atención médica y \$ 725 millones de dólares en entornos comunitarios de América del Norte (Desai et al., 2016).

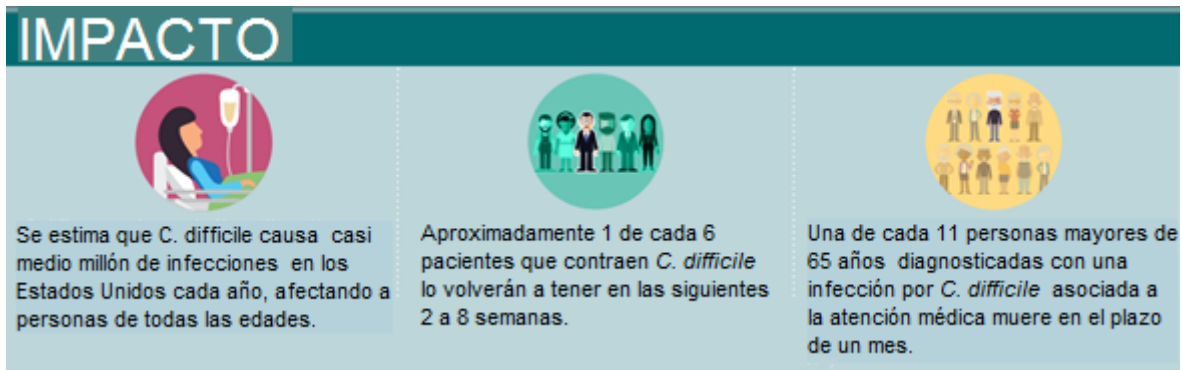


Figura 10. Impacto de la Infección causada por Clostridium difficile tomado de CDC.

La Infección por *C. difficile* en América del Norte y Europa se encuentra bien documentada, pero se sabe muy poco sobre la propagación de esta enfermedad en América Latina, solo existen pocos estudios publicados. Recientemente se han reportado el aislamiento y detección de la cepa 027 / BI / NAP1 en pacientes con la infección asociada a *C. difficile* (CDI) en Costa Rica, Panamá, Chile y México (figura 11) (López-Ureña et al., 2014; Morfin-Otero et al., 2016; Álvarez-Hernández et al., 2018). Quesada-Gómez y colaboradores reportaron que la cepa epidémica 027 de

3.2 Antecedentes específicos

3.2.1 Portador asintomático de *C. difficile*

El ser portador y la colonización a menudo se consideran términos intercambiables. La colonización asintomática de *Clostridium difficile* es la condición donde la bacteria es detectada en ausencia de síntomas o infección (Donskey et al., 2015; Furuya-Kanamori et al., 2015). La colonización asintomática de *C. difficile* es común en las instalaciones de atención sanitaria y en la comunidad, puede atribuirse a cepas toxigénicas o no toxigénicas, esto se ha visto en países como Estados Unidos, Canadá, Japón, Reino Unido, e Irán (Zacharioudakis et al., 2015). En los hospitales, la prevalencia de colonización asintomática varía del 7% a 18%, dependiendo de la duración de la estadía, de enfermedad subyacente y posiblemente del uso de medicación ácido-supresora, además de la exposición a antibióticos y a *C. difficile*. Durante los brotes, las tasas de colonización pueden aumentar hasta más del 50% (Riggs et al., 2007). Las manos de los trabajadores de la salud, contaminadas transitoriamente con esporas de *C. difficile*, son probablemente el principal medio por el cual el organismo se propaga durante los períodos sin brote (Friedman et al., 2013). La colonización asintomática en la comunidad es menor que en el entorno de la atención de salud y está en el rango de 3-15% esto depende de las características del huésped, del patógeno y factores ambientales. El estudio que informó el 15% de colonización fue un estudio de cohorte prospectivo realizado en siete grupos de individuos sanos que representan diversas ocupaciones en Japón, los grupos estaban compuestos por estudiantes universitarios, trabajadores de hospitales, empleados de una empresa y fuerza de defensa personal (Furuya-Kanamori et al., 2015).

Varios estudios reportan altas tasas de portadores asintomáticos (25-35%) en niños durante el primer año de vida y la tasa disminuye (hasta 15%) entre las edades 1-8 años (Crobach et al., 2018; Leibowitz et al., 2015). Aunque la relevancia clínica de colonización por *C. difficile* en lactantes se considera menos significativa debido a las bajas tasas de enfermedad en esta población, permanece su potencial como reservorio de transmisión para adultos. A los bebés rara vez se les diagnostica CDI. Curiosamente, se pueden detectar altos niveles de toxina libre en muestras fecales

de niños pequeños sin síntomas diarreicos. Se ha postulado que los infantes permanecen asintomáticos en presencia de altos niveles de toxinas debido a la ausencia de los receptores en su tracto gastrointestinal aún en desarrollo. Se cree que los bebés pueden carecer de la maquinaria celular necesaria para la internalización celular de la toxina, como los receptores de la toxina o los elementos de la cascada de patogénesis identificados en estudios con animales. En 1 modelo experimental, se demostró que el íleon de conejo recién nacido carece de receptores de toxina A intestinal que se consideran necesarios para el daño de la mucosa mediado por toxinas. Una situación similar ocurre en conejos recién nacidos que son resistentes a la toxina Shiga. Esto se atribuye al desarrollo relacionado con la edad del receptor de la toxina glicolípidica Shiga CB₃, que es bajo o ausente en conejos recién nacidos y solo alcanza los niveles de adultos después del destete. Por otro lado se cree que la presencia de microbiota intestinal se encuentra inestable en los primeros 2-3 años de vida (Bergström et al., 2014). También se ha mencionado el efecto protector de la leche materna, se cree que las fracciones de inmunoglobulina de la leche materna inhiben la unión de la toxina A y también puede tener un efecto sobre el microbioma intestinal y (Shim, 2014). Además, se postula que los genes de las toxinas pueden estar expresados mínimamente o no y por lo tanto no causan enfermedad, pero esto no es un hecho aceptado ya que en estudios la evidencia sugiere recuentos bacterianos similares de *C. difficile* en adultos sintomáticos y lactantes sanos. Los pacientes adultos con colitis pseudomembranosa albergan *C. difficile* que varía de 10⁵ a 10⁹ bacterias por gramo de heces húmedas, mientras que los bebés sanos tienen recuentos de hasta 10⁸, bacterias por gramo de heces sin ningún síntoma evidente. También se encontró que los títulos de toxinas en las heces eran similares para recién nacidos sanos y adultos con diarrea asociada a *C. difficile*. Nueve estudios examinaron las tasas de colonización de cepas productoras de toxinas en bebés sanos. Al combinar los datos de estos estudios, el 13% de 928 lactantes sanos portaban cepas de *C. difficile* toxigénicas frente al 17% de cepas no toxigénicas. Sin embargo, comprender las tasas de colonización de cepas toxigénicas puede proporcionar una mayor comprensión de la relevancia de esta población como reservorio de

transmisión a adultos (Crobach et al., 2018; Jangi & Lamont, 2010). Por ejemplo, (Stoesser et al., 2011) compararon cepas de *C. difficile* en niños y adultos dentro de la misma institución, se extrajo ADN de subcultivos de una sola colonia incubados durante 48 horas en agar sangre, los extractos se secuenciaron utilizando la tecnología Illumina HiSeq 2000 (Illumina Inc, San Diego, CA), generando lecturas de 100 pares de bases y determinaron nueve tipos de secuencias compartidas entre el 20% de pacientes pediátricos sanos y pacientes adultos sintomáticos.

Los aislamientos de lactantes han mostrado un predominio de ribotipos asociados con CDI. (Adlerberth et al., 2014) encontraron que el 71% de los niños colonizados tenían cepas toxigénicas, con más de la mitad identificados como ribotipos, que pueden causar CDI endémica.

Una explicación para la reducción en las tasas de colonización después de la infancia es que, a los 12 meses, la distribución de la flora intestinal comienza a parecerse mucho a la de un adulto sano, proporcionando una colonización con efecto de resistencia. No obstante, estudios contemporáneos han informado tasas más altas (hasta 30%) de colonización asintomática entre poblaciones pediátricas no lactantes (Crobach et al., 2018).

Existen ciertos factores que actúan en conjunto durante la colonización asintomática por *C. difficile* evitando su progresión a la CDI. Estos factores se pueden clasificar como mediados por el huésped o relacionados con el patógeno (figura 12). En cuanto a los factores mediados por el huésped primeramente la composición de la microbiota restringe o permite la colonización de *C. difficile*. Se ha observado que la presencia en cantidades importantes de una especie de Firmicutes como *R. gnavus* está asociado con la colonización por *C. difficile*. En contraste, la presencia de *Bifidobacterium spp.* parece estar relacionado con una ausencia de colonización por *C. difficile* y podría participar en las propiedades de resistencia a la colonización de la microbiota intestinal infantil. Sin embargo, se necesitan más estudios confirmatorios (Rousseau et al., 2011). Otro factor es la presencia de ciertos compuestos como las bacteriocinas o los péptidos antimicrobianos que inhiben la proliferación y germinación de *C. difficile*. Por otro lado, existe evidencia sustancial de que la colonización asintomática de *C. difficile* no toxigénico tiene un efecto

protector contra la progresión a la enfermedad a través de una respuesta inmunomediada (Furuya-Kanamori et al., 2015).

En un estudio realizado por (Kyne et al., 2000) en pacientes hospitalarios mostró que, en el momento de la colonización, los niveles de IgG eran más altos en pacientes colonizados asintómicamente por *C. difficile* en comparación con pacientes que posteriormente desarrollaron diarrea. Los mismos autores demostraron que los pacientes con un solo episodio de diarrea habían aumentado los niveles de IgM contra las toxinas A, B y antígenos no tóxicos en comparación con los pacientes con enfermedad recurrente, lo que indica que la presencia de estos anticuerpos confiere un efecto protector. Muchos niños sanos y aproximadamente el 60% de los adultos tienen anticuerpos IgG e IgA séricos detectables para las toxinas A y B de *C. difficile*, incluso cuando no se detecta el organismo. Si los anticuerpos se estimulan durante la infancia y a través de una mayor exposición a *C. difficile* del medio ambiente, sugeriría que la protección contra CDI es una característica dinámica mediada por el anfitrión (Furuya-Kanamori et al., 2015).

Acerca de los factores relacionados con el patógeno se cree que la colonización por cepas no toxigénicas de *C. difficile* puede ofrecer protección contra la infección, esto a través de la competencia por los nutrientes o acceso a células epiteliales de la mucosa. La competencia entre cepas de clostridios puede reducir la proliferación de cepas patógenas y por lo tanto aparición de enfermedades (Furuya-Kanamori et al., 2015).

Un meta-análisis de cuatro estudios, mostró que los pacientes colonizados asintómicamente con *C. difficile* en realidad tenían un menor riesgo de desarrollar posteriormente CDI, pero no se hizo distinción entre la colonización por cepas toxigénicas y no toxigénicas (Shim et al., 1998). Un estudio reciente incluyó pacientes que se encontraban colonizados con cepas toxigénicas antes del ingreso hospitalario (Zacharioudakis et al., 2015). En este estudio, a diferencia del anterior (Shim et al., 1998), los pacientes con CDI previa no fueron excluidos y esto podría haber confundido los resultados. En general, los pacientes que fueron tox+ tenían un mayor riesgo de desarrollar CDI. Por el contrario, los pacientes colonizados por

cepas no toxigénicas no parecen tener un mayor riesgo o incluso están protegidos de progresar a CDI. Este concepto fue probado recientemente en humanos; en un estudio de fase clínica 2 que se realizó en centros de investigación de Estados Unidos, Canadá y Europa, donde a pacientes que habían tenido CDI y habían completado con éxito el tratamiento de antibióticos (metronidazol o vancomicina) de atención estándar, se les administro esporas de una cepa de *C. difficile* no toxigénico para colonizarlos. La colonización fue bien tolerada y segura, además de haber reducido significativamente las tasas de recurrencia de CDI (Gerding et al., 2015). Sin embargo, más exploraciones de este enfoque deben considerar que las cepas no toxigénicas pueden volverse toxigénicas mediante la transferencia horizontal de genes, ya que en un estudio se demostró que el PaLoc de una cepa toxigenica era capaz de transferirse mediante un mecanismo similar a la conjugación a cepas no toxigénicas, además que eran capaces de la producción de toxinas inclusive a un nivel similar que la cepa donante. Claramente, si el PaLoc es capaz de transferirse a las cepas no toxigénicas que se utilizan en tratamientos, será importante conocer las condiciones bajo las cuales se selecciona la transferencia del PaLoc, aunque se desconoce si este proceso también ocurre en el huésped humano (Brouwer et al., 2013).

Los pacientes colonizados de forma asintomática pueden arrojar esporas a su entorno y, en consecuencia, a otros pacientes. Ya en 1992, se reconoció que la adquisición nosocomial de una cepa de *C. difficile* fue precedida por la introducción de esa cepa a la sala por un paciente colonizado asintóticamente (Clabots et al., 1992). Sobre la base de un modelo epidemiológico de la transmisión de *C. difficile* en entornos de atención de la salud, se demostró que el ingreso de pacientes colonizados desempeña un papel importante en el mantenimiento de la transmisión dentro de las salas hospitalarias (Lanzas et al., 2011).

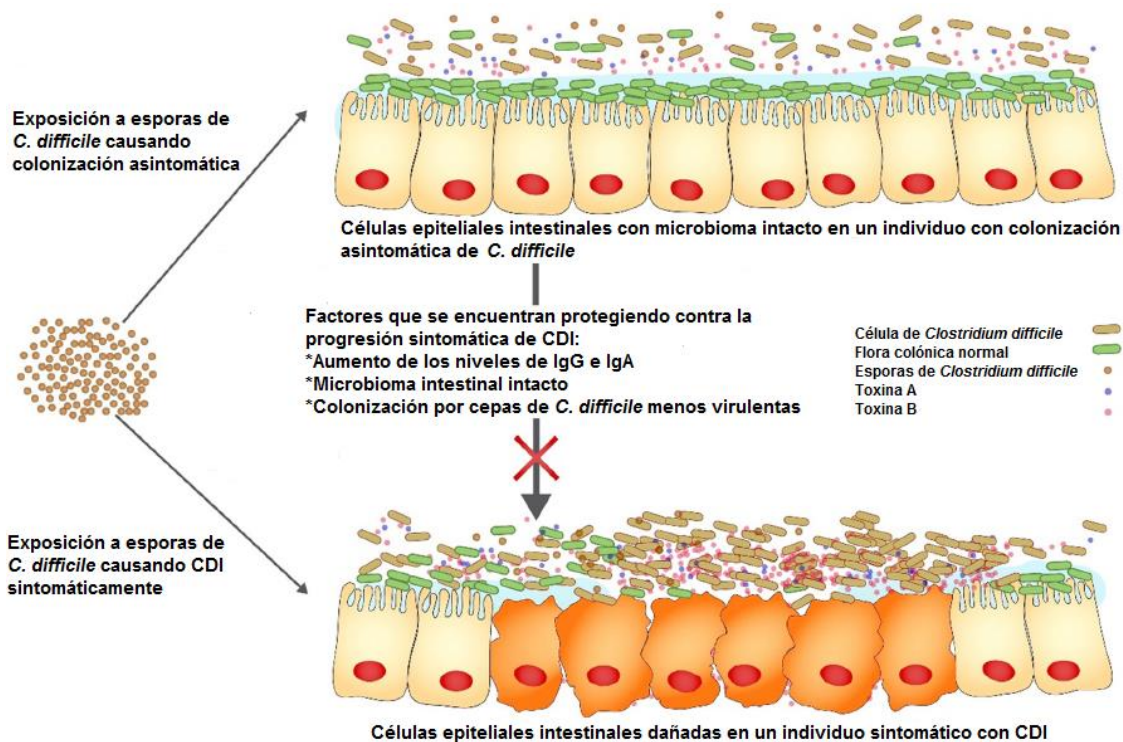


Figura 12. Factores de Riesgo de colonización asintomática por *C. difficile* y progresión a infección por *C. difficile* (CDI). Modificado de (Furuya-Kanamori et al., 2015).

4. JUSTIFICACIÓN

La incidencia de la infección causada por *C. difficile* se ha incrementado a nivel mundial debido a los brotes epidémicos provocados por la cepa hipervirulenta (027/BI/NAP-1) y se ha convertido en uno de los principales patógenos causantes de infecciones nosocomiales en países desarrollados. En América Latina la presencia de *Clostridium difficile* es poco reportada por lo que la realización de este trabajo tendrá como beneficio la generación de conocimiento acerca de la presencia de este patógeno en México, principalmente en portadores asintomáticos que podrían representar un riesgo epidemiológico.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México no existen estudios sobre portadores asintomáticos por lo que es importante realizar un estudio que nos permita conocer si *C. difficile* se encuentra colonizando asintomáticamente a grupos de la comunidad como niños y adultos ya que existe evidencia epidemiológica que sugiere un número cada vez mayor de casos en grupos que se consideran de bajo riesgo. Además, conoceremos si las cepas de *C. difficile* que colonizan asintomáticamente a las personas mexicanas pueden ser toxigénicas o no toxigénicas. De esta manera se podrá comparar si la situación en México, respecto a la presencia de *C. difficile*, se asemeja a lo reportado en otros países de Norte América y Europa donde ha provocado serios problemas de salud pública.

6. HIPÓTESIS CIENTÍFICA

Clostridium difficile se encuentra colonizando asintomáticamente a niños y adultos de la ciudad de Puebla y Tehuacán.

7. OBJETIVOS

7.1 Objetivo general

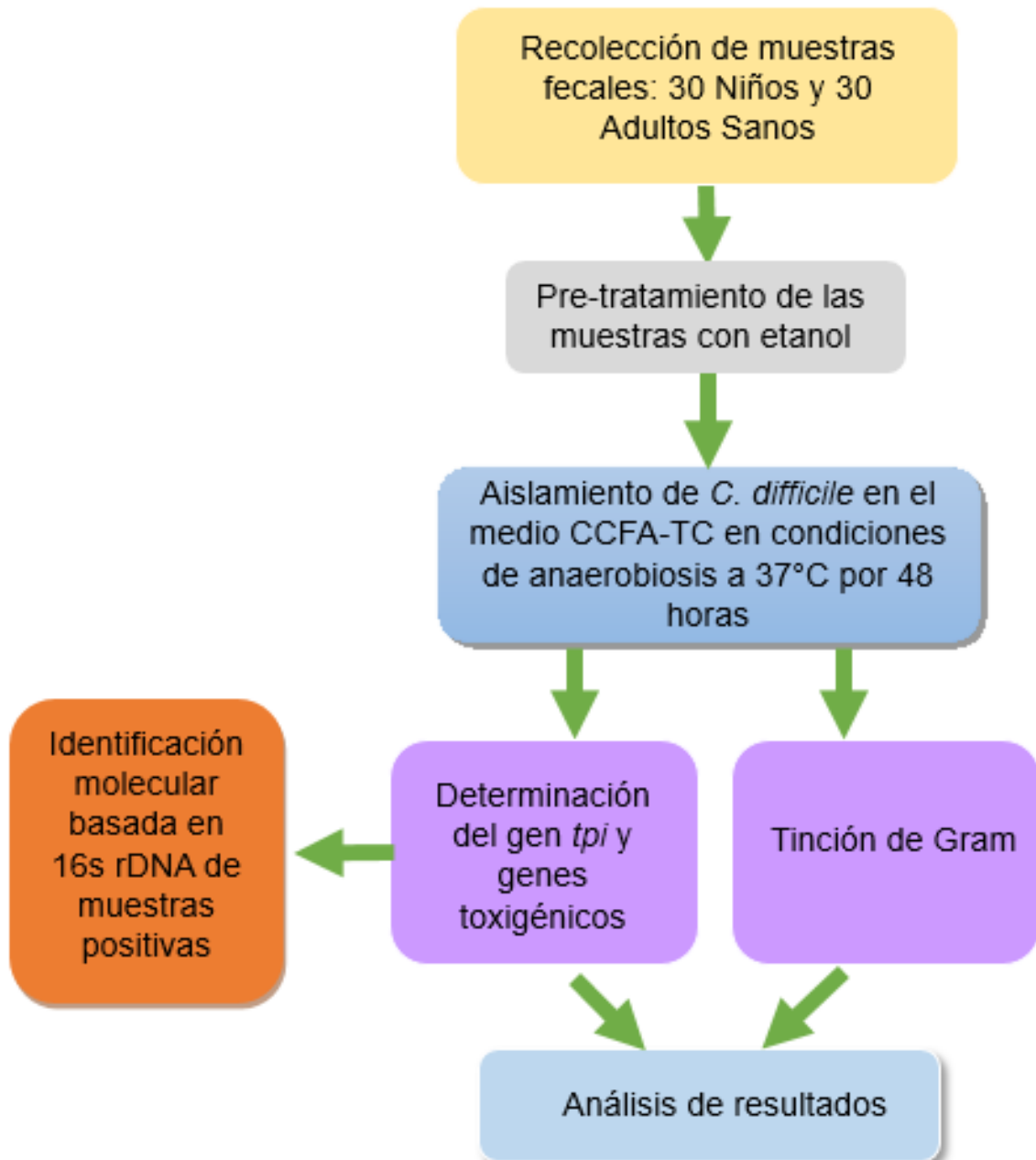
Detectar portadores asintomáticos de *Clostridium difficile* en la ciudad de Puebla y Tehuacán

7.2 Objetivos específicos

1. Aislar *Clostridium difficile* de portadores asintomáticos niños y adultos de la ciudad de Puebla y Tehuacán.
2. Identificar molecularmente las cepas aisladas como *Clostridium difficile*.
3. Identificar cepas toxigénicas y no toxigénicas de *Clostridium difficile*.

8. MATERIAL Y MÉTODOS

8.1 Estrategia de trabajo



8.2 Técnicas y procedimientos

8.2.1 Recolección y procesamiento de las muestras

Se utilizó un formulario como instrumento de recolección de datos clínicos de los donadores (Anexos).

Se recolectaron aleatoriamente muestras de heces fecales de individuos sanos tomando en cuenta los criterios de inclusión, exclusión y eliminación:

Inclusión: se usaron muestras de niños y adultos sanos de sexo indistinto que abarcarán las edades de 1-12 años y ≥ 18 años respectivamente.

Exclusión: se excluyeron las muestras de personas con síntomas diarreicos, tratamiento de antibióticos previo 3 meses, antecedentes de CDI, hospitalización previa, cirugía intestinal y enfermedades gastrointestinales.

Eliminación: se eliminan muestras fecales que, a pesar de provenir de pacientes sanos, presenten consistencia acuosa.

Los mismos donantes tomaron la muestra con la instrucción de que fuera en el mismo día la toma para su entrega, almacenamiento y procesamiento. Las muestras se recolectaron en envases herméticos y se rotularon con el nombre del donante. Se le asignó a cada muestra una clave de identificación. Posteriormente se guardaron en el ultracongelador a menos 70°C para su preservación.

8.2.3 Aislamiento y purificación de las cepas

Se tomó materia fecal de cada muestra (0.5g) y se colocó en tubos eppendorf (tubos de microcentrífuga) a los cuales se les añadió 500ul de etanol absoluto y se mezcló perfectamente hasta disolver la materia fecal. Después se tomaron 100 μ l de la mezcla y se sembraron en placas de medio de cultivo específico para *Clostridium difficile* llamado CCFA-TC (Agar cicloserina-cefoxitina-fructosa y taurocolato) (ver anexos) y se cultivaron las placas en condiciones de anaerobiosis a 37°C durante 48hrs. Algunas especies de clostridios (por ejemplo, *butyricum*, *histolyticum*, *innocuum*, *sordellii* y *subterminale*) pueden crecer en este medio y producir colonias amarillas y fluorescencia. (Edwards et al., 2013).

A partir del crecimiento bacteriano de cada cepa se obtuvieron colonias que se sembraron en placas de Agar BHI (infusión cerebro corazón) adicionado con extracto de levadura, nuevamente se cultivaron en condiciones de anaerobiosis a

37°C durante 48hrs y a partir del crecimiento de estas placas se prepararon tubos con medio líquido de BHI que se cultivaron en condiciones de anaerobiosis y se obtuvieron paquetes celulares para la extracción de ADN genómico y también se fijó el cultivo líquido en portaobjetos para la tinción de Gram (ver anexo) (Edwards et al., 2013).

8.2.4 Extracción de ADN genómico de *C. difficile*: Lisis con Buffer 10 X

Para los lisados se tomó una colonia que se depositó en un tubo eppendorf y se le adiciono 94 µl de buffer 10 x de PCR, posteriormente se añadieron 4µl de lisozima (500 ug/ml) se homogenizo y se incubo a temperatura ambiente durante 15 min, pasado este tiempo se añadieron 2 ul de proteinasa K, se homogenizo con vortex y se incubo a 58°C durante 1 hora y después a 90°C durante 15 min. Después enfriamos en hielo, se centrifugo y se pasó el sobrenadante a un tubo nuevo. Se midió en nanodrop y se ajustó la concentración a 300 ng.

8.2.6 Detección del gen *tpi* para la identificación de *C. difficile*

Para la identificación de *C. difficile* se determinó el gen *tpi*, el cual es un gen de mantenimiento que codifica para la triosa fosfato isomerasa, y ha sido utilizado en otros estudios. Dicho gen tiene un peso de 230 pb al realizar la amplificación del fragmento mediante PCR (Lemee et al., 2004) (ver anexo).

8.2.7 Detección de los genes *tcdA*, *tcdB*, *cdtA* y *cdtB* de *C. difficile*

Para los genes que codifican las toxinas de *C. difficile* *tcdA*, *tcdB*, *cdtA* y *cdtB* se utilizó un par de oligos para cada toxina y las muestras de DNA se ajustaron a una concentración 300 ng (Persson et al., 2008) (ver anexo).

8.2.8 Confirmación de especie basado en RNA ribosomal 16S (*16S rRNA*)

Se utilizó un par de oligos para la amplificación de la región de interés, posteriormente se purifico la banda correspondiente al producto de la reacción de PCR mediante el kit de recuperación de DNA en gel (Zymoclean) y finalmente se mandó a secuenciar al Instituto de Biotecnología de la UNAM (Persson et al., 2008) (ver anexo).

8.2.9 Técnica de Electroforesis

Esta técnica nos permitió visualizar los productos de amplificación de la PCR además de separar fragmentos de ADN por su tamaño y carga.

La electroforesis consistió en aplicar una corriente a través de un gel que contiene las moléculas de interés y debido a su tamaño y carga, las moléculas se desplazaron por el gel a distintas velocidades, y se separaron unas de otras.

En este trabajo los productos de amplificación del gen *tpi* y de las toxinas se separaron en geles de agarosa al 0.8% bajo condiciones de voltaje constante de 85 V y se tiñeron con bromuro de etidio.

9. RESULTADOS

9.1 Recolección de muestras

Se recolectaron un total de 63 muestras fecales durante el periodo de julio 2018 a junio del 2019 provenientes de las ciudades de Puebla y Tehuacán, 30 muestras de adultos siendo 13 varones (43%) y 17 féminas (57%). Además 33 muestras de infantes siendo 22 varones (67%) y 11 féminas (33%) (figura 13). Las edades de los adultos abarcaron de los 19 a los 56 años y el promedio fue 27.1 años, mientras que las edades de los infantes comprendieron de los 8 meses a los 11 años y el promedio fue 4.10 años. En las figuras 14 y 15 se muestran los porcentajes y distribución de las edades de adultos (18-30 años 80% n=24, 30-40 años 3% n=1, 40-50 7% n=2, 50-60 años 10% n=3) e infantes (0-6 meses 0% n=0, 7-12 meses 27% n=9, 2-5 años 43% n=14, 6-9 años 21% n=7, 10-12 años 9% n=3). A cada muestra se le asignó un nombre interno comenzando por un número y clave en letras (CA para muestras de adultos y CI para muestras de Infantes) (Ver anexos 14.7 y 14.8)

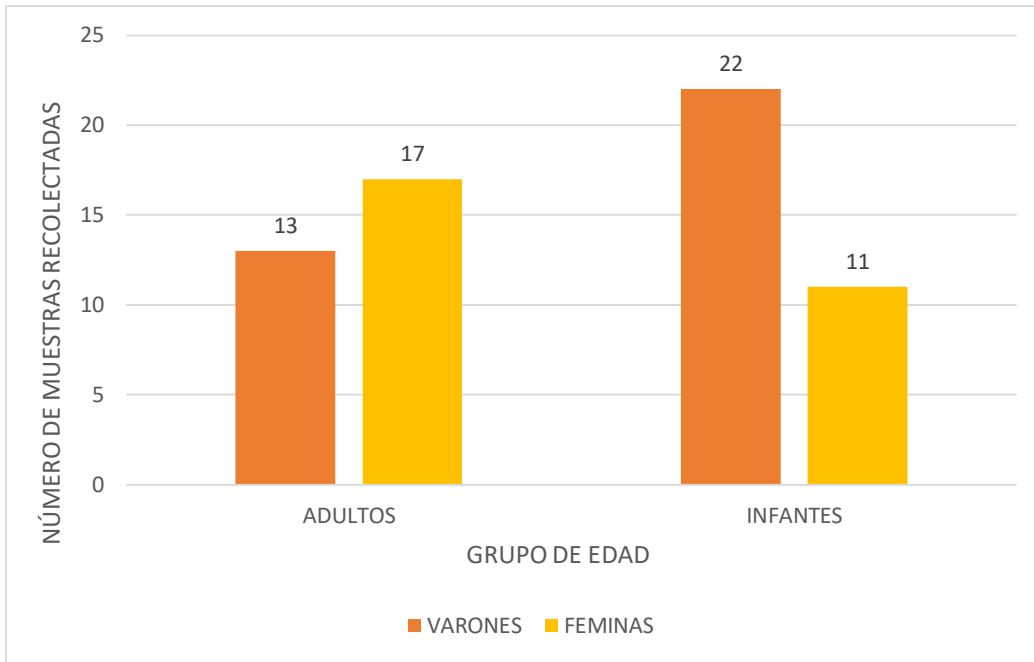


Figura 13. Número de muestras recolectadas por sexo y grupo de edad.

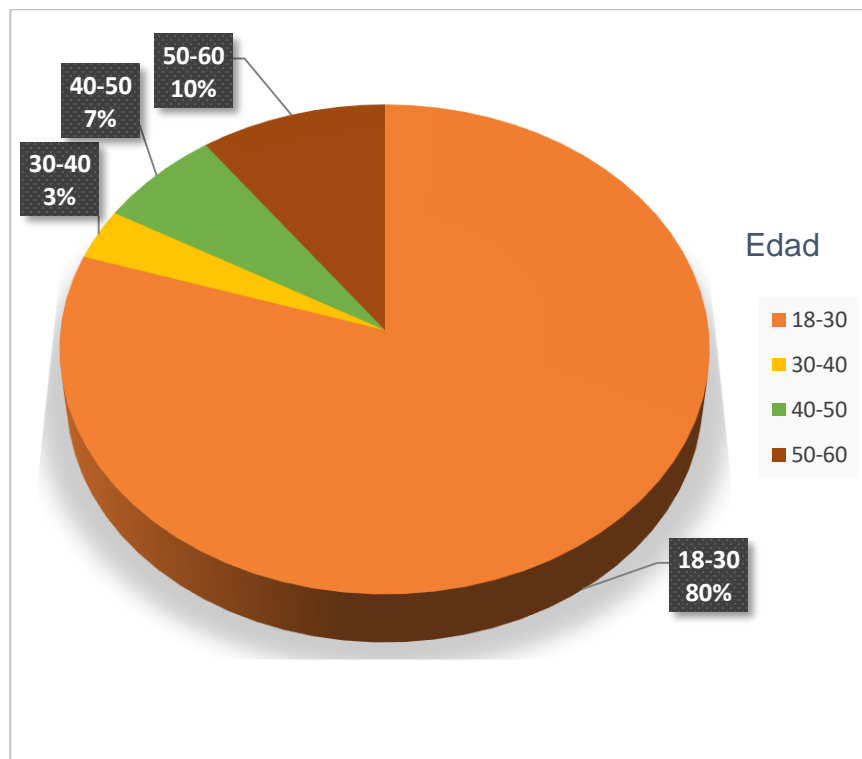


Figura 14. Distribución del grupo de adultos de acuerdo a su edad.

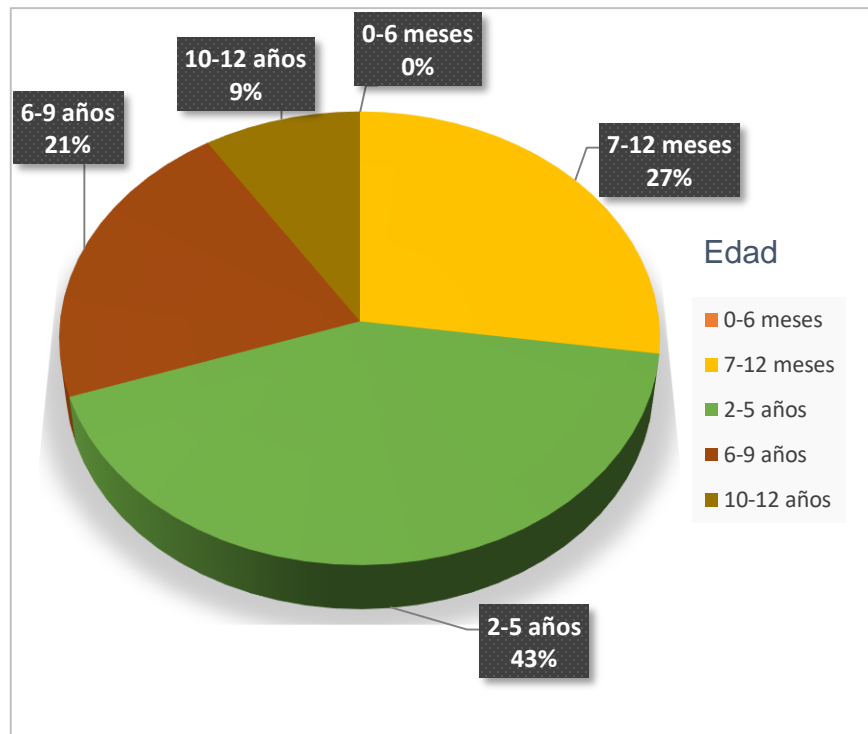


Figura 15. Distribución del grupo de Infantes de acuerdo a su edad.

9.2 Aislamiento de colonias de *C. difficile* en medio CCFA-TC

Las 63 muestras de heces recolectadas tanto de adultos e infantes se trataron con etanol para disminuir microorganismos contaminantes y recuperar solamente microorganismos esporulados. De manera que el 60% n=38 de las 63 muestras recolectadas fueron positivas al cultivo microbiológico (tablas 3 y 6). Por grupo de edad de las 38 muestras positivas al cultivo, 55% n=21 corresponden a adultos y 45% n=17 corresponden a infantes (figura 16). Tanto en las muestras de adultos como de niños se observó morfología colonial correspondiente a *C. difficile*, colonias grandes y amarillas con bordes irregulares. También se observaron otras morfologías como colonias pequeñas de color rosa con consistencia mucoide y colonias pequeñas, redondas de color amarillo, en las placas no se vio heterogeneidad de colonias es decir no se observaron en una misma placa dos morfologías distintas (Figura 17).

Género	Total de muestras	Cultivo en medio CCFA-TC n=63
Hombres	13	7
Mujeres	17	14
Niños	22	13
Niñas	11	4
Total	63	38

Tabla 3. Muestras positivas al cultivo microbiológico por grupo de género.

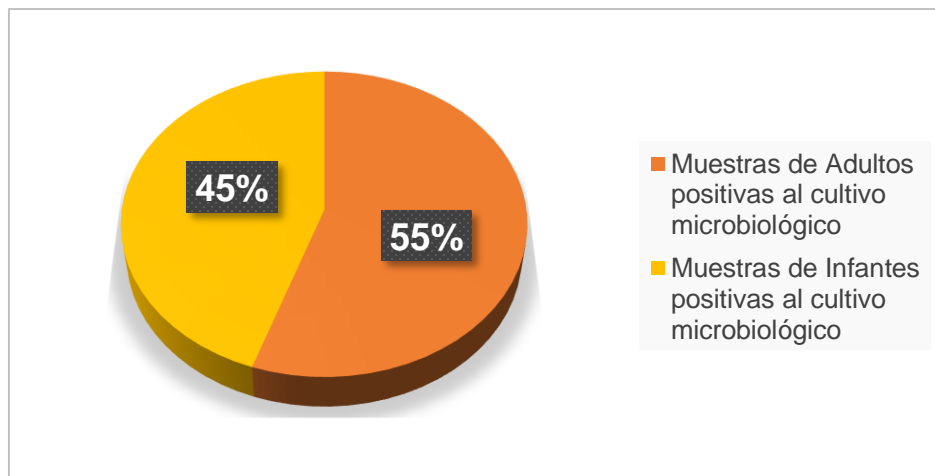


Figura 16. Aislamiento positivo en medio CCFA-TC.

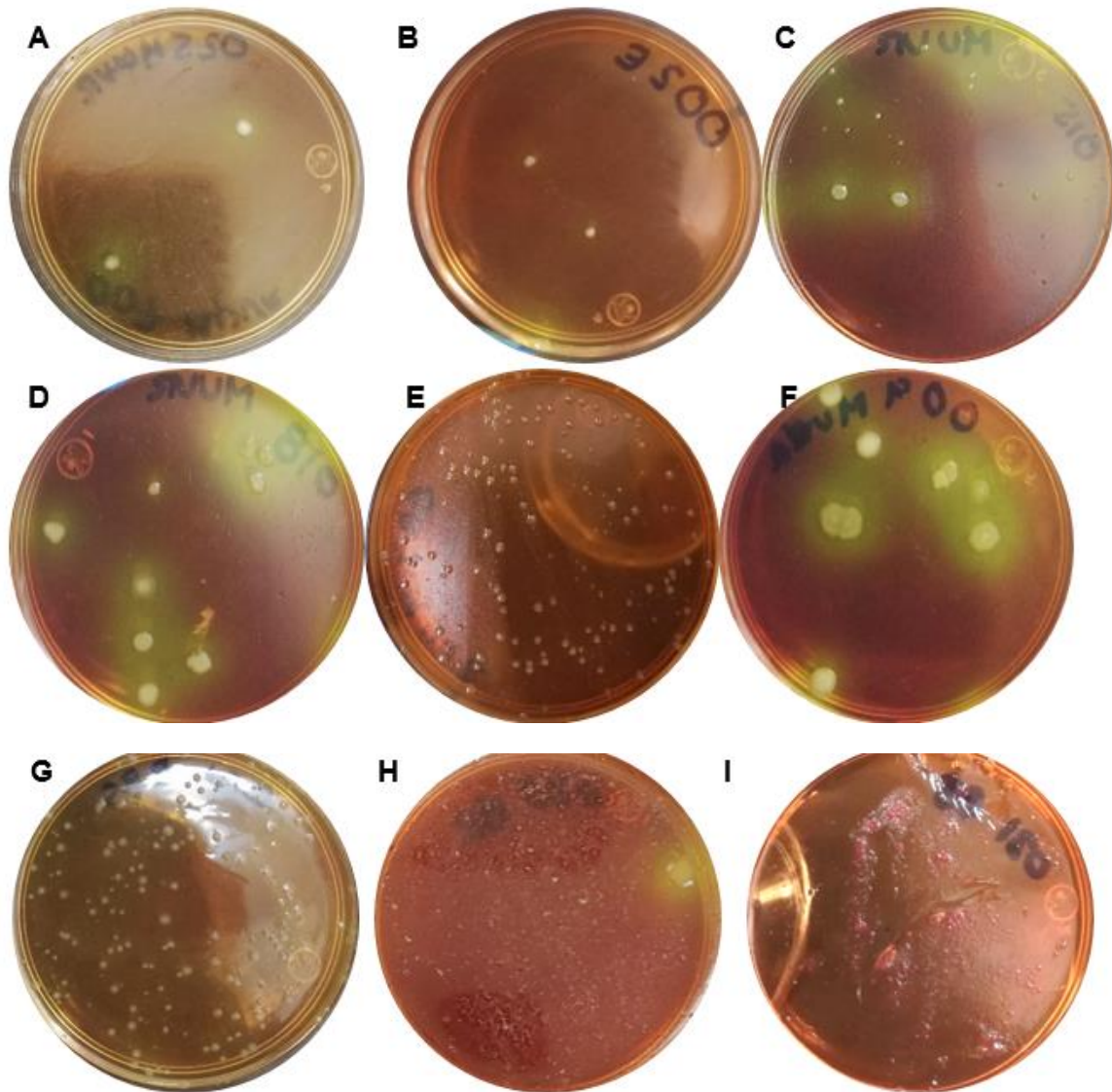
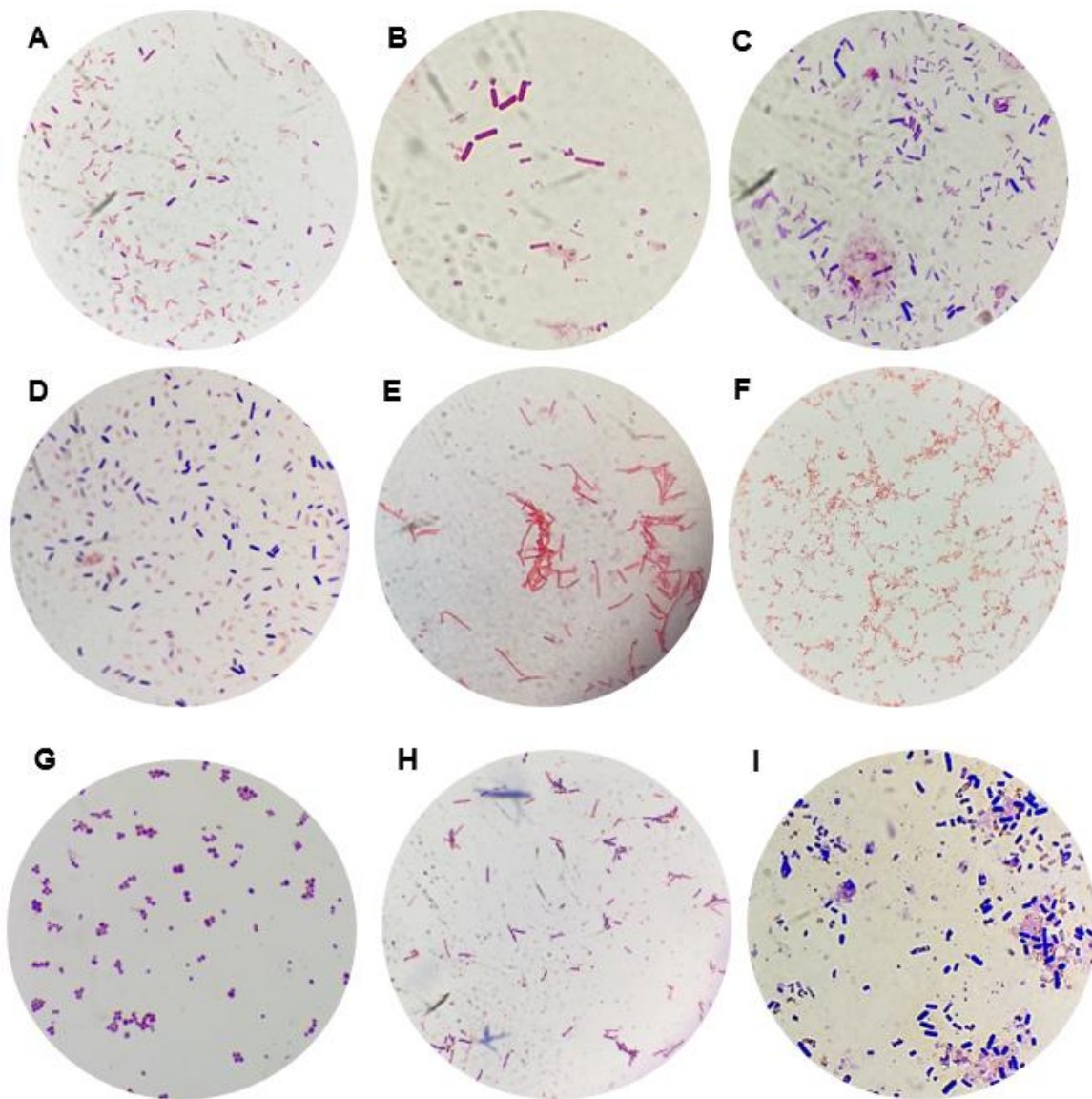


Figura 17. Imágenes representativas del cultivo microbiológico en medio CCFA-TC de muestras fecales de personas sanas. Muestras de Adultos. A: 025 (Morfología típica de *C. difficile*) CA, B: 002 CA (Morfología típica de *C. difficile*), C: 015 CA (Morfología típica de *C. difficile*), D: 018 CA (Morfología típica de *C. difficile*), E: 004 CA (Morfología atípica de *C. difficile*), F: 009 CA (Morfología típica de *C. difficile*) Muestras de Infantes. G: 001 CI (Morfología típica de *C. difficile*), H: 033 CI (Morfología típica de *C. difficile*), I: 031 CI (Morfología atípica de *C. difficile*).

9.3 Tinción de Gram

A partir de las diferentes clonas obtenidas de las muestras que dieron positivo al cultivo en medio CCFA-TC se realizaron tinciones de Gram para determinar la presencia de bacilos Gram positivos que correspondieran a la morfología de *C. difficile* de tal manera que además de observarse bacilos Gram positivos en su mayoría, también se observó otro tipo de morfología como bacilos Gram negativos, cocos Gram positivos y negativos (figura 18).



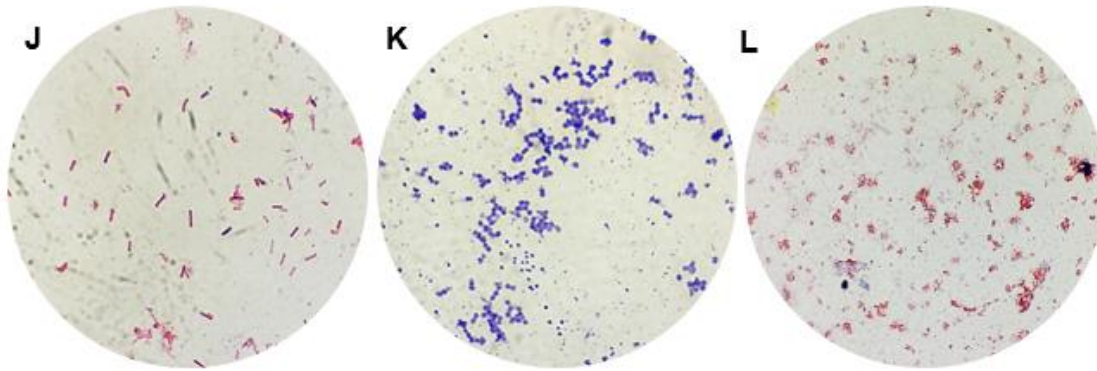


Figura 18. Imágenes representativas de la Tinción de Gram en muestras que crecieron en medio CCFA-TC. Muestras de Adultos. Bacilos Gram positivos: A: 015 CA, B: 018 CA, C: 015 CA, D: 025 CA; otras morfologías: E: 017 CA (bacilos Gram negativos), F: 001 CA (cocos y bacilos Gram negativos), G: 013 CA (cocos Gram positivos). Muestras de infantes. Bacilos Gram positivos: H: 001 CI, I: 027 CI, J: 033 CI; otras morfologías K: 021 CI (cocos Gram positivos), L: 011 CI (cocos Gram negativos).

9.4 Detección del gen *tpi* para la identificación de *Clostridium difficile*

El gen *tpi* codifica la enzima triosa fosfato isomerasa, este gen se ha utilizado como un buen marcador para la identificación de *C. difficile* (Dhalluin et al., 2003). Por lo tanto, se detectó este gen en todas cepas que fueron aisladas de las placas con medio CCFA-TC para verificar la presencia de *Clostridium difficile*, el gen *tpi* se presentó en el 16% n=6 de las 38 muestras recolectadas tanto de adultos como de infantes que dieron positivo al cultivo microbiológico, independientemente de la tinción de Gram. De tal forma que 4 de 21 muestras de adultos amplificaron positivamente el gen *tpi* (002 CA, 015 CA, 018 CA, 025 CA) y 2 de 17 muestras de infantes amplificaron positivamente el gen *tpi* (001 CI y 033 CI) (tablas 4 y 6, figuras 19 y 20).

Solo con las clonas que amplificaron el gen *tpi* se continuo con la amplificación de los genes que codifican para las toxinas de *C. difficile*.

Género	Muestras positivas al Cultivo en medio CCFA-TC	Detección del gen <i>tpi</i> n=38
Hombres	7	1 (3%)
Mujeres	14	3 (8%)
Niños	13	2 (5%)
Niñas	4	0
Total	38	6 (16%)

Tabla 4. Muestras que amplificaron positivamente el gen *tpi* por grupo de género.

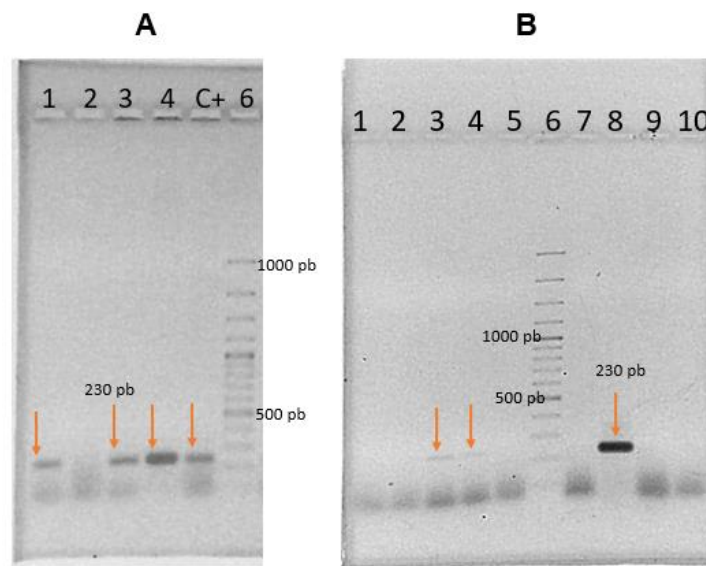


Figura 19. Amplificación del gen *tpi* (230 pb) por PCR. Geles representativos Panel A. Carril 1: 018 CA carril 2: 025 CA; carril 3: 001 CI clona 1; carril 4: 001 CI clona 2; C+: control positivo; carril 6: marcador de peso molecular DNA 1 Kb. Panel B. carril 1: 010 CA; carril 2: 008 CA; carril 3: 025 CA; carril 4: 002 CA; carril 5: 009 CA; carril 6: marcador de peso molecular DNA 1 Kb; carril 7: 001 CA; carril 8: 001 CI clona 3; carril 9: 010 CA; carril 10: 019 CA.

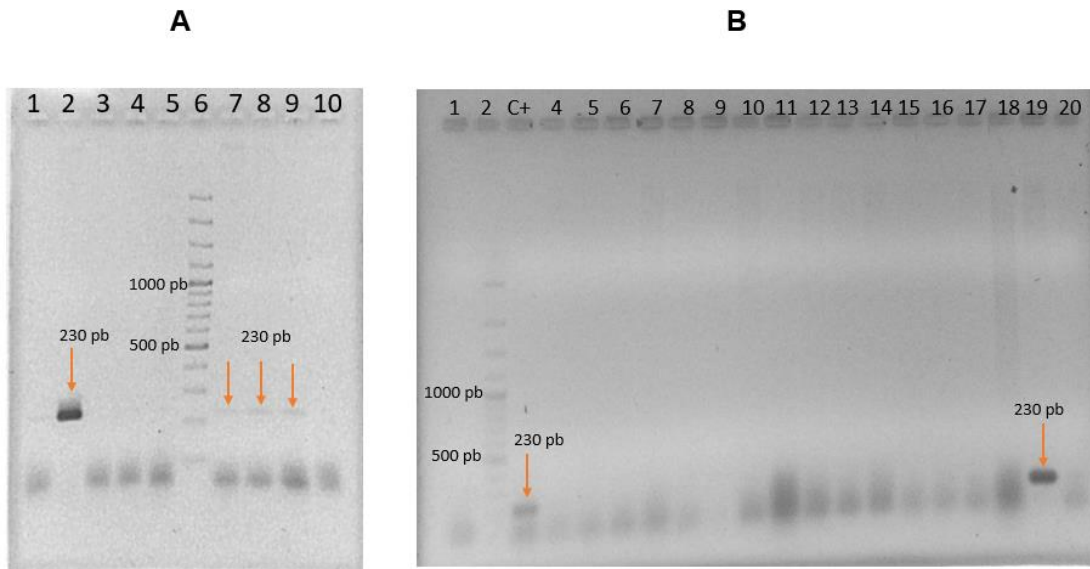


Figura 20. Amplificación del gen *tpi* (230 pb) por PCR. Geles representativos. Panel A. carril 1: 009 CA clona 1; carril 2: 001 CI clona 2; carril 3: 004 CI; carril 4: 019 CA; carril 5: 014 CA; carril 6: marcador de peso molecular DNA 1 Kb; carril 7: 018 CA; carril 8: 015 CA; carril 9: 018 CA; carril 10: 009 CA clona 2. Panel B. carril 1: control negativo; carril 2: marcador de peso molecular DNA 1 Kb; C+: WT control positivo; carril 4: 026 CI; carril 5: 011 CI clona 1; carril 6: 011 CI clona 2; carril 7: 027 CA clona 1; carril 8: 011 CI clona 3; carril 9: 031 CI; carril 10: 027 CA clona 2; carril 11: 016 CI; carril 12: 026 CA; carril 13: 027 CI clona 1; carril 14: 021 CI; carril 15: 027 CI clona 2; carril 16: 029 CA clona 1; carril 17: 027 CA clona 3; carril 18: 011 CI clona 4; carril 19: 033 CI; carril 20: 029 CA clona 2.

9.5 Detección de los genes correspondientes a las toxinas de *Clostridium difficile*: *tcdA*, *tcdB*, *cdtA* y *cdtB*

Con el fin de detectar *C. difficile* toxigénico se amplificaron los genes *tcdA*, *tcdB*, *cdtA* y *cdtB* en las clonas de las 6 muestras positivas a la identificación del gen *tpi* tanto de adultos como de infantes. Nuestros resultados muestran la presencia de *C. difficile* toxigénico en un 33% n=2 de las 6 muestras, corresponden a la muestra de una mujer (025 CA) y un niño (033 CI) (figuras 20, 22 y 23, tablas 5 y 7). Por otro lado, la presencia de *C. difficile* no toxigénico fue de 67% (figura 21) n=4 de las 6 muestras, las cuales corresponden a la muestra de 1 hombre, 2 mujeres y 1 niño (figuras 22, 23, 24 y 25, tablas 5 y 6).

Género	Detección de <i>C. difficile</i> toxigénico		Detección de <i>C. difficile</i> no toxigénico	
	Muestra	Toxinotipo	Muestra	Toxinotipo
Hombres	-	-	015 CA	(<i>tcdA</i> ⁻ <i>tcdB</i> ⁻ <i>cdtA</i> ⁻ <i>cdtB</i> ⁻)
Mujeres	025 CA	(<i>tcdA</i> ⁻ <i>tcdB</i> ⁻ <i>cdtA</i> ⁺ <i>cdtB</i> ⁻)	002 CA 018 CA	(<i>tcdA</i> ⁻ <i>tcdB</i> ⁻ <i>cdtA</i> ⁻ <i>cdtB</i> ⁻)
Niños	033 CI	(<i>tcdA</i> ⁻ <i>tcdB</i> ⁺ <i>cdtA</i> ⁻ <i>cdtB</i> ⁻)	001 CI	(<i>tcdA</i> ⁻ <i>tcdB</i> ⁻ <i>cdtA</i> ⁻ <i>cdtB</i> ⁻)
Niñas	-	-	-	-

Tabla 5. Detección de *C. difficile* toxigénico y *C. difficile* no toxigénico.

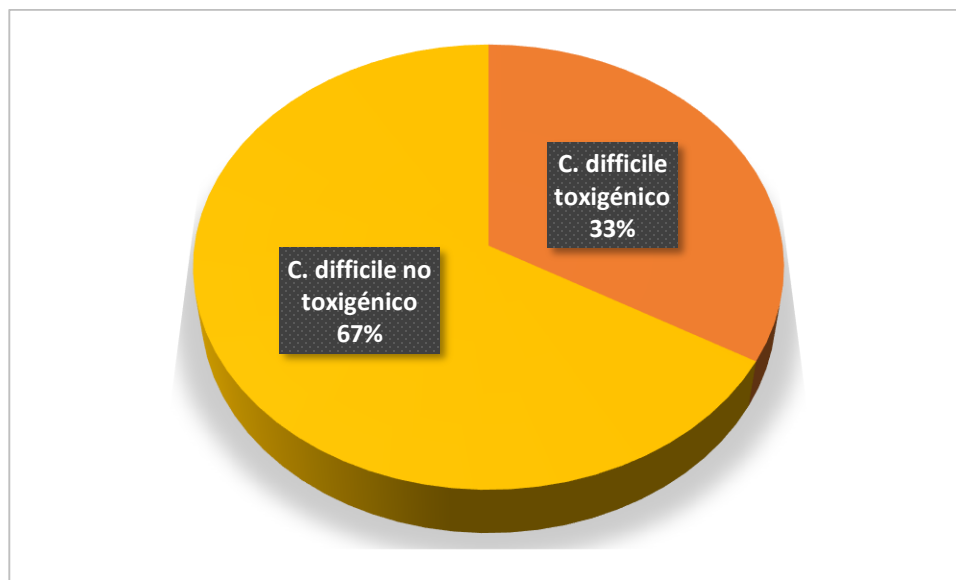


Figura 21. *C. difficile* toxigénico y no toxigénico en muestras positivas a la identificación del gen *tpi*

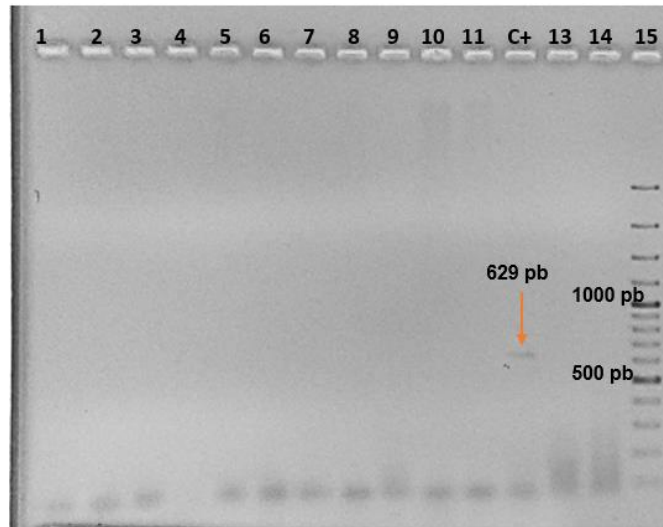


Figura 22. Amplificación del gen *tcdA* (629 pb) por PCR. Gel representativo de la detección del gen *tcdA*. carril 1: 025 CA; carril 2: 002 CA; carril 3: 018 CA clona 1; carril 4: 018 CA clona 5; carril 5: 001 CI clona 2; carril 6: 001 CI clona 1; carril 7: 015 CA clona 1; carril 8: 018 CA clona 2; carril 9: 001 CI clona 3; Carril 10: 001 CI clona 4; carril 11: 033 CI clona 2; carril 12: WT control positivo; carril 13: control negativo; carril 14: *tcdB* 025 CA; carril 15: marcador de peso molecular DNA 1 Kb.

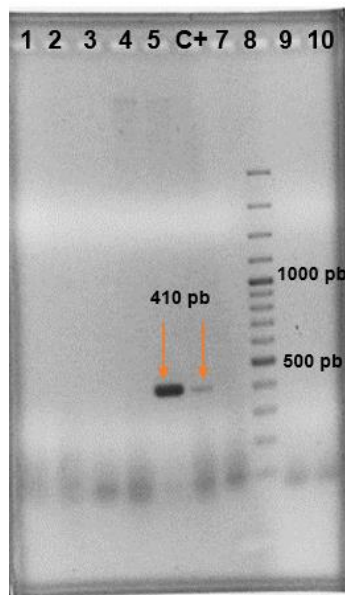


Figura 23. Gel representativo de la detección del gen *tcdB* (410pb) por PCR. Carril1: 015 CA; Carril 2: 018 CA; Carril 3: 001 CI; Carril 4: 001 CI; Carril 5: 033 CI; C+: WT control positivo; Carril 7: control negativo; Carril 8: marcador de peso molecular DNA 1 Kb; Carril 9: gen *cdtA* 025 CA; Carril 10: gen *cdtA* 002 CA.

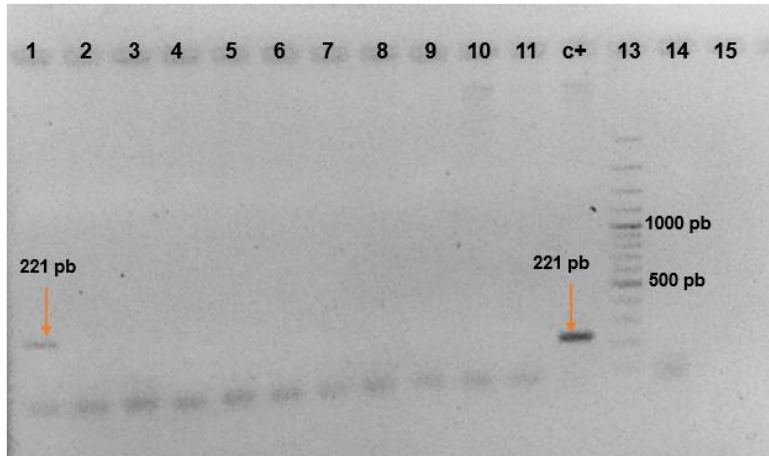


Figura 24. Geles representativos de la detección del gen *cdtA* (221 pb) por PCR. carril 1: 025 CA; carril 2: 002 CA; carril 3: 018 CA; carril 4: 018 CA; carril 5: 001 BB; carril 6: 001 CI; carril 7: 015 CA; carril 8: 018 CA; carril 9: 001 CI; carril 10: 001 CI; carril 11: 033 CI; C+: WT control positivo; carril 13, marcador de peso molecular DNA 1 Kb; carril 14, control negativo; carril 15, vacío.

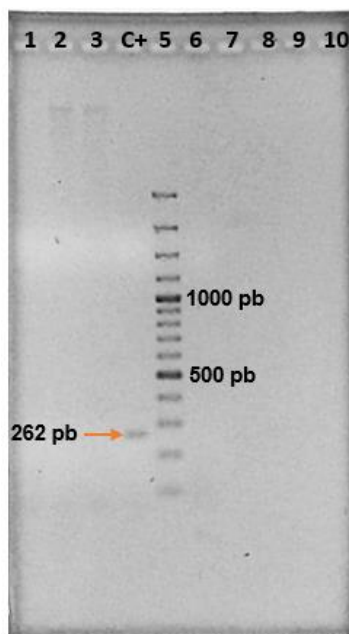


Figura 25. Gel representativo de la detección del gen *cdtB* (262 pb) por PCR. carril 1: 001 CI; carril 2: 001 CI; carril 3: 033 CI; C+: WT control positivo; carril 5: marcador de peso molecular DNA 1 Kb; carril 6: control negativo; 7-10 carriles vacíos.

Total de muestras recolectadas	Cultivo positivo en medio CCFA-TC	Identificación del gen <i>tpi</i>	Detección de <i>C. difficile</i> Toxigénico (Amplificación de los genes de las toxinas)		Detección de <i>C. difficile</i> no toxigénico (<i>tcdA</i> ⁻ <i>tcdB</i> ⁻ <i>cdtA</i> ⁻ <i>cdtB</i> ⁻)
			1 Muestra de Adulto 025 CA	(<i>tcdA</i> ⁻ <i>tcdB</i> ⁻ <i>cdtA</i> ⁺ <i>cdtB</i> ⁻)	
(n=63) 30 Adultos 33 Infantes	60.31% (38/63) 21 Adultos 17 Infantes	16% (6/38) 4 Adultos: 002 CA 015 CA 018 CA 025 CA 2 Infantes: 001 CI 033 CI	1 Muestra de Infante 033 CI	(<i>tcdA</i> ⁻ <i>tcdB</i> ⁺ <i>cdtA</i> ⁻ <i>cdtB</i> ⁻)	3 Adultos: 002 CA 015 CA 018 CA
				(2/6) 33%	(4/6) 67%

Tabla 6. Resumen de resultados del cultivo toxigénico y análisis molecular

9.6 Identificación basada en ARN ribosomal 16S (16S rRNA)

Se resolvió confirmar la identificación de *Clostridium difficile* basada en el gen 16S rRNA de las 6 muestras que dieron positivo al gen *tpi*, tanto de adultos como de niños, por lo que se les realizó a 6 clonas representativas de las muestras la amplificación de la región de interés y posteriormente se purificó la banda correspondiente al producto de PCR (figura 26). Finalmente se mandaron a secuenciar al Instituto de Biotecnología de la UNAM y posteriormente se analizaron las secuencias en la base de datos del GenBank NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica) mediante el programa BLAST (The Basic Local Alignment Search Tool) que encuentra regiones de similitud entre secuencias biológicas (anexos 14.9 y 14.10). A partir de los análisis de las secuencias se encontró que las 6 muestras se agruparon en el género *Clostridium* pero solo 2 muestras mostraron valores de similitud significativos 97% y 93% respectivamente

con la especie de *Clostridium difficile* (tabla 7; anexo 14.10) y 4 de las muestras mostraron similitud con la especie de *Clostridium perfringens* con valores de 95%, 97%, 96% y 92% respectivamente (tabla 7; anexo 14.9). Sin embargo, se realizaron alineamientos múltiples de las secuencias 16S rRNA mediante el programa EMBOSS Stretcher con secuencias obtenidas en la base de Datos NCBI (anexo 14.11), primeramente, comparamos una secuencia del gen 16S rRNA de *Clostridium perfringens* ATCC 13124 y otra del gen 16S rRNA de *Clostridium difficile* ATCC 9689, al hacer el análisis de las secuencias se observó que comparten similitud en más del 80% y específicamente en las regiones donde amplifican los oligonucleótidos que utilizamos son similares (apartado 9.6.1). De la misma forma se realizó un alineamiento múltiple mediante el programa Clustal Omega (apartado 9.6.2) de las 6 secuencias del gen 16S rRNA de las cepas aisladas (anexo 14.9) con las secuencias del gen 16S rRNA de *Clostridium difficile* ATCC 9689 y las 8 copias de la secuencia del gen 16S rRNA de *Clostridium perfringens* ATCC 13124 (anexo 14.11). De manera que también observamos similitud entre las secuencias, pero al analizar el árbol filogenético las secuencias de las cepas aisladas se encuentran más relacionadas con la cepa ATCC de *Clostridium difficile* que con las secuencias de las cepas ATCC de *Clostridium perfringens*, por lo tanto, no se podría establecer que nuestras muestras pertenecen a la especie de *Clostridium perfringens*.

Por otro lado, aunque no secuenciamos el gen *tpi* de las muestras, realizamos el alineamiento de 2 secuencias obtenidas de la base de datos ENA (Archivo Europeo de Nucleótidos) mediante el programa EMBOSS Stretcher una secuencia pertenecía al gen *tpi* de *Clostridium perfringens* cepa F262 y otra al gen *tpi* de *Clostridium difficile* cepa E12 (Apartado 9.6.3; anexo 14.12), al analizar el alineamiento de las secuencias se observó que comparten un porcentaje de similitud muy bajo entre ellas, tan solo 68% y especialmente en las zonas donde amplifican los oligos que utilizamos para este gen, no encontramos un parecido significativo.

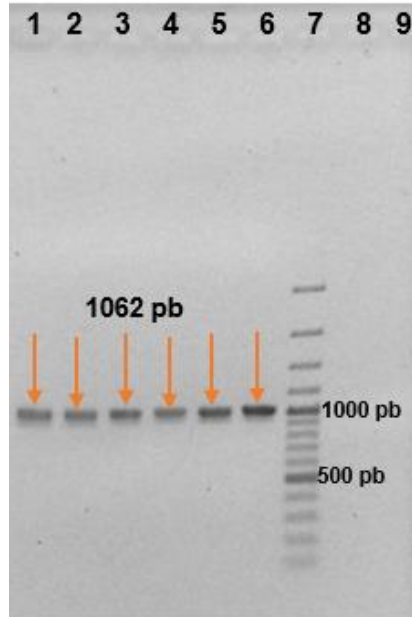


Figura 26. purificación del producto de PCR del gen *16S rRNA*. 1: 001 CI; 2: 033 CI; 3: 018 CA; 4: 025 CA; 5: 015 CA; 6: 002 CA; 7: marcador; 8-9 carriles vacíos.

Resultado de la secuenciación <i>16S rRNA</i> (Análisis mediante BLAST)	
Muestras de Infantes	
033 CI	97% Identidad <i>Clostridium difficile</i>
001 CI	93% Identidad <i>Clostridium difficile</i>
Muestras de Adultos	
002 CA	92% Identidad <i>Clostridium perfringens</i>
015 CA	96% Identidad <i>Clostridium perfringens</i>
018 CA	95% Identidad <i>Clostridium perfringens</i>
025 CA	97% Identidad <i>Clostridium perfringens</i>

Tabla 7. Resultados del análisis de Secuenciación

9.6.1 Alineamientos del gen 16S rRNA de *Clostridium perfringens* ATCC 13124 y *Clostridium difficile* ATCC 9689

Clostridium perfringens: 231433-232945

Clostridium difficile: NR_112172.1

Identity: 1259/1522 (82.7%)

Similarity: 1261/1522 (82.9%)

Gaps: 65/1522 (4.3%)

Score: 5006

231433-232945	1	TAAATTGAGAGTTTGTATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTA	50
		. : .	
NR_112172.1	1	-----ATCATKGCTCABGATGAACGCTGGCGGCGTGCCCTA	35
231433-232945	51	ACACATGCAAGTCGAGCGATGAAGTTTCCTTCGGGAAATGGATTAGCGGC	100
NR_112172.1	36	ACACATGCAAGTTGAGCGAT-----TFACTTCGGTAAAG-----AGCGGC	75
231433-232945	101	GGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTCATAGAGTGGAAATAGCCT	150
NR_112172.1	76	GGACGGGTGAGTAACCGGTGGGTAACCTACCCTGTACACACGGATAACAT	125
231433-232945	151	TCCGAAAGGAAGATTAATACCGCATAATGT-TGAAAGATGGCATCATCAT	199
		.	
NR_112172.1	126	ACCGAAAGGTATGCTAATACGGGATAATATATTTGAGA-GGCATC-TCTT	173
231433-232945	200	TTA-ACCAAAGGAGCAATCCGCTATGAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCT	248
		.. .	
NR_112172.1	174	GAATATCAAAGGTG--AGCCAGTACAGGATGGACCCGCGTCTGATTAGCT	221
231433-232945	249	AGTTGGTGGGGTAACGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAG	298
NR_112172.1	222	AGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATCAGTAGCCGACCTGAG	271
231433-232945	299	AGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGA	348
NR_112172.1	272	AGGGTGATCGGCCACATTGGAAGTACGACACGGTCCAAACTC-TACGGGA	320
231433-232945	349	GGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGAAACCCTGATGCAGCAACG	398
NR_112172.1	321	GGCAGCAGTGGGGAATAATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCAACG	370
		OligoF	
231433-232945	399	CCGCGTGAGTGATGAAGTTTTCCGATCGTAAAGCTCTGTCTTTGGGGAA	448
NR_112172.1	371	CCGCGTGAGTGATGAAGCCTTCGGGTCGTAAACTCTGTCTCAAGGAA	420
231433-232945	449	GATAATGACGGTACCAAGGAGGAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAG	498
NR_112172.1	421	GATAATGACGGTACTTGAGGAGGAAGCCCGGCTAACTACGTGCCANCAG	470
231433-232945	499	CCGCGTAATACGTAGGTGGCGAGCGTTATCCGGATTTACTGGGCGTAAA	548
NR_112172.1	471	CCGCGTAATACGTAGGGGCTAGCGTTATCCGGATTTACTGGGCGTAAA	520
231433-232945	549	GGGAGCGTAGCGGATGATTAAGTGGGATGTGAAATACCCGGGCTCAACT	598
		.	
NR_112172.1	521	GGGTGCGTAGCGGCTTTCAAGTCAGGAGTGAAGGCTACGGCTCAACC	570
231433-232945	599	TGGGTGCTGCATTCCAAACTGGTTATCTAGAGTGCAGGAGAGGAGAGTGG	648
		
NR_112172.1	571	GTAGTAA-GCTCTTGAAGTGGGAGACTTGAGTGCAGGAGAGGAGAGTGG	619

231433-232945	649	AATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTAGGAAGAACCAGTG	698
NR_112172.1	620		669
231433-232945	699	GCGAAGGCGACTCTCTGGACTGTAACGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGG	748
NR_112172.1	670		719
231433-232945	749	GGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAAT	798
NR_112172.1	720		769
231433-232945	799	ACTAGGTGTGGGGTTTCAACACCTCCGTGCCGCCGCTAACGCATTAAGT	848
NR_112172.1	770		817
231433-232945	849	ATTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTA AAACTCAAAGGAATTGACG	898
NR_112172.1	818		867
231433-232945	899	GGGACCCGCACAAGTAGCGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAA	948
NR_112172.1	868		917
231433-232945	949	GAACCTTACCTACACTTGACATCCC--TTGCATTACTCTTAATCGAGGAA	996
NR_112172.1	918		966
231433-232945	997	ATCCCTTCGGGGACAA--GGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCG	1045
NR_112172.1	967		1016
231433-232945	1046	TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTGTCGTT	1095
NR_112172.1	1017		1066
231433-232945	1096	AGTTACTACCATTAAGTTGAGGACTCTAGCGAGACTGCCTGGGTTAACCA	1145
NR_112172.1	1067		1116
231433-232945	1146	GGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTGTAGGGC	1195
NR_112172.1	1117		1166
231433-232945	1196	TACACACGTGCTACAATGGCTGGTACAGAGAGATGCAATACCGCGAGGTG	1245
NR_112172.1	1167		1216
231433-232945	1246	GAGCCAAACT-TAAAAACCAGTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGAAACTCG	1294
NR_112172.1	1217		1266
231433-232945	1295	CCTACATGAAGCTGGAGTTACTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTG	1344
NR_112172.1	1267		1315
231433-232945	1345	AATACGTTCCCGGG-TCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTG	1393
NR_112172.1	1316		1365
		Oligo	
231433-232945	1394	GCAATACCCGAAGTCCG--TGAGCTAACC GCAAGGAGGCAGCGCCGAAG	1441
NR_112172.1	1366		1414

001	-----	0
NR_112172.1	GATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATCAGTAGCCGACCTGAGAG	273
033	-----	0
002	-----	0
018	-----	0
025	-----	0
NC_008261.1:683149-684661	CATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAG	300
NC_008261.1:231433-232945	CATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAG	300
NC_008261.1:82382-83894	CATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAG	300
NC_008261.1:72551-74063	CATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAG	300
NC_008261.1:c2783349-2781837	CATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAG	300
NC_008261.1:c3034246-3032734	CATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAG	300
NC_008261.1:310699-312211	CATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAG	300
NC_008261.1:10168-11680	CATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAG	300
015	-----GRTTTTG-----GTAGWASACCKKGGGAGA	27
001	-----	0
NR_112172.1	GGTGATCGGCCACATTGGAAGTGGACACGGTCCAAACT-CTACGGAGGCGAGTGGG	332
OligoF		
033	-----GKGKAGGCAGCMSMGTGGG	19
002	-----	0
018	-----TTGRWGGCARGCAG	14
025	-----GGWRGGCAGCCRRGGKGG	17
NC_008261.1:683149-684661	GGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG	360
NC_008261.1:231433-232945	GGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG	360
NC_008261.1:82382-83894	GGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG	360
NC_008261.1:72551-74063	GGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG	360
NC_008261.1:c2783349-2781837	GGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG	360
NC_008261.1:c3034246-3032734	GGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG	360
NC_008261.1:310699-312211	GGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG	360
NC_008261.1:10168-11680	GGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG	360
015	ATATACTMCAATGGGGGAAACCTTAGCWSACAAMCGCGSGKGRAGKAKRKAAGGTT	87
001	-----	0
NR_112172.1	GAATA TTGCACAATGGGGAAAGCCTGATGCAGCAACGCCCGTGAGT--GATGAAGGCC	390
033	GAATATTGCACAATGGGC-GAAAGCTGATGCAGCAACGCCCGTGAGT--GATGAAGCCT	76
002	-----TY-KGAGMCMGKGGATGTCCAATGGAACTATCCACCCGGGA--GKT-----AAG	47
018	KGGATATG---CACATGGGAAACCTGATGCAGCACG-----CGCCT--GAGTGTAGG	63
025	GAATWTTGCMCAATGGGGAAACCTGATGCAGCAACGCCCGTGAGT--GATGAAGGTT	75
NC_008261.1:683149-684661	GAATATTGCACAATGGGGAAACCTGATGCAGCAACGCCCGTGAGT--GATGAAGGTT	418
NC_008261.1:231433-232945	GAATATTGCACAATGGGGAAACCTGATGCAGCAACGCCCGTGAGT--GATGAAGGTT	418
NC_008261.1:82382-83894	GAATATTGCACAATGGGGAAACCTGATGCAGCAACGCCCGTGAGT--GATGAAGGTT	418
NC_008261.1:72551-74063	GAATATTGCACAATGGGGAAACCTGATGCAGCAACGCCCGTGAGT--GATGAAGGTT	418
NC_008261.1:c2783349-2781837	GAATATTGCACAATGGGGAAACCTGATGCAGCAACGCCCGTGAGT--GATGAAGGTT	418
NC_008261.1:c3034246-3032734	GAATATTGCACAATGGGGAAACCTGATGCAGCAACGCCCGTGAGT--GATGAAGGTT	418
NC_008261.1:310699-312211	GAATATTGCACAATGGGGAAACCTGATGCAGCAACGCCCGTGAGT--GATGAAGGTT	418
NC_008261.1:10168-11680	GAATATTGCACAATGGGGAAACCTGATGCAGCAACGCCCGTGAGT--GATGAAGGTT	418
015	TTYKGMKYAAAAATYCTSTYTTTGGRRRRWAAWAGCAACCAA-MGRGRGGAGCCM	146
001	TTGGGSCATTGAATGCAATGCA-----ACCTKASCACC-----CSG--TGAGTAG	44
NR_112172.1	TTCGGGTCGTAATACTCTGTCTCAAGGAAGATAATGACGGTACTTGAGGAG-GAAGCCC	449
033	TC--GGGTCGTAATACTCTGTCTCAAGGAAGATAATGACGGTACTTGAGGAGCTAAGCCC	134
002	GTTCGAT-----CTAGCTGYTTGG-----AGGWATGCSGGTCCAGGRGAAGCCA	91
018	TTTCGATCG---TAAGCTCTGTCTTGGGAAGATAATGACGTAC---CCAAGAGGAAGCA	116
025	TTCGGATCGTAAAGCTCTGTCTTGGGAAGATAATGACGGTYRCCAAAGGAGGAAGCCA	135
NC_008261.1:683149-684661	TTCGGATCGTAAAGCTCTGTCTTGGGAAGATAATGACGGTACCC-AAGGAGGAAGCCA	477
NC_008261.1:231433-232945	TTCGGATCGTAAAGCTCTGTCTTGGGAAGATAATGACGGTACCC-AAGGAGGAAGCCA	477
NC_008261.1:82382-83894	TTCGGATCGTAAAGCTCTGTCTTGGGAAGATAATGACGGTACCC-AAGGAGGAAGCCA	477
NC_008261.1:72551-74063	TTCGGATCGTAAAGCTCTGTCTTGGGAAGATAATGACGGTACCC-AAGGAGGAAGCCA	477
NC_008261.1:c2783349-2781837	TTCGGATCGTAAAGCTCTGTCTTGGGAAGATAATGACGGTACCC-AAGGAGGAAGCCA	477
NC_008261.1:c3034246-3032734	TTCGGATCGTAAAGCTCTGTCTTGGGAAGATAATGACGGTACCC-AAGGAGGAAGCCA	477
NC_008261.1:310699-312211	TTCGGATCGTAAAGCTCTGTCTTGGGAAGATAATGACGGTACCC-AAGGAGGAAGTCA	477
NC_008261.1:10168-11680	TTCGGATCGTAAAGCTCTGTCTTGGGAAGATAATGACGGTACCC-AAGGAGGAAGCCA	477
	* *	
015	YGGCTYAYWTSKKGCCMGRRCRMCSSSGGGTATATACMKAGGKGGSSRRSSGYWTC	206
001	CTGTTCTGATYGTCT-----CAGA-----AGTATRCGGTA-C-TRGAGGAGCTGTATC	90
NR_112172.1	CGGCTAACTACGTGC-----CANCAGCCCGGTAATACGTA-GGG-GGCTAGCGTTATC	501
033	CGGCTAACTACGTGC-----CAGCAGCCCGGTAATACGTA-GGG-GGCTAGCGTTATC	186
002	TGGCT-AAYACGKGC-----AGCAGCCCGGTAACGTA-GGG-GGCTAGCGTTATC	139
018	CGGCTAACTACGTGC-----CAGCAGCCCGGTAATACGTA-GGTGGC--GAGCGTWTG	167
025	CGGCTAACTACGTGC-----CAGCAGCCCGGTAATACGTA-GGTGGCAGCGTTATC	188
NC_008261.1:683149-684661	CGGCTAACTACGTGC-----CAGCAGCCCGGTAATACGTA-G-GTGGCAGCGTTATC	529
NC_008261.1:231433-232945	CGGCTAACTACGTGC-----CAGCAGCCCGGTAATACGTA-G-GTGGCAGCGTTATC	529
NC_008261.1:82382-83894	CGGCTAACTACGTGC-----CAGCAGCCCGGTAATACGTA-G-GTGGCAGCGTTATC	529
NC_008261.1:72551-74063	CGGCTAACTACGTGC-----CAGCAGCCCGGTAATACGTA-G-GTGGCAGCGTTATC	529
NC_008261.1:c2783349-2781837	CGGCTAACTACGTGC-----CAGCAGCCCGGTAATACGTA-G-GTGGCAGCGTTATC	529
NC_008261.1:c3034246-3032734	CGGCTAACTACGTGC-----CAGCAGCCCGGTAATACGTA-G-GTGGCAGCGTTATC	529
NC_008261.1:310699-312211	CGGCTAACTACGTGC-----CAGCAGCCCGGTAATACGTA-G-GTGGCAGCGTTATC	529
NC_008261.1:10168-11680	CGGCTAACTACGTGC-----CAGCAGCCCGGTAATACGTA-G-GTGGCAGCGTTATC	529
	* *	
015	CGGATTTACKKGGSGKAAAA---AGGGARGSKWKGCGGAWGWTWARKKGGRRRWKKK	263
001	TMKKCAGCAGCGGTAWCGTAGGCTACGTAFCGATTAAGCTAGTYCTAGCGCTTT	150

NR_112172.1 CGGATTTACTGGGCGT----AAAGGGTGCCTAGGCGGTCTTCAAGTCAG----GA--- 549
033 CGGATTTACTGGGCGT----AAAGGGTGCCTAGGCGGTCTTCAAGTCAG----GA--- 234
002 CCGGWTACTGGGSGT----AAGGGAGGSGTAS----GCGGATGATAAG----TG--A 183
018 CGGATTTACTGGGCGT----AAAGGGAGCGTAGGSGGRWKGRRTAAGKGG----GA--T 216
025 CGGATTTACTGGGCGT----AAAGGGAGCGTAG-GSGGATGATTAAGTGG----GA--T 236
NC_008261.1:683149-684661 CGGATTTACTGGGCGT----AAAGGGAGCGTAG-GCGGATGATTAAGTGG----GA--T 577
NC_008261.1:231433-232945 CGGATTTACTGGGCGT----AAAGGGAGCGTAG-GCGGATGATTAAGTGG----GA--T 577
NC_008261.1:82382-83894 CGGATTTACTGGGCGT----AAAGGGAGCGTAG-GCGGATGATTAAGTGG----GA--T 577
NC_008261.1:72551-74063 CGGATTTACTGGGCGT----AAAGGGAGCGTAG-GCGGATGATTAAGTGG----GA--T 577
NC_008261.1:2783349-2781837 CGGATTTACTGGGCGT----AAAGGGAGCGTAG-GCGGATGATTAAGTGG----GA--T 577
NC_008261.1:c3034246-3032734 CGGATTTACTGGGCGT----AAAGGGAGCGTAG-GCGGATGATTAAGTGG----GA--T 577
NC_008261.1:310699-312211 CGGATTTACTGGGCGT----AAAGGGAGCGTAG-GCGGATGATTAAGTGG----GA--T 577
NC_008261.1:10168-11680 CGGATTTACTGGGCGT----AAAGGGAGCGTAG-GCGGATGATTAAGTGG----GA--T 577

015 ARAWACCCCGGGYYACACVTTGGKKGCTKCATTYCMAAACCTGGTTWYWRKSKCMA 323
001 CAGTCAGGAKGAAGCTACGCTCAGCTAGCTCTTGAA--CTGG--AG--ACTGAGKGC 204
NR_112172.1 GTGAAAGGCTACGGCTCAACC--GTAGTAACTCTTGAAA--CTGGGAGA--CTTGAAGTGC 604
033 GTGAAAGGCTACGGCTCAACC--GTAGTAACTCTTGAAA--CTGGGAGA--CTTGAAGTGC 289
002 TKKAAATACCCGGGCTCAACTGGGKCTGCATTCCTAAA--CTGGTATY--T-AGAKGKC 238
018 GTGAAATACCCGGGCTCAACTGGGKCTGCATTCCTAAA--CTGGTATY--T-AGAKGKC 272
025 GTGAAATACCCGGGCTCAACTGGGKCTGCATTCCTAAA--CTGGTATY--T-AGAKGKC 292
NC_008261.1:683149-684661 GTGAAATACCCGGGCTCAACTGGGKCTGCATTCCTAAA--CTGGTATY--T-AGAKGKC 633
NC_008261.1:231433-232945 GTGAAATACCCGGGCTCAACTGGGKCTGCATTCCTAAA--CTGGTATY--T-AGAKGKC 633
NC_008261.1:82382-83894 GTGAAATACCCGGGCTCAACTGGGKCTGCATTCCTAAA--CTGGTATY--T-AGAKGKC 633
NC_008261.1:72551-74063 GTGAAATACCCGGGCTCAACTGGGKCTGCATTCCTAAA--CTGGTATY--T-AGAKGKC 633
NC_008261.1:c2783349-2781837 GTGAAATACCCGGGCTCAACTGGGKCTGCATTCCTAAA--CTGGTATY--T-AGAKGKC 633
NC_008261.1:c3034246-3032734 GTGAAATACCCGGGCTCAACTGGGKCTGCATTCCTAAA--CTGGTATY--T-AGAKGKC 633
NC_008261.1:310699-312211 GTGAAATACCCGGGCTCAACTGGGKCTGCATTCCTAAA--CTGGTATY--T-AGAKGKC 633
NC_008261.1:10168-11680 GTGAAATACCCGGGCTCAACTGGGKCTGCATTCCTAAA--CTGGTATY--T-AGAKGKC 633

015 GGAGAAGRARAGTGGAAATFYTAGTKTAGCGGTGAAATGCGTAGARGATTAGGAAGAAC 383
001 AGRRAGGAG--AGTGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGC--GTAGATATTAGGAGGAAC 261
NR_112172.1 AGGAGAGGAGA--GTGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGC--GTAGATATTAGGAGGAAC 662
033 AGGAGAGGAGA--GTGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGC--GTAGATATTAGGAGGAAC 347
002 AGGAGRGGAGAGSAGGAWCTCTAGKGTAGSAGGTGAAATGS--GTAGRATTAGGAAGAAC 297
018 AGGAGAGGAGA--GTGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGC--GTAGATATTAGGAAGAAC 330
025 AGGAGAGGAGA--GTGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGC--GTAGATATTAGGAAGAAC 350
NC_008261.1:683149-684661 AGGAGAGGAGA--GTGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGC--GTAGATATTAGGAAGAAC 691
NC_008261.1:231433-232945 AGGAGAGGAGA--GTGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGC--GTAGATATTAGGAAGAAC 691
NC_008261.1:82382-83894 AGGAGAGGAGA--GTGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGC--GTAGATATTAGGAAGAAC 691
NC_008261.1:72551-74063 AGGAGAGGAGA--GTGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGC--GTAGATATTAGGAAGAAC 691
NC_008261.1:c2783349-2781837 AGGAGAGGAGA--GTGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGC--GTAGATATTAGGAAGAAC 691
NC_008261.1:c3034246-3032734 AGGAGAGGAGA--GTGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGC--GTAGATATTAGGAAGAAC 691
NC_008261.1:310699-312211 AGGAGAGGAGA--GTGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGC--GTAGATATTAGGAAGAAC 691
NC_008261.1:10168-11680 AGGAGAGGAGA--GTGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGC--GTAGATATTAGGAAGAAC 691

015 MCCAGTGGCGAAGGCGACTYTYTGGACKGTAACGTGACGCTGAGGCTYGAAAGCGTGGGGA 443
001 ACCAGTTGCGAAGGCGGCTCTCTGGACTGTAACGTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGA 321
NR_112172.1 ACCAGTTGCGAAGGCGGCTCTCTGGACTGTAACGTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGA 722
033 ACCAGTTGCGAAGGCGGCTCTCTGGACTGTAACGTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGA 407
002 ACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGACTGTAACGTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGA 357
018 ACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGACTGTAACGTGACGCTGAGGCCTYGAAAGCGTGGGGA 390
025 ACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGACTGTAACGTGACGCTGAGGCCTYGAAAGCGTGGGGA 410
NC_008261.1:683149-684661 ACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGACTGTAACGTGACGCTGAGGCCTYGAAAGCGTGGGGA 751
NC_008261.1:231433-232945 ACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGACTGTAACGTGACGCTGAGGCCTYGAAAGCGTGGGGA 751
NC_008261.1:82382-83894 ACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGACTGTAACGTGACGCTGAGGCCTYGAAAGCGTGGGGA 751
NC_008261.1:72551-74063 ACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGACTGTAACGTGACGCTGAGGCCTYGAAAGCGTGGGGA 751
NC_008261.1:c2783349-2781837 ACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGACTGTAACGTGACGCTGAGGCCTYGAAAGCGTGGGGA 751
NC_008261.1:c3034246-3032734 ACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGACTGTAACGTGACGCTGAGGCCTYGAAAGCGTGGGGA 751
NC_008261.1:310699-312211 ACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGACTGTAACGTGACGCTGAGGCCTYGAAAGCGTGGGGA 751
NC_008261.1:10168-11680 ACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGACTGTAACGTGACGCTGAGGCCTYGAAAGCGTGGGGA 751

015 GCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGAATACTAGGTGTGGGG 503
001 GCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGAATACTAGGTGTGGGG 380
NR_112172.1 GCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGAATACTAGGTGTGGGG 782
033 GCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGAATACTAGGTGTGGGG 467
002 GCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGAATACTAGGTGTGGGG 417
018 GCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGAATACTAGGTGTGGGG 450
025 GCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGAATACTAGGTGTGGGG 470
NC_008261.1:683149-684661 GCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGAATACTAGGTGTGGGG 811
NC_008261.1:231433-232945 GCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGAATACTAGGTGTGGGG 811
NC_008261.1:82382-83894 GCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGAATACTAGGTGTGGGG 811
NC_008261.1:72551-74063 GCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGAATACTAGGTGTGGGG 811
NC_008261.1:c2783349-2781837 GCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGAATACTAGGTGTGGGG 811
NC_008261.1:c3034246-3032734 GCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGAATACTAGGTGTGGGG 811
NC_008261.1:310699-312211 GCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGAATACTAGGTGTGGGG 811
NC_008261.1:10168-11680 GCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGAATACTAGGTGTGGGG 811

015 -GTTTCAACACCTCCGTGCCCGCTAACGCATTAAGTATTCCGCTGGGGAGTACGGTC 562
001 GGTG--ACCCCTTCCGGTCCCGCTAACGCATTAARWAMTCCGCTGGGAGTACGGTC 439
NR_112172.1 GGTG--ACCCCTTCCG--GT--GCCGCTAACGCATTAAGTACTCCGCTGGGAGTACGGTC 839
033 GGTG--ACCCCTTCCGGT--CCGCGCTAACGCATTAAGTACTCCGCTGGGAGTACGGTC 526
002 GGTG--ACCCCTCCGCTCCGCTAACGCATTAAGTATTCCGCTGGGGAGTACGGTC 477

018	-GTTTCAACACCTCCGTGCCGCGCTAACGCATTAAGTATTCGCTGGGGAGTACGGTC	509
025	-GTTTCAACACCTCCGTGCCGCGCTAACGCATTAAGTATTCGCTGGGGAGTACGGTC	529
NC_008261.1:683149-684661	-GTTTCAACACCTCCGTGCCGCGCTAACGCATTAAGTATTCGCTGGGGAGTACGGTC	870
NC_008261.1:231433-232945	-GTTTCAACACCTCCGTGCCGCGCTAACGCATTAAGTATTCGCTGGGGAGTACGGTC	870
NC_008261.1:82382-83894	-GTTTCAACACCTCCGTGCCGCGCTAACGCATTAAGTATTCGCTGGGGAGTACGGTC	870
NC_008261.1:72551-74063	-GTTTCAACACCTCCGTGCCGCGCTAACGCATTAAGTATTCGCTGGGGAGTACGGTC	870
NC_008261.1:c2783349-2781837	-GTTTCAACACCTCCGTGCCGCGCTAACGCATTAAGTATTCGCTGGGGAGTACGGTC	870
NC_008261.1:c3034246-3032734	-GTTTCAACACCTCCGTGCCGCGCTAACGCATTAAGTATTCGCTGGGGAGTACGGTC	870
NC_008261.1:310699-312211	-GTTTCAACACCTCCGTGCCGCGCTAACGCATTAAGTATTCGCTGGGGAGTACGGTC	870
NC_008261.1:10168-11680	-GTTTCAACACCTCCGTGCCGCGCTAACGCATTAAGTATTCGCTGGGGAGTACGGTC	870
	*** * * * * *	
015	GCAAGATAAAACTCAAAGGAATGACGGGGACCCGCACAAGTAGCGGAGCATGTGGTTT	622
001	GCAAGATGAAACTCAAAGGAATGACGGGGACCCGCACAAGTAGCGGAGCATGTGGTTT	499
NR_112172.1	GCAAGATGAAACTCAAAGGAATGACGGGGACCCGCACAAGTAGCGGAGCATGTGGTTT	899
033	GCAAGATGAAACTCAAAGGAATGACGGGGACCCGCACAAGTAGCGGAGCATGTGGTTT	586
002	GCAAGATGAAACTCAAAGGAATGACGGGGACCCGCACAAGTAGCGGAGCATGTGGTTT	537
018	GCAAGATGAAACTCAAAGGAATGACGGGGACCCGCACAAGTAGCGGAGCATGTGGTTT	569
025	GCAAGATGAAACTCAAAGGAATGACGGGGACCCGCACAAGTAGCGGAGCATGTGGTTT	589
NC_008261.1:683149-684661	GCAAGATGAAACTCAAAGGAATGACGGGGACCCGCACAAGTAGCGGAGCATGTGGTTT	930
NC_008261.1:231433-232945	GCAAGATGAAACTCAAAGGAATGACGGGGACCCGCACAAGTAGCGGAGCATGTGGTTT	930
NC_008261.1:82382-83894	GCAAGATGAAACTCAAAGGAATGACGGGGACCCGCACAAGTAGCGGAGCATGTGGTTT	930
NC_008261.1:72551-74063	GCAAGATGAAACTCAAAGGAATGACGGGGACCCGCACAAGTAGCGGAGCATGTGGTTT	930
NC_008261.1:c2783349-2781837	GCAAGATGAAACTCAAAGGAATGACGGGGACCCGCACAAGTAGCGGAGCATGTGGTTT	930
NC_008261.1:c3034246-3032734	GCAAGATGAAACTCAAAGGAATGACGGGGACCCGCACAAGTAGCGGAGCATGTGGTTT	930
NC_008261.1:310699-312211	GCAAGATGAAACTCAAAGGAATGACGGGGACCCGCACAAGTAGCGGAGCATGTGGTTT	930
NC_008261.1:10168-11680	GCAAGATGAAACTCAAAGGAATGACGGGGACCCGCACAAGTAGCGGAGCATGTGGTTT	930
	***** * * * * *	
015	AATTYGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCTACACTTGMCACTCCCTTGCATTACTCTTAATC	682
001	AATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCTAAGCTTGACATMCCAATGACATCTCCTTAAT	559
NR_112172.1	AATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCTAAGCTTGACATMCCAATGACATCTCCTTAAT	959
033	AATTYGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCTAAGCTTGACATMCCAATGACATCTCCTTAAT	646
002	AATTYGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCTAAGCTTGACATMCCAATGACATCTCCTTAAT	597
018	AATTYGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCTAAGCTTGACATMCCAATGACATCTCCTTAAT	629
025	AATTYGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCTAAGCTTGACATMCCAATGACATCTCCTTAAT	649
NC_008261.1:683149-684661	AATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCTAAGCTTGACATMCCAATGACATCTCCTTAAT	990
NC_008261.1:231433-232945	AATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCTAAGCTTGACATMCCAATGACATCTCCTTAAT	990
NC_008261.1:82382-83894	AATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCTAAGCTTGACATMCCAATGACATCTCCTTAAT	990
NC_008261.1:72551-74063	AATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCTAAGCTTGACATMCCAATGACATCTCCTTAAT	990
NC_008261.1:c2783349-2781837	AATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCTAAGCTTGACATMCCAATGACATCTCCTTAAT	990
NC_008261.1:c3034246-3032734	AATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCTAAGCTTGACATMCCAATGACATCTCCTTAAT	990
NC_008261.1:310699-312211	AATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCTAAGCTTGACATMCCAATGACATCTCCTTAAT	990
NC_008261.1:10168-11680	AATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCTAAGCTTGACATMCCAATGACATCTCCTTAAT	990
	***** * * * * *	
015	GAGG--AAATCCCTTYGGGGACAAGGTGACAGGTGGTGATGGTTGTCGTAGCTYGTGT	740
001	CGGAGAGTTCCTCCGCGGACATGGTGACAGGTGGTGATGGTTGTCGTAGCTYGTGT	619
NR_112172.1	CGGAGAGTTCCTCCGCGGACATGGTGACAGGTGGTGATGGTTGTCGTAGCTYGTGT	1019
033	CGGAGAGTTCCTCCGCGGACATGGTGACAGGTGGTGATGGTTGTCGTAGCTYGTGT	706
002	GAGG--AAATCCCTTYGGGGACAAGGTGACAGGTGGTGATGGTTGTCGTAGCTYGTGT	655
018	GAGG--AAATCCCTTYGGGGACAAGGTGACAGGTGGTGATGGTTGTCGTAGCTYGTGT	687
025	GAGG--AAATCCCTTYGGGGACAAGGTGACAGGTGGTGATGGTTGTCGTAGCTYGTGT	707
NC_008261.1:683149-684661	GAGG--AAATCCCTTYGGGGACAAGGTGACAGGTGGTGATGGTTGTCGTAGCTYGTGT	1048
NC_008261.1:231433-232945	GAGG--AAATCCCTTYGGGGACAAGGTGACAGGTGGTGATGGTTGTCGTAGCTYGTGT	1048
NC_008261.1:82382-83894	GAGG--AAATCCCTTYGGGGACAAGGTGACAGGTGGTGATGGTTGTCGTAGCTYGTGT	1048
NC_008261.1:72551-74063	GAGG--AAATCCCTTYGGGGACAAGGTGACAGGTGGTGATGGTTGTCGTAGCTYGTGT	1048
NC_008261.1:c2783349-2781837	GAGG--AAATCCCTTYGGGGACAAGGTGACAGGTGGTGATGGTTGTCGTAGCTYGTGT	1048
NC_008261.1:c3034246-3032734	GAGG--AAATCCCTTYGGGGACAAGGTGACAGGTGGTGATGGTTGTCGTAGCTYGTGT	1048
NC_008261.1:310699-312211	GAGG--AAATCCCTTYGGGGACAAGGTGACAGGTGGTGATGGTTGTCGTAGCTYGTGT	1048
NC_008261.1:10168-11680	GAGG--AAATCCCTTYGGGGACAAGGTGACAGGTGGTGATGGTTGTCGTAGCTYGTGT	1048
	* * * * *	
015	CGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCGTTAGTACTACCAT	800
001	CGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCGTTAGTACTACCAT	679
NR_112172.1	CGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCGTTAGTACTACCAT	1079
033	CGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCGTTAGTACTACCAT	766
002	CGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCGTTAGTACTACCAT	715
018	CGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCGTTAGTACTACCAT	747
025	CGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCGTTAGTACTACCAT	767
NC_008261.1:683149-684661	CGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCGTTAGTACTACCAT	1108
NC_008261.1:231433-232945	CGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCGTTAGTACTACCAT	1108
NC_008261.1:82382-83894	CGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCGTTAGTACTACCAT	1108
NC_008261.1:72551-74063	CGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCGTTAGTACTACCAT	1108
NC_008261.1:c2783349-2781837	CGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCGTTAGTACTACCAT	1108
NC_008261.1:c3034246-3032734	CGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCGTTAGTACTACCAT	1108
NC_008261.1:310699-312211	CGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCGTTAGTACTACCAT	1108
NC_008261.1:10168-11680	CGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCGTTAGTACTACCAT	1108
	***** * * * * *	
015	AAGTTGAGGACTCTAGCGAGACTGCCTGGGTTAACCGAGGAGGTGGGGATGACGTCA	860
001	AAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCAGGGATAACCTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCA	739
NR_112172.1	AAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCAGGGATAACCTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCA	1139
033	AAGTTGGGCACTCTAGMGAGACTGCCMGGGATAACCTGGAGGAAGGTGGGGMTGACGTCA	826
002	AAGTTGAGGACTCTAGCGAGACTGCCTGGGTTAACCGAGGAGGAGGTGGGGATGACGTCA	775
018	AAGTTGAGGACTCTAGCGAGACTGCCTGGGTTAACCGAGGAGGAGGTGGGGATGACGTCA	807
025	AAGTTGAGGACTCTAGCGAGACTGCCTGGGTTAACCGAGGAGGAGGTGGGGATGACGTCA	827
NC_008261.1:683149-684661	AAGTTGAGGACTCTAGCGAGACTGCCTGGGTTAACCGAGGAGGAGGTGGGGATGACGTCA	1168

EIA17207.1	150	AAAAGCTGTTGAAGGAACAAACATAAAAAGTAGGTGCTCAAAACATGCACT	199
CCL81405.1	150	AGAAGCTACTAAGGGTACAAAATATAAAGATAGGTGCTCAAAATATGCACT	199
EIA17207.1	200	TTGAAAAAAAAGGAGCATTCACTGGAGAAATCGCTCCAAGAATGTTAGAA	249
CCL81405.1	200	TTGAAAGAAAAGGAGCATTTACAGGAGAAGTTTCACCTCTTATGTTAAAA	249
EIA17207.1	250	GCTATGAACATAGATTACGTTATAATTGGACATAGTGAAAGAAGAGAATA	299
CCL81405.1	250	GAAATAGATATGGACTATGTTGTAATAGGACATTCAGAAAAGAAGACAATA	299
EIA17207.1	300	CTTCAACGAAACAGATGAAACTTGCAACAAAAAAGTTAAAGCTGCTTTCG	349
CCL81405.1	300	CTTCAATGAAACTGATGAAACTGTAAACAAGAAAGTTTAAAGCATTAG	349
EIA17207.1	350	CACACAACCTTAACCTCAATCCTTTGCTGTGGAGAACTTTAGAGCAAAGA	399
CCL81405.1	350	AAGTAGGAATAGACCCAATATTATGTGTTGGAGAACTTTAGAACAAGA	399
EIA17207.1	400	GAAAACGGAACACTACTAACGACGTTATAAAAGCTCAAATCACTGCTGATTT	449
CCL81405.1	400	GAAGCTGGA AAAACTAAAGATGTTTGTAAAGTTCAAGTTGAAAAGCTTT	449
EIA17207.1	450	AGAAGGATTAACATAAGAGCAAGCTGAGAAAGTTGTTATAGCTTACGAAC	499
CCL81405.1	450	AGAAAATGTTCTTAAAGATGATTTAGCAAAGTAGTTGTTGCATATGAC	499
EIA17207.1	500	CAATCTGGGCTATCGGAACTGGAAAACTGCTACTTCAGACCAAGCTAAT	549
CCL81405.1	500	CAATCTGGGCTATTGGAACTGGTAAAACCTGCAACTGCTGAAGATGCTAAT	549
EIA17207.1	550	GAAACAATAGCTGCTATAAGAGCTATGGTTGCTGAAATGTTCCGACAAGA	599
CCL81405.1	550	GACGTTATATCTTATATAAGAGAAGTTATAAAAGGATTATATGGA---GA	596
EIA17207.1	600	AGTTGCTGATAAAGTAAGAATCCAATACGGTGGATCAGTTAAGCCTAACA	649
CCL81405.1	597	ATTAGCTAATGAAGTTAGAATACAATACGGTGGAAAGTTAAACCTTCAA	646
EIA17207.1	650	CAATAGCAGAGCAAATGGCTAAATCAGACATCGATGGTGCTTTAGTTGGT	699
CCL81405.1	647	ATGTAGCCGAAATAATGGGTCAAAGTGATATAGATGGAGCTTTAGTAGGT	696
EIA17207.1	700	GGAGCTAGCTTAGTTGCAGCTGACTTTGCTCAAATCGTAAACTACTAA	747
CCL81405.1	697	GGAGCTAGTTTAGCTAGTAATGATTACCTAGACCTTGTTAATTTCTAA	744

10. DISCUSION

La infección causada por *Clostridium difficile* se ha convertido en un problema de salud pública a nivel mundial, dada la gravedad de la enfermedad y su asociación al uso de antibióticos además de un número creciente de personas infectadas dentro del entorno hospitalario. La colonización de *Clostridium difficile* resulta de la ingestión de esporas y su germinación en condiciones anaerobias en el tracto gastrointestinal, esta colonización puede permanecer asintomática y ser causada tanto por *Clostridium difficile* toxigénico como no toxigénico.

Estudios sobre portadores asintomáticos provenientes de la comunidad en Norte América, Europa y Asia muestran que *Clostridium difficile* se encuentra en una prevalencia de colonización del 3-15% considerando *C. difficile* toxigénico y no toxigénico (Crobach et al., 2018; Furuya-Kanamori et al., 2015) Por otro lado, se han reportado altas tasas de portadores asintomáticos (25-35%) en niños durante el primer año de vida y la tasa disminuye (hasta 15%) entre las edades 1-8 años (Leibowitz et al., 2015). De tal forma que la epidemiología se ha modificado en el último par de décadas por la aparición de brotes en instituciones de confinamiento como asilos, así como en la comunidad, además se observa un número creciente de infecciones en individuos cada vez más jóvenes y sin factores de riesgo (como la exposición al uso de antibióticos).

En México no existen estudios publicados de la presencia de este patógeno en personas sanas de la comunidad, por lo que en el presente trabajo analizamos 63 muestras de individuos sanos de las ciudades de Puebla y Tehuacán, y encontramos una prevalencia de colonización del 9.52% n=6 de *Clostridium difficile*, de manera que nos sugiere similitud al porcentaje de colonización asintomática en la comunidad reportado en la literatura, Crobach et al., 2018 y Furuya-Kanamori et al., 2015. Se detectaron cuatro individuos portadores de *Clostridium difficile* no toxigénico (1 infante y 3 Adultos). En estudios con voluntarios sanos de la comunidad a partir de los aislados positivos a *C. difficile* se encontró *C. difficile* no toxigénico en una prevalencia del 42-50% de los aislados (Kato et al., 2001; Miyajima et al., 2011). Este porcentaje también es similar a lo que se ha observado en pacientes asintomáticos del entorno hospitalario (Natarajan et al., 2013). En

nuestro estudio, el porcentaje de *C. difficile* no toxigénico fue del 66% n=4 partiendo de 6 aislados positivos. La proporción de aislados de *C. difficile* no toxigénico podría depender de la edad. De acuerdo a un estudio que encontró *C. difficile* no toxigénico en 6.9% de los aislados en pacientes mayores de 60 años, mientras que en los aislados de pacientes menores de 20 años el 22.8% fue *C. difficile* no toxigénico. En nuestro estudio tuvimos 6 muestras de personas menores a 20 años de las cuales 2 fueron *Clostridium difficile* no toxigénico que correspondería al 33%. Éste y otros estudios apoyan la idea de que los aislamientos de *C. difficile* no toxigénico son más prevalentes en pacientes jóvenes (Natarajan et al., 2013). Otra característica que se ha visto es que las personas colonizadas por cepas no toxigénicas, parecen no tener un mayor riesgo o incluso están protegidos de progresar a la CDI. El mecanismo por el cual se da esta protección no es bien dilucidado, pero se cree que puede deberse a la competencia por el nicho metabólico o de adherencia en el tracto gastrointestinal entre las cepas toxigénicas y no toxigénicas (Gerding et al., 2015). Sin embargo, aunque las cepas no toxigénicas se consideran benignas y no patógenas, existen varios informes de su asociación con infección en pacientes susceptibles y su participación en infecciones mixtas con *C. difficile* toxigénico (Natarajan et al., 2013). Debido a que han sido poco estudiadas, su historia evolutiva no está clara y su relación con la enfermedad sigue siendo controvertida. Recientemente se analizó el fenotipo de cepas no toxigénicas de *C. difficile* provenientes de aislados clínicos, las cepas presentaron una morfología de colonias grandes ramificadas, una mayor resistencia al metronidazol y una mayor eficiencia de esporulación en comparación con las cepas de *C. difficile* toxigénico (Camorlinga et al., 2019). Por lo tanto, no se encuentra bien definida la participación de *C. difficile* no toxigénico ante la infección por CDI. Pero es importante estudiar más a fondo las características de estas cepas para dilucidar su importancia clínica y epidemiológica.

Por otra parte, detectamos una prevalencia de *Clostridium difficile* toxigénico de 3% n=2 correspondiente a la muestra de un infante de 9 meses siendo positivo únicamente a la toxina B de manera que su toxinotipo es A⁻B⁺CDT⁻ y 1 muestra de una mujer de 25 años con toxinotipo A⁻B⁻CDT⁺. Como ya se mencionó existen varios

estudios que indican la presencia asintomática de *C. difficile* toxigénico en niños pequeños, además de que la infección por CDI en este grupo de edad no es común, se ha postulado que los infantes permanecen asintomáticos en presencia de altos niveles de toxinas debido a la ausencia de los receptores en su tracto gastrointestinal aún en desarrollo y también a la presencia de microbiota intestinal que se encuentra inestable en los primeros 2-3 años de vida (Bergström et al., 2014).

Hasta hace poco, se pensaba que todas las cepas toxigénicas asociadas con la enfermedad producían tanto TcdA como TcdB. Los primeros estudios en modelos animales indicaron que TcdA y TcdB actuaban sinérgicamente pero que se requería TcdA para producir el daño inicial en el colon. En consecuencia, gran parte de las investigaciones se han centrado en la inflamación modulada por la toxina A. Sin embargo, en estudios que involucran tejido colónico humano, TcdB parece ser una potente toxina inflamatoria, mientras que TcdA es más débil (Riegler et al., 1995). Muchos informes recientes demuestran la importancia clínica de los aislados (A⁻B⁺CDT⁻) también conocido como toxinotipo VIII, las primeras cepas de este toxinotipo se aislaron principalmente de recién nacidos y niños asintomáticos, pero ahora se han documentado en brotes de CDI, casos esporádicos de infección y casos graves de colitis pseudomembranosa (PMC), además se ha descrito la resistencia a la clindamicina y fluoroquinolonas en estas cepas (Drudy et al., 2007; Rupnik, 2008). De tal forma, que el hallar este toxinotipo de importancia clínica en portadores asintomáticos podría coincidir con la idea de que las personas colonizadas por cepas toxigénicas representan un riesgo epidemiológico para la transmisión de este patógeno. Por otro lado, las cepas con toxinotipo A⁻B⁻CDT⁺ ó toxinotipo XI se pueden diferenciar en dos subgrupos. Uno caracterizado por la ausencia total de PaLoc pero tiene los genes CDT. El otro grupo tiene genes CDT intactos, pero posee un PaLoc truncado y por lo tanto no funcional. Si bien las cepas positivas para CDT y PaLoc negativas son muy raras, el toxinotipo XI se puede encontrar con frecuencia tanto en pacientes sintomáticos como asintomáticos (Geric et al., 2003; Rupnik, 2008).

La toxina binaria tiene efectos citotóxicos sobre las células en cultivo, pero su papel en la enfermedad humana aún no está definido. Se cree que la toxina binaria puede desempeñar un papel complementario de las toxinas A y B en la patogenia de la enfermedad asociada a *C. difficile*, pero por sí sola no es suficiente para causar la enfermedad (Geric et al., 2006; Geric et al., 2003). La muestra que obtuvimos parece pertenecer al toxinotipo XI, pero no amplificó ambas toxinas binarias solo amplificó *cdtA* por lo que se tendrá que confirmar mediante secuenciación si efectivamente esta toxina binaria es de *Clostridium difficile* ya que en este toxinotipo se han descrito ambas toxinas binarias y no solo una.

En 1992, Clabots y colaboradores describieron que los pacientes colonizados de forma asintomática pueden arrojar esporas a su entorno y, en consecuencia, a otros pacientes (Clabots et al., 1992). Por otro lado en otro estudio se demostró que el ingreso de pacientes colonizados desempeña un papel importante en el mantenimiento de la transmisión dentro de las salas hospitalarias (Lanzas et al., 2011). El Programa de Infecciones Emergentes de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) descubrió que casi el 50% de todos los casos iniciales de CDI habían comenzado en la comunidad. Por lo cual podemos sugerir que en nuestro entorno es importante reconocer el riesgo epidemiológico que representan aquellos individuos que son portadores asintomáticos ya que en México también se ha descrito un incremento de las infecciones hospitalarias causadas por *Clostridium difficile* (Dávila et al., 2017). Recientemente, (Ochoa-Hein et al., 2018) reportaron un estudio de casos y controles en un hospital de tercer nivel en la Ciudad de México (2015 y 2016) que 155 de 329 casos observados (47.1%) en el periodo fueron casos nuevos adquiridos en el hospital y que 37 casos (11.2%) fueron adquiridos en la comunidad. Por lo cual se puede observar que, en nuestro país *Clostridium difficile*, está cobrando gran importancia clínica a pesar de que no era un patógeno comúnmente estudiado y hoy gracias a las herramientas y metodologías moleculares es posible su detección de una manera más fácil y rápida. En cuanto a la metodología utilizada en nuestro estudio es importante destacar que el cultivo toxigénico tiene un alta sensibilidad y especificidad, además combinándolo con un pretratamiento de las muestras con etanol observamos

mejores resultados, además de que las técnicas moleculares son una herramienta muy valiosa para confirmar la detección, esto a pesar de que es un método de diagnóstico laborioso y costoso (Crobach et al., 2018; Edwards et al., 2013). En nuestro estudio tuvimos limitaciones para conseguir el medio comercial de CCFA-TC por lo que utilizamos un medio elaborado sin marca comercial, llama la atención que a pesar de estar adicionado con dos antibióticos como cicloserina y cefoxitina, que inhiben el crecimiento de otros microorganismos, se observó en tinción de Gram a bacterias Gram negativas o que no correspondían con la morfología de *C. difficile*, probablemente estas bacterias que crecieron podrían estar presentando resistencia a los antibióticos que utilizamos, asimismo se ha descrito resistencia al etanol por ejemplo en un estudio para eliminar el 90% de la población de *P. aeruginosa* en etanol al 70%, fue de 9,7 min, nosotros utilizamos etanol absoluto durante 20 minutos (Mazzola et al., 2006). En cuanto a los resultados de la secuenciación, tal como se pudo observar en los alineamientos las secuencias del 16S rRNA de *Clostridium perfringens* y *Clostridium difficile* son bastante similares y de hecho en las bases de datos no encontramos una secuencia completa del 16S de *Clostridium difficile*, solo encontramos secuencias parciales, en cambio hay muchas secuencias completas disponibles para *Clostridium perfringens*, otros autores mencionan un porcentaje de similitud también del 80% entre las secuencias de *C. perfringens* y *C. difficile*. Al analizar los datos del árbol filogenético nuestras secuencias mostraron estar más relacionadas filogenéticamente con la cepa ATCC de *Clostridium difficile* que con la cepa ATCC de *Clostridium perfringens*. De tal forma que el gen 16S parece no ser específico en la identificación de *Clostridium difficile* en cambio el análisis del gen *tpi* podría representar una herramienta más específica para su identificación. Dhalluin y colaboradores compararon los fragmentos internos del gen *tpi* para distinguir 12 especies del género *Clostridium*. Gracias a un trabajo previo diseñaron cebadores específicos para amplificar el gen *tpi* de *Clostridium difficile*, mismos que utilizamos en nuestro estudio. Estos cebadores amplificaron exitosamente en los 72 aislamientos de *Clostridium difficile* de diferentes hospedadores y orígenes geográficos y no amplificó en las otras 11 especies probadas, incluyendo *C. perfringens*, *C. sordellii* y *C. bifermentans*, estas dos

últimas son filogenéticamente cercanas a *C. difficile* por tanto, el gen *tpi* puede constituir una alternativa para diferenciar especies de clostridios. (Dhalluin et al., 2003).

Interesantemente las 2 secuencias que se identificaron desde el análisis del BLAST como *Clostridium difficile* son las que pertenecen a las muestras que fueron positivas a la amplificación del gen *tpi* en niños, 033 CI amplificó el gen de la toxina B y 001 CI se identificó como *Clostridium difficile* no toxigénico, ambas secuencias mostraron estar más relacionadas a la cepa ATCC de *C. difficile* en el análisis filogenético. Cabe mencionar que en muchos laboratorios no se estudia rutinariamente a los microorganismos anaerobios, es importante implementar herramientas y metodologías que nos permitan su estudio ya que nos aportan información nueva y de importancia clínica. Asimismo, será importante realizar estudios sobre la presencia de *Clostridium difficile* con un número mayor de muestras, en diferentes etapas de la vida (infantes, adultos y geriátricos) e incluyendo otras regiones de México. Esto nos permitirá ampliar nuestra visión sobre la epidemiología de este patógeno en nuestro país.

11. CONCLUSIONES

1. Se detectaron portadores asintomáticos de *Clostridium difficile* en la ciudad de Puebla y Tehuacán.
2. Se aisló *Clostridium difficile* de muestras de heces en personas sanas de la comunidad.
3. Se identificó molecularmente a *Clostridium difficile* en las muestras aisladas.
4. Se identificó *Clostridium difficile* toxigénico y *Clostridium difficile* no toxigénico en muestras de adultos e infantes.

12. PERSPECTIVAS

1. Secuenciar el gen *tpi* de las muestras aisladas
2. Determinar el Ribotipo de las cepas aisladas
3. Determinar perfiles de resistencia a las cepas aisladas

13. BIBLIOGRAFÍA

- Abt, M. C., McKenney, P. T., & Pamer, E. G. (2016). Clostridium difficile colitis: pathogenesis and host defence. *Nat Rev Microbiol*, 14(10), 609-620. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.108>
- Adlerberth, I., Huang, H., Lindberg, E., Åberg, N., Hesselmar, B., Saalman, R., Nord, C. E., Wold, A. E., & Weintraub, A. (2014). Toxin-producing Clostridium difficile strains as long-term gut colonizers in healthy infants. *J Clin Microbiol*, 52(1), 173-179. <https://doi.org/10.1128/JCM.01701-13>
- Awad, M. M., Johanesen, P. A., Carter, G. P., Rose, E., & Lyras, D. (2014). Clostridium difficile virulence factors: Insights into an anaerobic spore-forming pathogen. *Gut Microbes*, 5(5), 579-593. <https://doi.org/10.4161/19490976.2014.969632>
- Baban, S. T., Kuehne, S. A., Barketi-Klai, A., Cartman, S. T., Kelly, M. L., Hardie, K. R., Kansau, I., Collignon, A., & Minton, N. P. (2013). The role of flagella in Clostridium difficile pathogenesis: comparison between a non-epidemic and an epidemic strain. *PLoS One*, 8(9), e73026. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073026>
- Balassiano, I. T., Yates, E. A., Domingues, R. M. C. P., & Ferreira, E. O. (2012). Clostridium difficile: a problem of concern in developed countries and still a mystery in Latin America. *J Med Microbiol*, 61(Pt 2), 169-179. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.037077-0>
- Baldan, R., Cavallerio, P., Tuscano, A., Parlato, C., Fossati, L., Moro, M., Serra, R., & Cirillo, D. M. (2010). First report of hypervirulent strains polymerase chain reaction ribotypes 027 and 078 causing severe Clostridium difficile infection in Italy. *Clin Infect Dis*, 50(1), 126-127. <https://doi.org/10.1086/649011>
- Bartlett, J. G., & Gerding, D. N. (2008). Clinical recognition and diagnosis of Clostridium difficile infection. *Clin Infect Dis*, 46 Suppl 1, S12-18. <https://doi.org/10.1086/521863>
- Bergström, A., Skov, T. H., Bahl, M. I., Roager, H. M., Christensen, L. B., Ejlerskov, K. T., Mølgaard, C., Michaelsen, K. F., & Licht, T. R. (2014). Establishment of intestinal microbiota during early life: a longitudinal, explorative study of a large cohort of Danish infants. *Appl Environ Microbiol*, 80(9), 2889-2900. <https://doi.org/10.1128/AEM.00342-14>
- Bhattacharjee, D., Francis, M. B., Ding, X., McAllister, K. N., Shrestha, R., & Sorg, J. A. (2015). Reexamining the Germination Phenotypes of Several Clostridium difficile Strains Suggests Another Role for the CspC Germinant Receptor. *J Bacteriol*, 198(5), 777-786. <https://doi.org/10.1128/JB.00908-15>
- Bordeleau, E., Purcell, E. B., Lafontaine, D. A., Fortier, L. C., Tamayo, R., & Burrus, V. (2015). Cyclic di-GMP riboswitch-regulated type IV pili contribute to aggregation of Clostridium difficile. *J Bacteriol*, 197(5), 819-832. <https://doi.org/10.1128/JB.02340-14>
- Brechmann, T., Swol, J., Knop-Hammad, V., Willert, J., Aach, M., Cruciger, O., Schmiegel, W., Schildhauer, T. A., & Hamsen, U. (2015). Complicated fecal microbiota transplantation in a tetraplegic patient with severe Clostridium difficile infection. *World J Gastroenterol*, 21(12), 3736-3740. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i12.3736>
- Brouwer, M. S., Roberts, A. P., Hussain, H., Williams, R. J., Allan, E., & Mullany, P. (2013). Horizontal gene transfer converts non-toxicogenic Clostridium difficile strains into toxin producers. *Nat Commun*, 4, 2601. <https://doi.org/10.1038/ncomms3601>
- Camorlinga, M., Sanchez-Rojas, M., Torres, J., & Romo-Castillo, M. (2019). Phenotypic Characterization of Non-toxicogenic. *Front Microbiol*, 10, 84. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00084>

- Carroll, K. C., & Bartlett, J. G. (2011). Biology of *Clostridium difficile*: implications for epidemiology and diagnosis. *Annu Rev Microbiol*, 65, 501-521. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090110-102824>
- Carter, G. P., Lyras, D., Allen, D. L., Mackin, K. E., Howarth, P. M., O'Connor, J. R., & Rood, J. I. (2007). Binary toxin production in *Clostridium difficile* is regulated by CdtR, a LytTR family response regulator. *J Bacteriol*, 189(20), 7290-7301. <https://doi.org/10.1128/JB.00731-07>
- Chen, S., Gu, H., Sun, C., Wang, H., & Wang, J. (2017). Rapid detection of *Clostridium difficile* toxins and laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infections. *Infection*, 45(3), 255-262. <https://doi.org/10.1007/s15010-016-0940-9>
- Clabots, C. R., Johnson, S., Olson, M. M., Peterson, L. R., & Gerding, D. N. (1992). Acquisition of *Clostridium difficile* by hospitalized patients: evidence for colonized new admissions as a source of infection. *J Infect Dis*, 166(3), 561-567. <https://doi.org/10.1093/infdis/166.3.561>
- Crobach, M. J. T., Vernon, J. J., Loo, V. G., Kong, L. Y., Péchiné, S., Wilcox, M. H., & Kuijper, E. J. (2018). Understanding *Clostridium difficile* Colonization. *Clin Microbiol Rev*, 31(2). <https://doi.org/10.1128/CMR.00021-17>
- Czepiel, J., Drózdź, M., Pituch, H., Kuijper, E. J., Perucki, W., Mielimonka, A., Goldman, S., Wultańska, D., Garlicki, A., & Biesiada, G. (2019). *Clostridium difficile* infection: review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 38(7), 1211-1221. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03539-6>
- Deakin, L. J., Clare, S., Fagan, R. P., Dawson, L. F., Pickard, D. J., West, M. R., Wren, B. W., Fairweather, N. F., Dougan, G., & Lawley, T. D. (2012). The *Clostridium difficile* spo0A gene is a persistence and transmission factor. *Infect Immun*, 80(8), 2704-2711. <https://doi.org/10.1128/IAI.00147-12>
- Debast, S. B., Bauer, M. P., Kuijper, E. J., & Diseases, E. S. o. C. M. a. I. (2014). European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection. *Clin Microbiol Infect*, 20 Suppl 2, 1-26. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12418>
- Denève, C., Deloménie, C., Barc, M. C., Collignon, A., & Janoir, C. (2008). Antibiotics involved in *Clostridium difficile*-associated disease increase colonization factor gene expression. *J Med Microbiol*, 57(Pt 6), 732-738. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47676-0>
- Desai, K., Gupta, S. B., Dubberke, E. R., Prabhu, V. S., Browne, C., & Mast, T. C. (2016). Epidemiological and economic burden of *Clostridium difficile* in the United States: estimates from a modeling approach. *BMC Infect Dis*, 16, 303. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1610-3>
- Dhalluin, A., Lemée, L., Pestel-Caron, M., Mory, F., Leluan, G., Lemeland, J. F., & Pons, J. L. (2003). Genotypic differentiation of twelve *Clostridium* species by polymorphism analysis of the triosephosphate isomerase (tpi) gene. *Syst Appl Microbiol*, 26(1), 90-96. <https://doi.org/10.1078/072320203322337362>
- Donskey, C. J., Kundrapu, S., & Deshpande, A. (2015). Colonization versus carriage of *Clostridium difficile*. *Infect Dis Clin North Am*, 29(1), 13-28. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2014.11.001>
- Drudy, D., Fanning, S., & Kyne, L. (2007). Toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile*. *Int J Infect Dis*, 11(1), 5-10. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2006.04.003>
- Dávila, L. P., Garza-González, E., Rodríguez-Zulueta, P., Morfín-Otero, R., Rodríguez-Noriega, E., Vilar-Compte, D., Rodríguez-Aldama, J. C., & Camacho-Ortiz, A. (2017). Increasing rates of *Clostridium difficile* infection in Mexican hospitals. *Braz J Infect Dis*, 21(5), 530-534. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2017.05.007>
- Edwards, A. N., Suárez, J. M., & McBride, S. M. (2013). Culturing and maintaining *Clostridium difficile* in an anaerobic environment. *J Vis Exp*(79), e50787. <https://doi.org/10.3791/50787>

- Ferraris, L., Couturier, J., Eckert, C., Delannoy, J., Barbut, F., Butel, M. J., & Aires, J. (2019). Carriage and colonization of *C. difficile* in preterm neonates: A longitudinal prospective study. *PLoS One*, *14*(2), e0212568. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212568>
- Flores, R., & Duery, O. (2017). *Documentos técnicos para el laboratorio clínico Diagnóstico Microbiológico de Clostridium difficile*. Santiago de Chile: Hormazabal, Juan Retrieved from http://www.ispch.cl/sites/default/files/Diagnostico_Microbiologico_de_C_difficile.pdf
- Freeman, J., Bauer, M. P., Baines, S. D., Corver, J., Fawley, W. N., Goorhuis, B., Kuijper, E. J., & Wilcox, M. H. (2010). The changing epidemiology of *Clostridium difficile* infections. *Clin Microbiol Rev*, *23*(3), 529-549. <https://doi.org/10.1128/CMR.00082-09>
- Friedman, N. D., Pollard, J., Stupart, D., Knight, D. R., Khajehnoori, M., Davey, E. K., Parry, L., & Riley, T. V. (2013). Prevalence of *Clostridium difficile* colonization among healthcare workers. *BMC Infect Dis*, *13*, 459. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-459>
- Furuya-Kanamori, L., Marquess, J., Yakob, L., Riley, T. V., Paterson, D. L., Foster, N. F., Huber, C. A., & Clements, A. C. (2015). Asymptomatic *Clostridium difficile* colonization: epidemiology and clinical implications. *BMC Infect Dis*, *15*, 516. <https://doi.org/10.1186/s12879-015-1258-4>
- Gerding, D. N., Johnson, S., Rupnik, M., & Aktories, K. (2014). *Clostridium difficile* binary toxin CDT: mechanism, epidemiology, and potential clinical importance. *Gut Microbes*, *5*(1), 15-27. <https://doi.org/10.4161/gmic.26854>
- Gerding, D. N., Meyer, T., Lee, C., Cohen, S. H., Murthy, U. K., Poirier, A., Van Schooneveld, T. C., Pardi, D. S., Ramos, A., Barron, M. A., Chen, H., & Villano, S. (2015). Administration of spores of nontoxicogenic *Clostridium difficile* strain M3 for prevention of recurrent *C. difficile* infection: a randomized clinical trial. *JAMA*, *313*(17), 1719-1727. <https://doi.org/10.1001/jama.2015.3725>
- Geric, B., Carman, R. J., Rupnik, M., Genheimer, C. W., Sambol, S. P., Lyerly, D. M., Gerding, D. N., & Johnson, S. (2006). Binary toxin-producing, large clostridial toxin-negative *Clostridium difficile* strains are enterotoxic but do not cause disease in hamsters. *J Infect Dis*, *193*(8), 1143-1150. <https://doi.org/10.1086/501368>
- Geric, B., Johnson, S., Gerding, D. N., Grabnar, M., & Rupnik, M. (2003). Frequency of binary toxin genes among *Clostridium difficile* strains that do not produce large clostridial toxins. *J Clin Microbiol*, *41*(11), 5227-5232. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.11.5227-5232.2003>
- Goldenberg, J. Z., Yap, C., Lytvyn, L., Lo, C. K., Beardsley, J., Mertz, D., & Johnston, B. C. (2017). Probiotics for the prevention of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults and children. *Cochrane Database Syst Rev*, *12*, CD006095. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD006095.pub4>
- Gülke, I., Pfeifer, G., Liese, J., Fritz, M., Hofmann, F., Aktories, K., & Barth, H. (2001). Characterization of the enzymatic component of the ADP-ribosyltransferase toxin CDTa from *Clostridium difficile*. *Infect Immun*, *69*(10), 6004-6011. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.10.6004-6011.2001>
- HALL, I. C., & O'TOOLE, E. (1935). INTESTINAL FLORA IN NEW-BORN INFANTS: WITH A DESCRIPTION OF A NEW PATHOGENIC ANAEROBE, BACILLUS DIFFICILIS. *American Journal of Diseases of Children*, *49*(2), 390-402. <https://doi.org/10.1001/archpedi.1935.01970020105010>
- He, M., Miyajima, F., Roberts, P., Ellison, L., Pickard, D. J., Martin, M. J., Connor, T. R., Harris, S. R., Fairley, D., Bamford, K. B., D'Arc, S., Brazier, J., Brown, D., Coia, J. E., Douce, G., Gerding, D., Kim, H. J., Koh, T. H., Kato, H., Senoh, M., Louie, T., Michell, S., Butt, E., Peacock, S. J., Brown, N. M., Riley, T., Songer, G., Wilcox, M., Pirmohamed, M., Kuijper, E., Hawkey, P., Wren, B. W., Dougan, G., Parkhill, J., & Lawley, T. D. (2013). Emergence and global spread of epidemic

- healthcare-associated *Clostridium difficile*. *Nat Genet*, 45(1), 109-113. <https://doi.org/10.1038/ng.2478>
- Hensgens, M. P., Dekkers, O. M., Demeulemeester, A., Buiting, A. G., Bloembergen, P., van Benthem, B. H., Le Cessie, S., & Kuijper, E. J. (2014). Diarrhoea in general practice: when should a *Clostridium difficile* infection be considered? Results of a nested case-control study. *Clin Microbiol Infect*, 20(12), O1067-1074. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12758>
- Hunt, J. J., & Ballard, J. D. (2013). Variations in virulence and molecular biology among emerging strains of *Clostridium difficile*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 77(4), 567-581. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00017-13>
- Janezic, S. (2016). Direct PCR-Ribotyping of *Clostridium difficile*. *Methods Mol Biol*, 1476, 15-21. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6361-4_2
- Jangi, S., & Lamont, J. T. (2010). Asymptomatic colonization by *Clostridium difficile* in infants: implications for disease in later life. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 51(1), 2-7. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e3181d29767>
- Kato, H., Kita, H., Karasawa, T., Maegawa, T., Koino, Y., Takakuwa, H., Saikai, T., Kobayashi, K., Yamagishi, T., & Nakamura, S. (2001). Colonisation and transmission of *Clostridium difficile* in healthy individuals examined by PCR ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis. *J Med Microbiol*, 50(8), 720-727. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-50-8-720>
- Kelly, C. P. (2012). Can we identify patients at high risk of recurrent *Clostridium difficile* infection? *Clin Microbiol Infect*, 18 Suppl 6, 21-27. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12046>
- Kovacs-Simon, A., Leuzzi, R., Kasendra, M., Minton, N., Titball, R. W., & Michell, S. L. (2014). Lipoprotein CD0873 is a novel adhesin of *Clostridium difficile*. *J Infect Dis*, 210(2), 274-284. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu070>
- Kyne, L., Warny, M., Qamar, A., & Kelly, C. P. (2000). Asymptomatic carriage of *Clostridium difficile* and serum levels of IgG antibody against toxin A. *N Engl J Med*, 342(6), 390-397. <https://doi.org/10.1056/NEJM200002103420604>
- Lai, H., Huang, C., Cai, J., Ye, J., She, J., Zheng, Y., Wang, L., Wei, Y., Fang, W., Wang, X., Tang, Y. W., Luo, Y., & Jin, D. (2018). Simultaneous detection and characterization of toxigenic *Clostridium difficile* directly from clinical stool specimens. *Front Med*, 12(2), 196-205. <https://doi.org/10.1007/s11684-017-0560-5>
- Lanzas, C., Dubberke, E. R., Lu, Z., Reske, K. A., & Gröhn, Y. T. (2011). Epidemiological model for *Clostridium difficile* transmission in healthcare settings. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 32(6), 553-561. <https://doi.org/10.1086/660013>
- Leffler, D. A., & Lamont, J. T. (2015). *Clostridium difficile* infection. *N Engl J Med*, 372(16), 1539-1548. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1403772>
- Leibowitz, J., Soma, V. L., Rosen, L., Ginocchio, C. C., & Rubin, L. G. (2015). Similar proportions of stool specimens from hospitalized children with and without diarrhea test positive for *Clostridium difficile*. *Pediatr Infect Dis J*, 34(3), 261-266. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000000556>
- Lemee, L., Dhalluin, A., Testelin, S., Mattrat, M. A., Maillard, K., Lemeland, J. F., & Pons, J. L. (2004). Multiplex PCR targeting tpi (triose phosphate isomerase), tcdA (Toxin A), and tcdB (Toxin B) genes for toxigenic culture of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol*, 42(12), 5710-5714. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.12.5710-5714.2004>
- Loo, V. G., Poirier, L., Miller, M. A., Oughton, M., Libman, M. D., Michaud, S., Bourgault, A. M., Nguyen, T., Frenette, C., Kelly, M., Vibien, A., Brassard, P., Fenn, S., Dewar, K., Hudson, T. J., Horn, R., René, P., Monczak, Y., & Dascal, A. (2005). A predominantly clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality. *N Engl J Med*, 353(23), 2442-2449. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa051639>

- López-Ureña, D., Quesada-Gómez, C., Miranda, E., Fonseca, M., & Rodríguez-Cavallini, E. (2014). Spread of epidemic *Clostridium difficile* NAP1/027 in Latin America: case reports in Panama. *J Med Microbiol*, 63(Pt 2), 322-324. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.066399-0>
- Maaß, S., Otto, A., Albrecht, D., Riedel, K., Trautwein-Schult, A., & Becher, D. (2018). Proteomic Signatures of. *Cells*, 7(11). <https://doi.org/10.3390/cells7110213>
- Mazzola, P. G., Martins, A. M., & Penna, T. C. (2006). Chemical resistance of the gram-negative bacteria to different sanitizers in a water purification system. *BMC Infect Dis*, 6, 131. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-6-131>
- McDonald, E. G., Milligan, J., Frenette, C., & Lee, T. C. (2015). Continuous Proton Pump Inhibitor Therapy and the Associated Risk of Recurrent *Clostridium difficile* Infection. *JAMA Intern Med*, 175(5), 784-791. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2015.42>
- Miyajima, F., Roberts, P., Swale, A., Price, V., Jones, M., Horan, M., Beeching, N., Brazier, J., Parry, C., Pendleton, N., & Pirmohamed, M. (2011). Characterisation and carriage ratio of *Clostridium difficile* strains isolated from a community-dwelling elderly population in the United Kingdom. *PLoS One*, 6(8), e22804. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022804>
- Morfin-Otero, R., Garza-Gonzalez, E., Aguirre-Diaz, S. A., Escobedo-Sanchez, R., Esparza-Ahumada, S., Perez-Gomez, H. R., Petersen-Morfin, S., Gonzalez-Diaz, E., Martinez-Melendez, A., Rodriguez-Noriega, E., & Hospital Civil de Guadalajara, F. a. A. A. C. d. T. (2016). *Clostridium difficile* outbreak caused by NAP1/BI/027 strain and non-027 strains in a Mexican hospital. *Braz J Infect Dis*, 20(1), 8-13. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2015.09.008>
- Muñoz, M., Restrepo-Montoya, D., Kumar, N., Iraola, G., Herrera, G., Ríos-Chaparro, D. I., Díaz-Arévalo, D., Patarroyo, M. A., Lawley, T. D., & Ramírez, J. D. (2019). Comparative genomics identifies potential virulence factors in. *Virulence*, 10(1), 657-676. <https://doi.org/10.1080/21505594.2019.1637699>
- Natarajan, M., Walk, S. T., Young, V. B., & Aronoff, D. M. (2013). A clinical and epidemiological review of non-toxicogenic *Clostridium difficile*. *Anaerobe*, 22, 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.05.005>
- Ochoa-Hein, E., Sifuentes-Osornio, J., Ponce de León-Garduño, A., Torres-González, P., Granados-García, V., & Galindo-Fraga, A. (2018). Factors associated with an outbreak of hospital-onset, healthcare facility-associated *Clostridium difficile* infection (HO-HCFA CDI) in a Mexican tertiary care hospital: A case-control study. *PLoS One*, 13(5), e0198212. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198212>
- Perelle, S., Gibert, M., Bourlioux, P., Corthier, G., & Popoff, M. R. (1997). Production of a complete binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) by *Clostridium difficile* CD196. *Infect Immun*, 65(4), 1402-1407. <https://doi.org/10.1128/IAI.65.4.1402-1407.1997>
- Persson, S., Torpdahl, M., & Olsen, K. E. (2008). New multiplex PCR method for the detection of *Clostridium difficile* toxin A (tcdA) and toxin B (tcdB) and the binary toxin (cdtA/cdtB) genes applied to a Danish strain collection. *Clin Microbiol Infect*, 14(11), 1057-1064. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02092.x>
- Planche, T., & Wilcox, M. H. (2015). Diagnostic pitfalls in *Clostridium difficile* infection. *Infect Dis Clin North Am*, 29(1), 63-82. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2014.11.008>
- Poutanen, S. M., & Simor, A. E. (2004). *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults. *CMAJ*, 171(1), 51-58. <https://doi.org/10.1503/cmaj.1031189>
- Pépin, J., Valiquette, L., Alary, M. E., Villemure, P., Pelletier, A., Forget, K., Pépin, K., & Chouinard, D. (2004). *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity. *CMAJ*, 171(5), 466-472. <https://doi.org/10.1503/cmaj.1041104>

- Rees, W. D., & Steiner, T. S. (2018). Adaptive immune response to *Clostridium difficile* infection: A perspective for prevention and therapy. *Eur J Immunol*, 48(3), 398-406. <https://doi.org/10.1002/eji.201747295>
- Riegler, M., Sedivy, R., Pothoulakis, C., Hamilton, G., Zacherl, J., Bischof, G., Cosentini, E., Feil, W., Schiessel, R., & LaMont, J. T. (1995). *Clostridium difficile* toxin B is more potent than toxin A in damaging human colonic epithelium in vitro. *J Clin Invest*, 95(5), 2004-2011. <https://doi.org/10.1172/JCI117885>
- Riggs, M. M., Sethi, A. K., Zabarsky, T. F., Eckstein, E. C., Jump, R. L., & Donskey, C. J. (2007). Asymptomatic carriers are a potential source for transmission of epidemic and nonepidemic *Clostridium difficile* strains among long-term care facility residents. *Clin Infect Dis*, 45(8), 992-998. <https://doi.org/10.1086/521854>
- Rineh, A., Kelso, M. J., Vatansever, F., Tegos, G. P., & Hamblin, M. R. (2014). *Clostridium difficile* infection: molecular pathogenesis and novel therapeutics. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 12(1), 131-150. <https://doi.org/10.1586/14787210.2014.866515>
- Rousseau, C., Levenez, F., Fouqueray, C., Doré, J., Collignon, A., & Lepage, P. (2011). *Clostridium difficile* colonization in early infancy is accompanied by changes in intestinal microbiota composition. *J Clin Microbiol*, 49(3), 858-865. <https://doi.org/10.1128/JCM.01507-10>
- Rupnik, M. (2008). Heterogeneity of large clostridial toxins: importance of *Clostridium difficile* toxinotypes. *FEMS Microbiol Rev*, 32(3), 541-555. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00110.x>
- Rupnik, M., & Janezic, S. (2016). An Update on *Clostridium difficile* Toxinotyping. *J Clin Microbiol*, 54(1), 13-18. <https://doi.org/10.1128/JCM.02083-15>
- Rupnik, M., Wilcox, M. H., & Gerding, D. N. (2009). *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol*, 7(7), 526-536. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2164>
- Samie, A., Obi, C. L., Franasiak, J., Archbald-Pannone, L., Bessong, P. O., Alcantara-Warren, C., & Guerrant, R. L. (2008). PCR detection of *Clostridium difficile* triose phosphate isomerase (tpi), toxin A (tcdA), toxin B (tcdB), binary toxin (cdtA, cdtB), and tcdC genes in Vhembe District, South Africa. *Am J Trop Med Hyg*, 78(4), 577-585.
- Shannon-Lowe, J., Matheson, N. J., Cooke, F. J., & Aliyu, S. H. (2010). Prevention and medical management of *Clostridium difficile* infection. *BMJ*, 340, c1296. <https://doi.org/10.1136/bmj.c1296>
- Shim, J. K., Johnson, S., Samore, M. H., Bliss, D. Z., & Gerding, D. N. (1998). Primary symptomless colonisation by *Clostridium difficile* and decreased risk of subsequent diarrhoea. *Lancet*, 351(9103), 633-636. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)08062-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)08062-8)
- Shim, J. O. (2014). *Clostridium difficile* in Children: To Treat or Not to Treat? *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr*, 17(2), 80-84. <https://doi.org/10.5223/pghn.2014.17.2.80>
- Slimings, C., & Riley, T. V. (2014). Antibiotics and hospital-acquired *Clostridium difficile* infection: update of systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother*, 69(4), 881-891. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt477>
- Smits, W. K., Lyras, D., Lacy, D. B., Wilcox, M. H., & Kuijper, E. J. (2016). *Clostridium difficile* infection. *Nat Rev Dis Primers*, 2, 16020. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.20>
- Stoesser, N., Crook, D. W., Fung, R., Griffiths, D., Harding, R. M., Kachrimanidou, M., Keshav, S., Peto, T. E., Vaughan, A., Walker, A. S., & Dingle, K. E. (2011). Molecular epidemiology of *Clostridium difficile* strains in children compared with that of strains circulating in adults with *Clostridium difficile*-associated infection. *J Clin Microbiol*, 49(11), 3994-3996. <https://doi.org/10.1128/JCM.05349-11>

- Sudarsan, N., Lee, E. R., Weinberg, Z., Moy, R. H., Kim, J. N., Link, K. H., & Breaker, R. R. (2008). Riboswitches in eubacteria sense the second messenger cyclic di-GMP. *Science*, 321(5887), 411-413. <https://doi.org/10.1126/science.1159519>
- Tasteyre, A., Barc, M. C., Collignon, A., Boureau, H., & Karjalainen, T. (2001). Role of FliC and FliD flagellar proteins of *Clostridium difficile* in adherence and gut colonization. *Infect Immun*, 69(12), 7937-7940. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.12.7937-7940.2001>
- Tasteyre, A., Karjalainen, T., Avesani, V., Delmée, M., Collignon, A., Bourlioux, P., & Barc, M. C. (2001). Molecular characterization of fliD gene encoding flagellar cap and its expression among *Clostridium difficile* isolates from different serogroups. *J Clin Microbiol*, 39(3), 1178-1183. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.3.1178-1183.2001>
- Theriot, C. M., Bowman, A. A., & Young, V. B. (2016). Antibiotic-Induced Alterations of the Gut Microbiota Alter Secondary Bile Acid Production and Allow for *Clostridium difficile* Spore Germination and Outgrowth in the Large Intestine. *mSphere*, 1(1). <https://doi.org/10.1128/mSphere.00045-15>
- Triadafilopoulos, G., Pothoulakis, C., O'Brien, M. J., & LaMont, J. T. (1987). Differential effects of *Clostridium difficile* toxins A and B on rabbit ileum. *Gastroenterology*, 93(2), 273-279. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(87\)91014-6](https://doi.org/10.1016/0016-5085(87)91014-6)
- van Beurden, Y. H., de Groot, P. F., van Nood, E., Nieuwdorp, M., Keller, J. J., & Goorhuis, A. (2017). Complications, effectiveness, and long term follow-up of fecal microbiota transfer by nasoduodenal tube for treatment of recurrent. *United European Gastroenterol J*, 5(6), 868-879. <https://doi.org/10.1177/2050640616678099>
- Voth, D. E., & Ballard, J. D. (2005). *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. *Clin Microbiol Rev*, 18(2), 247-263. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.2.247-263.2005>
- Youngster, I., Russell, G. H., Pindar, C., Ziv-Baran, T., Sauk, J., & Hohmann, E. L. (2014). Oral, capsulized, frozen fecal microbiota transplantation for relapsing *Clostridium difficile* infection. *JAMA*, 312(17), 1772-1778. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.13875>
- Yu, H., Chen, K., Wu, J., Yang, Z., Shi, L., Barlow, L. L., Aronoff, D. M., Garey, K. W., Savidge, T. C., von Roseninge, E. C., Kelly, C. P., & Feng, H. (2015). Identification of toxemia in patients with *Clostridium difficile* infection. *PLoS One*, 10(4), e0124235. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124235>
- Zacharioudakis, I. M., Zervou, F. N., Pliakos, E. E., Ziakas, P. D., & Mylonakis, E. (2015). Colonization with toxinogenic *C. difficile* upon hospital admission, and risk of infection: a systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol*, 110(3), 381-390; quiz 391. <https://doi.org/10.1038/ajg.2015.22>
- Álvarez-Hernández, D. A., González-Chávez, A. M., González-Hermosillo-Cornejo, D., Franyuti-Kelly, G. A., Díaz-Girón-Gidi, A., & Vázquez-López, R. (2018). Present and past perspectives on *Clostridium difficile* infection. *Rev Gastroenterol Mex*, 83(1), 41-50. <https://doi.org/10.1016/j.rgmex.2017.03.004>
- Đapa, T., Dapa, T., Leuzzi, R., Ng, Y. K., Baban, S. T., Adamo, R., Kuehne, S. A., Scarselli, M., Minton, N. P., Serruto, D., & Unnikrishnan, M. (2013). Multiple factors modulate biofilm formation by the anaerobic pathogen *Clostridium difficile*. *J Bacteriol*, 195(3), 545-555. <https://doi.org/10.1128/JB.01980-12>

14. ANEXOS

14.1 formulario de datos clínicos de los donadores

Muestras proporcionadas para el estudio "Detección de <i>Clostridium difficile</i> en portadores asintomáticos"			
Nombre			
Edad			
Sexo			
Presencia de diarrea en la última semana	Si	No	
Hospitalización durante los últimos 4 meses	Si	No	
Cirugía Intestinal	Si	No	
Uso frecuente de antiácidos (especifique cuál)	Si	No	
Uso de antibióticos/antimicrobianos durante los últimos 2 meses (especifique cuál)	Si	No	
Dieta especial, vegetariana u otra (especifique cuál)	Si	No	

14.2 Estandarización de la PCR para la amplificación del gen *tpi*

Para el gen *tpi* se utilizarán un par de oligos y las extracciones de DNA de las muestras del estudio se ajustarán a 300ng. Las condiciones para la obtención de productos de PCR y los oligos serán los siguientes:

Gen	Oligos	Tamaño de Amplicón pb
<i>Tpi</i>	<i>tpi</i> -F [5-AAAGAAGCTACTAAGGGTACAAA-3] <i>tpi</i> -R [5-CATAATATTGGGTCTATTCCTAC-3]	230

Condiciones termociclador 2 repeticiones 30 ciclos	
95°C	3 min
95°C	20 seg
56°C	30 seg
72°C	30 seg
72°C	5 min

H ₂ O	7.95 ul
Buffer MgCl ₂	1.25 ul
dNTPs	0.2 ul
Oligo F	1 ul
Oligo R	1 ul
Taq Polimerasa	0.1 ul
DNA	1 ul

14.3 Estandarización de la PCR para la amplificación de los genes *tcdA*, *tcdB*, *cdtA* y *cdtB* correspondientes a las toxinas de *C. difficile*

Gen	Oligos	Tamaño de Amplicón pb
<i>tcdA</i>	<i>tcdA</i> -F [5-GCATGATAAGGCAACTTCAGTGGTA-3]	629

	<i>tcdA</i> -R [5- AGTTCCTCCTGCTCCATCAAATG - 3]	
<i>tcdB</i>	<i>tcdB</i> -F [5- CCAAARTGGAGTGTTACAAACAGGTG- 3] <i>tcdB</i> -R [5- GCATTTCTCCATTCTCAGCAAAGTA-3]	410
<i>cdtA</i>	<i>cdtA</i> -F [5- GGGAAGCACTATATTAAGCAGAAGC- 3] <i>cdtA</i> -R [5- GGGAAACATTATATTAAGCAGAAGC- 3]	221
<i>cdtB</i>	<i>cdtB</i> -F [5- TTGACCCAAAGTTGATGTCTGATTG- 3] <i>cdtB</i> -R [5- CGGATCTCTTGCTTCAGTCTTTATAG- 3]	262

Las condiciones para la obtención de productos de PCR, para cada toxina individualmente, serán las siguientes:

Condiciones termociclador 2 repeticiones 30 ciclos	
94°C	5 min
94°C	45 seg
55°C	50 seg
72°C	1 min
72°C	10 min

H ₂ O	7.9ul
Buffer MgCl ₂	1.25 ul
dNTPs	0.2 ul
Oligo F	1 ul
Oligo R	1 ul
Taq Polimerasa	0.15ul
DNA	1 ul

14.4 Estandarización de la PCR para la confirmación de especie basado en la identificación molecular del *16S rRNA*

Gen	Oligos	Tamaño de Amplicón pb
<i>16S rRNA</i>	PS13 GGAGGCAGCAGTGGGGAATA PS14 TGACGGGCGGTGTGTACAAG	1062

Condiciones termociclador 2 repeticiones 35 ciclos	
94°C	15 min
94°C	45 seg
59°C	50 seg
72°C	1 min
72°C	10 min

H ₂ O	7.75ul
Buffer MgCl ₂	1.25 ul
dNTPs	0.3 ul
Oligo F	1 ul
Oligo R	1 ul
Taq Polimerasa	0.2 ul
DNA	1 ul

14.5 Purificación de Banda por kit

Todos los pasos de centrifugación deberán realizarse entre 10,000 - 16,000 rpm

1. Se cortará el fragmento de DNA del gel de agarosa usando una cuchilla de afeitar, bisturí u otro y será transferido a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml.
2. Posteriormente se agregarán 3 volúmenes de buffer ADB por cada volumen de agarosa extirpado del gel (por ejemplo, por 100 μ l (mg) de gel de agarosa se agregarán 300 μ l de ADB).
3. Después se incubará a 37-55 ° C durante 5-10 minutos hasta que el gel se disuelva por completo.
4. Se transferirá la solución de agarosa derretida a una columna Zymo-Spin TM
5. Centrifugaremos durante 30-60 segundos y desecharemos el sobrenadante.
6. Agregaremos 200 μ l de tampón de lavado de ADN a la columna y centrifugaremos durante 30 segundos. Desecharemos el sobrenadante. A continuación, repetiremos el paso de lavado.
7. Pondremos la columna en un tubo nuevo de 1.5 ml y agregaremos 10 μ l de tampón de elución de ADN o agua directamente a la matriz de la columna y centrifugaremos de 30-60 segundos para eluir el ADN.
8. Por último correremos 1ul del ADN purificado en un gel de agarosa para verificar que el proceso fue exitoso.

14.6 Tinción de Gram

1. Se etiquetarán los portaobjetos por uno de sus extremos con los nombres de las cepas.
2. Prepararemos los frotos bacterianos a partir de cultivos líquidos.
3. Fijaremos con calor (mechero).
4. Agregaremos cristal violeta en cantidad suficiente para cubrir el frote (2 a 3 gotas) y dejaremos actuar durante 1 minuto.

5. Lavaremos con el mínimo de agua para eliminar el exceso de colorante.
6. Agregaremos lugol en cantidad suficiente para cubrir el frote (2 a 3 gotas) y dejaremos actuar durante 1 minuto.
7. Lavaremos con el mínimo de agua para eliminar el exceso de mordiente.
8. Decoloraremos con alcohol acetona hasta que el efluente salga incoloro.
9. Lavaremos con agua para eliminar el exceso.
10. Agregaremos safranina en cantidad suficiente hasta cubrir el frotis (2 ó 3 gotas) y dejaremos actuar por 1 minuto.
11. Lavaremos con agua para eliminar el exceso del colorante de contraste.
12. Dejaremos secar la preparación a temperatura ambiente.
13. Observaremos al microscopio con el objetivo de 100x.

MUESTRAS DE ADULTOS																
Fecha de Recolección	Sexo	Edad	Cuestionario				Cultivo			Tinción Gram			PCR			
			Presencia de Diarrea en la última semana	Hospitaliza don durante los últimos 4 meses	Cirugía Intestinal	Uso frecuente de antibióticos	Uso de antibióticos /antimicrobi anos durante los últimos 2 meses (especifica e cual)	Dieta especial, vegetarian a u otra (especifica e cual)	Clave	CCFA	Numero de Colonias	Morfología Observada	tpi	tcdA	tcdB	cdtA
08/06/2018	Masculino	22	No	No	No	No	No	Ninguna	001 CA	Positivo	4	Cocos y Bacilos Gram negativos	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
22/06/2018	Femenino	22	No	No	No	No	No	Ninguna	002 CA	Positivo	2	Bacilos Gram positivos	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
22/06/2018	Masculino	25	No	No	No	No	No	Ninguna	003 CA	Positivo	1	Bacilos Gram positivos	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
22/06/2018	Masculino	23	No	No	No	No	No	Ninguna	004 CA	Positivo	4	Bacilos Gram positivos	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
22/06/2018	Masculino	22	No	No	No	No	No	Ninguna	005 CA	Positivo	3	Bacilos Gram positivos	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
22/06/2018	Masculino	22	No	No	No	No	No	Ninguna	006 CA	Negativo	-	-	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
22/06/2018	Masculino	23	No	No	No	No	No	Ninguna	007 CA	Negativo	-	-	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
25/06/2018	Femenino	22	No	No	No	No	No	Ninguna	008 CA	Positivo	4	Bacilos Gram positivos	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
27/06/2018	Femenino	24	No	No	No	No	No	Ninguna	009 CA	Positivo	5	Bacilos Gram positivos	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
27/06/2018	Femenino	22	No	No	No	No	No	Ninguna	010 CA	Positivo	4	Bacilos Gram positivos	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
06/08/2018	Masculino	46	No	No	No	No	No	Ninguna	011 CA	Positivo	2	Bacilos Gram negativos	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
06/08/2018	Masculino	52	No	No	No	No	No	Ninguna	012 CA	Negativo	-	-	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
06/08/2018	Femenino	52	No	No	No	No	No	Ninguna	013 CA	Positivo	1	Cocos Gram positivos	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
06/08/2018	Femenino	21	No	No	No	No	No	Ninguna	014 CA	Positivo	2	Cocos Gram positivos	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
10/10/2018	Masculino	20	No	No	No	No	No	Ninguna	015 CA	Positivo	3	Bacilos Gram positivos	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
11/10/2018	Femenino	22	No	No	No	No	No	Ninguna	016 CA	Negativo	-	-	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
11/10/2018	Femenino	20	No	No	No	No	No	Ninguna	017 CA	Positivo	2	Bacilos Gram negativos	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
11/10/2018	Femenino	20	No	No	No	No	No	Ninguna	018 CA	Positivo	5	Bacilos Gram positivos	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
11/10/2018	Femenino	45	No	No	No	No	No	Ninguna	019 CA	Positivo	2	Bacilos Gram positivos	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
12/10/2020	Femenino	21	No	No	No	No	No	Ninguna	020 CA	Negativo	-	-	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
12/10/2020	Femenino	19	No	No	No	No	No	Ninguna	021 CA	Negativo	-	-	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
12/10/2020	Masculino	20	No	No	No	No	No	Ninguna	022 CA	Negativo	-	-	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
12/10/2020	Femenino	20	No	No	No	No	No	Ninguna	023 CA	Positivo	1	Bacilos Gram positivos	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
12/10/2020	Femenino	56	No	No	No	No	No	Ninguna	024 CA	Positivo	4	Bacilos Gram positivos	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
15/06/2019	Femenino	25	No	No	No	No	No	Ninguna	025 CA	Positivo	5	Bacilos Gram positivos	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
15/06/2019	Femenino	30	No	No	No	No	No	Ninguna	026 CA	Positivo	5	Bacilos Gram positivos	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
15/06/2019	Masculino	23	No	No	No	No	No	Ninguna	027 CA	Positivo	5	Bacilos Gram positivos	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
15/06/2019	Masculino	27	No	No	No	No	No	Ninguna	028 CA	Positivo	5	Bacilos Gram positivos	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
15/06/2019	Femenino	24	No	No	No	No	No	Ninguna	029 CA	Negativo	-	-	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
15/06/2019	Masculino	23	No	No	No	No	No	Ninguna	030 CA	Negativo	-	-	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

14.7 Tabla Recolección de Datos Muestras de Adultos

MUESTRAS DE INFANTES																	
Cuestionario										Cultivo		Tinción Gram		PCR			
Fecha de Recolección	Sexo	Edad	Presencia de Diarrea en la última semana	Hospitalización durante los últimos 4 meses	Cirugía Intestinal	Uso frecuente de antiácidos	Uso de antibióticos/an timicrobianos durante los últimos 2 meses (especificar cuál)	Dieta especial, vegetariana u otra (especificar cuál)	Clave	CCFA	Numero de Clonas	Morfología Observada	tpi	tcDA	tcCB	cdHA	cdTB
08/07/2018	Masculino	1	No	No	No	No	No	Nirguna	001 CI	Positivo	4	Bacilos Gram positivos	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
08/07/2018	Femenino	0.8	No	No	No	No	No	Nirguna	002 CI	Positivo	1	Bacilos Gram positivos	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
08/07/2018	Masculino	8	No	No	No	No	No	Nirguna	003 CI	Positivo	1	Bacilos Gram positivos	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
08/07/2018	Masculino	3	No	No	No	No	No	Nirguna	004 CI	Positivo	4	Bacilos Gram positivos	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
15/06/2019	Masculino	1	No	No	No	No	No	Nirguna	005 CI	Positivo	1	Bacilos Gram positivos	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
15/06/2019	Masculino	3	No	No	No	No	No	Nirguna	006 CI	Negativo	-	-	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
15/06/2019	Masculino	8	No	No	No	No	No	Nirguna	007 CI	Negativo	-	-	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
15/06/2019	Masculino	4	No	No	No	No	No	Nirguna	008 CI	Negativo	-	-	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
15/06/2019	Femenino	3	No	No	No	No	No	Nirguna	009 CI	Positivo	2	Bacilos Gram positivos	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
15/06/2019	Femenino	1	No	No	No	No	No	Nirguna	010 CI	Negativo	-	-	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
15/06/2019	Masculino	6	No	No	No	No	No	Nirguna	011 CI	Positivo	4	Cocos Gram negativos	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
15/06/2019	Femenino	5	No	No	No	No	No	Nirguna	012 CI	Negativo	-	-	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
15/06/2019	Masculino	11	No	No	No	No	No	Nirguna	013 CI	Negativo	-	-	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
15/06/2019	Masculino	1	No	No	No	No	No	Nirguna	014 CI	Negativo	-	-	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
15/06/2019	Femenino	2	No	No	No	No	No	Nirguna	015 CI	Negativo	-	-	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
15/06/2019	Masculino	1	No	No	No	No	No	Nirguna	016 CI	Positivo	1	Bacilos Gram positivos	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
15/06/2019	Femenino	0.8	No	No	No	No	No	Nirguna	017 CI	Positivo	3	Bacilos Gram positivos	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
22/06/2019	Femenino	4	No	No	No	No	No	Nirguna	018 CI	Negativo	-	-	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
22/06/2019	Masculino	4	No	No	No	No	No	Nirguna	019 CI	Positivo	2	Bacilos Gram positivos	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
22/06/2019	Masculino	11	No	No	No	No	No	Nirguna	020 CI	Positivo	4	Bacilos Gram positivos	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
22/06/2019	Masculino	2	No	No	No	No	No	Nirguna	021 CI	Positivo	3	Cocos Gram positivos	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
22/06/2019	Masculino	2	No	No	No	No	No	Nirguna	022 CI	Negativo	-	-	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
22/06/2019	Masculino	8	No	No	No	No	No	Nirguna	023 CI	Positivo	1	Bacilos Gram positivos	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
29/06/2019	Masculino	10	No	No	No	No	No	Nirguna	024 CI	Negativo	-	-	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
29/06/2019	Masculino	2	No	No	No	No	No	Nirguna	025 CI	Negativo	-	-	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
29/06/2019	Femenino	9	No	No	No	No	No	Nirguna	026 CI	Positivo	2	Cocos Gram positivos	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
29/06/2019	Femenino	5	No	No	No	No	No	Nirguna	028 CI	Positivo	4	Bacilos Gram positivos	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
29/06/2019	Femenino	4	No	No	No	No	No	Nirguna	029 CI	Negativo	-	-	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
29/06/2019	Masculino	0.9	No	No	No	No	No	Nirguna	030 CI	Negativo	-	-	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
29/06/2019	Femenino	7	No	No	No	No	No	Nirguna	031 CI	Positivo	2	Cocos Gram positivos	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
29/06/2019	Femenino	6	No	No	No	No	No	Nirguna	032 CI	Negativo	-	-	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
29/06/2019	Masculino	1	No	No	No	No	No	Nirguna	033 CI	Positivo	2	Bacilos Gram positivos	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo

14.8 Tabla Recolección de Datos Muestras de Infantes

14.9 Secuencias de las muestras aisladas positivas al gen *tpi*

>033 CI

```
GKGKAGGCAGCMSMGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCTGATGCAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAG
CCTTCGGGTTCGTAAACTCTGTCTCAAGGAAGATAATGACGGTACTTGAGGAGCTAAGCCCCGGCTAACTACG
TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCTAGCGTTATCCGGATTTACTGGGCGTAAAGGGTTCGTAGGCGG
TCTTTCAAGTCAGGAGTGAAAGGCTACGGCTCAACCGTAGTAAGCTCTTGAAACTGGGAGACTTGAGTGACAGG
AGAGGAGAGTGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTTGCGAAGGCGGC
TCTYTGGACTGTAACCTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC
GCTGTAAACGATGAGTACTAGGTGTGGGGGTTACCCCCYTCGGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTACTCCGC
CTGGGAAGTACGCTCGCAAGAGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGTASC GGAGCATGTGGT
TTAATTYGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTAAGCTTGACATCCCAATGACATCTCCTTAATCGGAGAGTTCC
CTTCGGGGACATTGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGTCTCGTGTGAGATGYTGGGTTAARTCCCG
CAACGAGCGCAACCCCTTGTCTTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAGMGAGACTGCCMGGGATAACCT
GGAGGAAGGTGGGGMTGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGCTTAGGGCTACACACGTGCTMCAATGGGTAG
TACAGAGGGTTSCCAAGCCGTAMGGTGGASCTMATCCCTTAAAGCTACTCTCAGTTC SGMTTSTAGGCTGAAA
CTCGCCTACATGAAGCTGGMGTTACTAGTAATCGCMGMTCSAATGCTGCGGACTSCC
```

>001 CI

```
TTGGGSCCATTGAATGCAATGCAACCTKASCACCCSGTGAGTAGCTGTTTCGTATYGTCTCAGAAGTATRCCGT
ACTRGAGGAGCTGCTACTMCKKCAGCAGCGGTAWCGTAGGGCTAGCGTATCGATTACTGCGTAGTYCTAGCG
TCTTCAGTCAGGAKGAAGCTACGCTCACGTAGTAGCTCTTGAAGTGGAGACTGAGKGCAGRRRAGGAGAGTGG
AATTCCTAGTGTAGCGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTTGCGAAGGCGGCTCTCTGGACTGTA
ACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTGCACGCTGTAAACGATGA
GTACTAGGTGTGGGGGTTACCCCCCTTCGGTGCCGCAGCTAACGCATTAARWAMTCCGCCTGGGAAGTACGCT
CGCAAGAGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGTASC GGARCA YGTGGTTAATTCGAAGCAA
CGCGAAGAACCTTACCTAAGCTTGACATMCCAATGACATCTCCTTAATCGGAGAGTCCCTTCGGGGACATTG
GTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTGAGATGYTGGGTTAARTCCCGCAACGAGCGCAACC
CTTGTCTTTAGTTGCCATCATTAASTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCAGGGATAACCTGGAGGAAGGTGGGG
ATGAMGTCAAATCATCATGCCCTTATGCTTAGGGSTACACACGTGCTMCAATGGGTAGTACAGAGGGTTCCC
AAGCCGTAAGGTGGACMTCATCCMTTAAAGYACTCTCAGTTMCGATYGTAGGMTGAAACTYGCCTACAGAAG
CWGGAGTTACTAGTAATCGCMGMTCSAAYGATGCGACACC
```

>018 CA

```
TTGRWGGCARGCAGKGGATATGCACATGGGGAAAACCTGATGCAGCACGCGCGTGAGTGATGAGTTTCGATCGT
AAGCTCTGTCTTGGGAAGATAATGACGTACCCAAGAGGAAGCACGGCTAACTACGKGCAGCAGCCGCGGTAA
TACGTAGGTGGCGAGCGTWTCCGGATTTACTGGGCGTAAAGGGAGCGTAGGSGGRWKGRRTAAGKGGGATGTG
AAATACCCGGSTCAACTTKGGTGTGCTGCATTCCAAACTGGTTATCTAGAGTGCAGGAGAGGAGAGTGGAAATC
CTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTAGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCCGGACTGTAACCTG
ACGCTGAGGCTYGAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCSGTAAACGATYAATA
CSAGGTGTGGGGGTTTCAACACCTCCGTGCCGCCGCTAACGCATTAAGTATTCCGCCTGGGGAGTACGGTCCG
AAGATTA AAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGTAGCGGAGCATGTGGTTTAATTYGAAGCAACGC
GAAGAACCTTACCTACACTTGACATCCCTTGCACTACTYTTAATCGAGGAAATCCCTTYGGGGACAAGGTGAC
AGGTGGTGCATGGTTGTGTGTCAGCTYGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGT
CGTTAGTTACTACCMTTAAGTTGAGGACTCTAGCGAGACTGCCTGGGTTAACCAGGAGGAAGGTGGGGATGAC
GTCAAATCATCATGCCCTTATGTGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCTGGTACMSAGAGATGCAATMCC
SYGAGGTGGAGCCAAACTTAAAAACCAGTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGAAACTYGCCTACATGAAGCTGGA
GTTACTAGTAATCGCGAATCAGAAKTCGCTKAAATSC
```

>025 CA

GGWRGGCAGCCRGGKGGGAATWTTGCMCAATGGGGGAAACCCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGG
TTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTCTKTGGGGAAGATAATGACGGTYRCCCAAGGAGGAAGCCACGGCTRACTAC
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGGCGAGCGTTATCCGGATTTACTGGGCGTAAAGGGAGCGTAGGS
GGATGATTAACCTGGGATGTGAAATACCCGGGCTCAACTTGGGTGCTGCATTCCAAACTGGTTATCTAGAGTGC
AGGAGAGGAGAGTGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTAGGAAGAACCACAGTGGCGAAGGC
GACTCTCTGGACTGTAACCTGACGCTGAGGCTYGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC
CACGCCGTRYACGATGAATACTAGGTGTGGGGTTTTCAACACCTCCGTGCCGCCGCTAACGCATTAAGTATTC
CGCCTGGGGAGTACGGTGCAGATTAATAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGTAGCGGAGCATGT
GGTTTAATTYGAAGCAACGCAAGAACCTTACCTACACYTGMCAATCCCTTGCATTACTCTTAATCGAGGAAAT
CCCTTYGGGGACAAGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTGCGTACGCTYGTGTGCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC
GCAACGAGCGCAACCCTTGTGCTTAGTTACTACCATTAAGTTGAGGACTCTAGCGAGACTGCCTGGGTTAACC
AGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCTG
GTACMSAGAGATGCAATMCCSCGAGGTGGAGCCAAACTTAAAAACCAGTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGAAA
CTCGCCTACATGAAGCTGGAGTTACTAGTAATCGCGAATCAGAATTCGCGKACTSC

>015 CA

GRTTTTTGGTAGWASACCKGKGGGAGAATATACTMCAAATGGGGGGAAACCTTAGCWSACAAMCGCGSGKGR
AGKAKRKAAGGTTTTTYKGMKYAAAAATYCTSTYTTTTGRRRARRWWAAWAGCAACCAAMGRGRGGARGCCM
YGGCTYAAYWTSKKGCCMGRCMRGCSSSGGGTATATACMKAGGKGGSSRRRSSGYWTCCGGATTTACKKGG
SGKAAAAAGGGARGSKWKGGCGAWGGWTWARKKGGRRWKKKARAWACCCCGGGCYACACYTTGGKKGCT
KCATTYCAAACCTGGTTWYTYWRRGKSCMAGGAGAAGRARAGTGGAAATYYTAGTKTAGCGGTGAAATGCG
TAGARGATTAGGAAGAAMCCAGTGGCGAAGGCGACTYTYTGACKGTAACCTGACGCTGAGGCTYGAAAGCGT
GGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAATACTAGGTGTGGGGTTTTCAAC
ACCTCCGTGCCGCCGCTAACGCATTAAGTATTCGCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGATTAATAACTCAAAGGAA
TTGACGGGGACCCGCACAAGTAGCGGAGCATGTGGTTTAATTYGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTACACTT
GMCATCCCTTGCATTACTCTTAATCGAGGAAATCCCTTYGGGGACAAGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTGCT
CAGCTYGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTGCTTAGSTACTACCATTAAG
TTGAGGACTCTAGCGAGACTGCCTGGGTTAACCAGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTT
ATGTGTAGGGCTACACACGTGCAATGGCTGGTACMSAGAGATGCAATMCCSYGAGGTGGAGCCAAACTTW
AAAACCAGTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGAAACTYGCCTACATGAAGCTGGAGTTACTAGTAATCGCGAATC
AGAAKTCGCTAATCSC

>002 CA

TYKGAGMCMGKGGATGTCCAATGGAACCTATCCACCCGGGAGKTAAGGTTTCGATCTAGCTGYTTGGAGGWATG
CSGGTCCAGGRGAAGCCATGGCTAAYACGKGCAGCAGGCCCGGTAWCGRGGGKGGSGRSSTTWTCCGGWTT
ACTGGGSGTAAGGGAGGSGTASGCGGATGATAAGTGATKAAAATACCCGGGCCTCAACTGGGKGGCTGCATTCC
AAACTGGTATYTAGAGKGCAGGAGRGAGAGSKGGAWCTCTAGKGTAGSSGGTGAATGSGTAGRGATTAGGA
AGAACCAGKGGGAAGGSGACTCTCTGGACTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG
GATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAATACTAGGTGTGGGGGTTTTCAACACCTCCGTGCCG
CCGCTAACGCATTAAGTATTCGCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGATTAATAACTCAAAGGAATTGACGGGGACC
CGCACAAGTAGCGGAGCATGTGGTTTAATTYGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTACACTTGACATCCCTTGC
ATTACTCTTAATCGAGGAAATCCCTTYGGGGACAAGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTGCTCAGCTYGTGTCG
TGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTGCTTAGTTACTACCATTAAGTTGAGGACTCTA
GCGAGACTGCCTGGGTTAACCAGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTGTAGGGCT
ACACACSTGCAATGGSYGGTACMSAGAGAYGCAATMCCSCGAGSTGGAGCCAAACTTWAAAACCAGTCTC
AGTTYGGATTGTAGGCTGAAACTYGCCTACATGAAGCTGGAGTTACTAGTAATCGCGAATCAGAATTCGCKWA
ATTYC

14.10 Resultados de la secuenciación (Análisis mediante BLAST)

14.10.1 Análisis de la secuencia 033 CI en GenBank NCBI mediante BLAST

Título profesional	033 CI
ELIMINAR	Z46BKH11013 <small>La búsqueda vence el 01-05 02:22 am</small> Descargar todo ▼
Programa	BLASTN Citación ▼
Base de datos	Nuevo Testamento Ver detalles ▼
ID de consulta	lcl Query_4397
Descripción	Ninguna
Tipo de molécula	adn
Longitud de la consulta	1007
Otros informes	Árbol de distancia de resultados Visor de MSA ?

Descripciones		Resumen gráfico	Alineaciones	Taxonomía				
Secuencias que producen alineaciones significativas Descargar Nuevo Seleccionar columnas mostrar 100 ?								
<input checked="" type="checkbox"/> seleccionar todo 100 secuencias seleccionadas GenBank Gráficos Árbol de distancia de resultados Nuevo Visor de MSA								
Descripción	Nombre científico	Maximo puntaje	Puntaje total	Cubierta de consulta	Valor E	Por. Ident	Acc. Len	Adhesión
<input checked="" type="checkbox"/> Cromosoma de Clostridioides difficile cepa TW11-RT078	Clostridioides di...	1722	20588	99%	0.0	97.10%	3592931	CP035499.1
<input checked="" type="checkbox"/> Clostridioides difficile cepa PCK083 16S gen de ARN ribosómico _secuencia parcial	Clostridioides di...	1722	1722	99%	0.0	97.10%	1293	MN913838.1
<input checked="" type="checkbox"/> Clostridioides difficile cepa CBA7204 cromosoma _genoma completo	Clostridioides di...	1722	20660	99%	0.0	97.10%	4038993	CP029566.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cepa de Clostridioides difficile FDAARGOS_723 cromosoma _genoma completo	Clostridioides di...	1722	20622	99%	0.0	97.10%	4178106	CP046327.1
<input checked="" type="checkbox"/> Clostridioides difficile cepa ERU_BCD12 Gen de ARN ribosómico 16S _secuencia parcial	Clostridioides di...	1722	1722	99%	0.0	97.10%	1380	MN720594.1
<input checked="" type="checkbox"/> Clostridioides difficile cepa ERU_BCD11 Gen de ARN ribosómico 16S _secuencia parcial	Clostridioides di...	1722	1722	99%	0.0	97.10%	1380	MN720593.1
<input checked="" type="checkbox"/> Clostridioides difficile cepa ERU_BCD10 gen de ARN ribosómico 16S _secuencia parcial	Clostridioides di...	1722	1722	99%	0.0	97.10%	1374	MN720592.1
<input checked="" type="checkbox"/> Clostridioides difficile cepa ERU_BCD9 Gen de ARN ribosómico 16S _secuencia parcial	Clostridioides di...	1722	1722	99%	0.0	97.10%	1382	MN720591.1
<input checked="" type="checkbox"/> Clostridioides difficile cepa ERU_BCD8 gen de ARN ribosómico 16S _secuencia parcial	Clostridioides di...	1722	1722	99%	0.0	97.10%	1382	MN720590.1
<input checked="" type="checkbox"/> Clostridioides difficile cepa ERU_BCD7 gen de ARN ribosómico 16S _secuencia parcial	Clostridioides di...	1722	1722	99%	0.0	97.10%	1379	MN720589.1
<input checked="" type="checkbox"/> Clostridioides difficile cepa ERU_BCD6 Gen de ARN ribosómico 16S _secuencia parcial	Clostridioides di...	1722	1722	99%	0.0	97.10%	1380	MN720588.1

14.10.2. Análisis de la secuencia 001 CI en GenBank NCBI mediante BLAST

Título profesional	001 CI
ELIMINAR	Z46XMHU3016 La búsqueda vence el 01-05 02:32 am Descargar todo ▼
Programa	BLASTN Citación ▼
Base de datos	Nuevo Testamento Ver detalles ▼
ID de consulta	lcl Query_7131
Descripción	Ninguna
Tipo de molécula	adn
Longitud de la consulta	918
Otros informes	Árbol de distancia de resultados Visor de MSA ?

Descripciones									
Resumen gráfico		Alineaciones		Taxonomía					
Secuencias que producen alineaciones significativas									
Descargar ▼ Nuevo Seleccionar columnas ▼ mostrar 100 ▼ ?									
<input checked="" type="checkbox"/> seleccionar todo 100 secuencias seleccionadas GenBank Gráficos Árbol de distancia de resultados Nuevo Visor de MSA									
Descripción	Nombre científico	Maximo puntaje	Puntaje total	Cubierta de consulta	Valor E	Por. Ident	Acc. Len	Adhesión	
<input checked="" type="checkbox"/> Clostridioides difficile cepa MD991 16S gen de ARN ribosómico, secuencia p...	Clostridioides difficile	1212	1212	83%	0.0	93.73%	1253	MK909923.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Cromosoma de Clostridioides difficile cepa TW11-RT078	Clostridioides difficile	1206	14367	83%	0.0	93.61%	3592931	CP035499.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Clostridioides difficile cepa PCK083 16S gen de ARN ribosómico, secuencia p...	Clostridioides difficile	1206	1206	83%	0.0	93.61%	1293	MN913838.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Clostridioides difficile cepa CBA7204 cromosoma, genoma completo	Clostridioides difficile	1206	14461	83%	0.0	93.61%	4038993	CP029566.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Cepa de Clostridioides difficile FDAARGOS_723 cromosoma, genoma completo	Clostridioides difficile	1206	14445	83%	0.0	93.61%	4178106	CP046327.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Clostridioides difficile cepa ERU_BCD12 Gen de ARN ribosómico 16S, secue...	Clostridioides difficile	1206	1206	83%	0.0	93.61%	1380	MN720594.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Clostridioides difficile cepa ERU_BCD11 Gen de ARN ribosómico 16S, secue...	Clostridioides difficile	1206	1206	83%	0.0	93.61%	1380	MN720593.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Clostridioides difficile cepa ERU_BCD10 gen de ARN ribosómico 16S, secue...	Clostridioides difficile	1206	1206	83%	0.0	93.61%	1374	MN720592.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Clostridioides difficile cepa ERU_BCD9 Gen de ARN ribosómico 16S, secuen...	Clostridioides difficile	1206	1206	83%	0.0	93.61%	1382	MN720591.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Clostridioides difficile cepa ERU_BCD8 gen de ARN ribosómico 16S, secuen...	Clostridioides difficile	1206	1206	83%	0.0	93.61%	1382	MN720590.1	

14.10.3 Análisis de la secuencia 018 CI en GenBank NCBI mediante BLAST

Título profesional	018 CA
ELIMINAR	Z47743JG013 La búsqueda vence el 01-05 02:37 am Descargar todo ▼
Programa	BLASTN Citación ▼
Base de datos	Nuevo Testamento Ver detalles ▼
ID de consulta	lcl Query_19565
Descripción	Ninguna
Tipo de molécula	adn
Longitud de la consulta	986
Otros informes	Árbol de distancia de resultados Visor de MSA ?

Descripciones									
Resumen gráfico		Alineaciones		Taxonomía					
Secuencias que producen alineaciones significativas									
Descargar ▼ Nuevo Seleccionar columnas ▼ mostrar 100 ▼ ?									
<input checked="" type="checkbox"/> seleccionar todo 100 secuencias seleccionadas GenBank Gráficos Árbol de distancia de resultados Nuevo Visor de MSA									
Descripción	Nombre científico	Maximo puntaje	Puntaje total	Cubierta de consulta	Valor E	Por. Ident	Acc. Len	Adhesión	
<input checked="" type="checkbox"/> Organismo no cultivado clon ELU0161-T363-S-NIPCRAMgANa_000461 gen de ARN ribosómico de su...	organismo inculto	1581	1581	96%	0.0	95.48%	1429	HQ808830.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Clostridium perfringens cepa 3116 16S gen de ARN ribosómico, secuencia parcial	Clostridium perf...	1576	1576	96%	0.0	95.38%	1413	MT613499.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Clostridium perfringens cepa 9091 16S gen de ARN ribosómico, secuencia parcial	Clostridium perf...	1576	1576	96%	0.0	95.38%	1374	MT539085.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Clostridium perfringens cepa 9085 16S gen de ARN ribosómico, secuencia parcial	Clostridium perf...	1576	1576	96%	0.0	95.38%	1379	MT539083.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Clostridium perfringens cepa 9051 16S gen de ARN ribosómico, secuencia parcial	Clostridium perf...	1576	1576	96%	0.0	95.38%	1312	MT539074.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Clostridium perfringens cepa 9049 16S gen de ARN ribosómico, secuencia parcial	Clostridium perf...	1576	1576	96%	0.0	95.38%	1319	MT539073.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Gen de ARN ribosómico 16S de la cepa 8334 de Clostridium perfringens, secuencia parcial	Clostridium perf...	1576	1576	96%	0.0	95.38%	1333	MT538984.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Clostridium perfringens cepa 8112 16S gen de ARN ribosómico, secuencia parcial	Clostridium perf...	1576	1576	96%	0.0	95.38%	1385	MT538907.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Gen de ARN ribosómico 16S de la cepa de Clostridium perfringens 7637, secuencia parcial	Clostridium perf...	1576	1576	96%	0.0	95.38%	1395	MT516175.1	

14.10.4 Análisis de la secuencia 025 CA en GenBank NCBI mediante BLAST

Título profesional	025 CA
ELIMINAR	Z47JTNSH013 La búsqueda vence el 01-05 02:43 am Descargar todo ▾
Programa	BLASTN ? Citación ▾
Base de datos	Nuevo Testamento Ver detalles ▾
ID de consulta	lcl Query_3523
Descripción	Ninguna
Tipo de molécula	adn
Longitud de la consulta	1005
Otros informes	Árbol de distancia de resultados Visor de MSA ?

Descripciones	Resumen gráfico	Alineaciones	Taxonomía
----------------------	-----------------	--------------	-----------

Secuencias que producen alineaciones significativas

Descargar ▾ **Nuevo** Seleccionar columnas ▾ mostrar 100 ▾ [?](#)

seleccionar todo 100 secuencias seleccionadas [GenBank](#) [Gráficos](#) [Árbol de distancia de resultados](#) **Nuevo** [Visor de MSA](#)

	Descripción	Nombre científico	Maximo puntaje	Puntaje total	Cubierta de consulta	Valor E	Por. Ident	Acc. Len	Adhesión
<input checked="" type="checkbox"/>	Clostridium perfringens cepa 9091 16S gen de ARN ribosómico, secuencia parcial	Clostridium perf...	1725	1725	97%	0.0	97.77%	1374	MT539085.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Clostridium perfringens cepa 9085 16S gen de ARN ribosómico, secuencia parcial	Clostridium perf...	1725	1725	97%	0.0	97.77%	1379	MT539083.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Clostridium perfringens cepa 9051 16S gen de ARN ribosómico, secuencia parcial	Clostridium perf...	1725	1725	97%	0.0	97.77%	1312	MT539074.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Clostridium perfringens cepa 8112 16S gen de ARN ribosómico, secuencia parcial	Clostridium perf...	1725	1725	97%	0.0	97.77%	1385	MT538907.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Gen de ARN ribosómico 16S de la capa de Clostridium perfringens 7637, secuencia parcial	Clostridium perf...	1725	1725	97%	0.0	97.77%	1395	MT516175.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Gen de ARN ribosómico 16S de la capa de Clostridium perfringens 7636, secuencia parcial	Clostridium perf...	1725	1725	97%	0.0	97.77%	1388	MT516174.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Clostridium perfringens cepa 5616 16S gen de ARN ribosómico, secuencia parcial	Clostridium perf...	1725	1725	97%	0.0	97.77%	1422	MT510442.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Gen de ARN ribosómico 16S de la capa 5615 de Clostridium perfringens, secuencia parcial	Clostridium perf...	1725	1725	97%	0.0	97.77%	1426	MT510441.1

14.10.5 Análisis de la secuencia 015 CI en GenBank NCBI mediante BLAST

Título profesional	015 CA
ELIMINAR	Z47XETP4013 La búsqueda vence el 01-05 02:49 am Descargar todo ▾
Programa	BLASTN ? Citación ▾
Base de datos	Nuevo Testamento Ver detalles ▾
ID de consulta	lcl Query_8387
Descripción	Ninguna
Tipo de molécula	adn
Longitud de la consulta	1038
Otros informes	Árbol de distancia de resultados Visor de MSA ?

Descripciones	Resumen gráfico	Alineaciones	Taxonomía
----------------------	-----------------	--------------	-----------

Secuencias que producen alineaciones significativas

Descargar ▾ **Nuevo** Seleccionar columnas ▾ mostrar 100 ▾ [?](#)

seleccionar todo 100 secuencias seleccionadas [GenBank](#) [Gráficos](#) [Árbol de distancia de resultados](#) **Nuevo** [Visor de MSA](#)

	Descripción	Nombre científico	Maximo puntaje	Puntaje total	Cubierta de consulta	Valor E	Por. Ident	Acc. Len	Adhesión
<input checked="" type="checkbox"/>	Clon de bacteria sin cultivar DolRe_17558 Gen de ARN ribosómico 16S, secuencia parcial	bacteria no culti...	1197	1197	67%	0.0	96.45%	1334	JQ200647.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Clostridium parfringens cepa 3116 16S gen de ARN ribosómico, secuencia parcial	Clostridium perf...	1194	1194	67%	0.0	96.31%	1413	MT613499.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Clostridium parfringens cepa 9091 16S gen de ARN ribosómico, secuencia parcial	Clostridium perf...	1194	1194	67%	0.0	96.31%	1374	MT539085.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Clostridium parfringens cepa 9085 16S gen de ARN ribosómico, secuencia parcial	Clostridium perf...	1194	1194	67%	0.0	96.31%	1379	MT539083.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Clostridium parfringens cepa 9051 16S gen de ARN ribosómico, secuencia parcial	Clostridium perf...	1194	1194	67%	0.0	96.31%	1312	MT539074.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Clostridium parfringens cepa 9049 16S gen de ARN ribosómico, secuencia parcial	Clostridium perf...	1194	1194	67%	0.0	96.31%	1319	MT539073.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Gen de ARN ribosómico 16S de la capa 8334 de Clostridium parfringens, secuencia parcial	Clostridium perf...	1194	1194	67%	0.0	96.31%	1333	MT538984.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Clostridium parfringens cepa 8112 16S gen de ARN ribosómico, secuencia parcial	Clostridium perf...	1194	1194	67%	0.0	96.31%	1385	MT538907.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Gen de ARN ribosómico 16S de la capa de Clostridium parfringens 7637, secuencia parcial	Clostridium perf...	1194	1194	67%	0.0	96.31%	1395	MT516175.1

14.10.6 Análisis de la secuencia 002 CA en GenBank NCBI mediante BLAST

Título profesional **002 CA**

ELIMINAR [Z487WC2W013](#) La búsqueda vence el 01-05 02:54 am
[Descargar todo](#) ▾

Programa **BLASTN** [Citación](#) ▾

Base de datos **Nuevo Testamento** [Ver detalles](#) ▾

ID de consulta **lcl|Query_38403**

Descripción **Ninguna**

Tipo de molécula **adn**

Longitud de la consulta **954**

Otros informes [Árbol de distancia de resultados](#) [Visor de MSA](#) [?](#)

Descripciones Resumen gráfico Alineaciones Taxonomía

Secuencias que producen alineaciones significativas Descargar ▾ **Nuevo** Seleccionar columnas ▾ mostrar 100 ▾ [?](#)

seleccionar todo 100 secuencias seleccionadas [GenBank](#) [Gráficos](#) [Árbol de distancia de resultados](#) **Nuevo** [Visor de MSA](#)

Descripción	Nombre científico	Maximo puntaje	Puntaje total	Cubierta de consulta	Valor E	Por. Ident	Acc. Len	Adhesión
<input checked="" type="checkbox"/> Clon de bacteria sin cultivar DoIRc_Dl_35rect19R08 Gen de ARN ribosómico 16S, secuencia parcial	bacteria no culti...	1308	1308	90%	0.0	92,36%	1336	JQ203037.1
<input checked="" type="checkbox"/> Clon de organismo no cultivado FLU0058-T402-S-NIPCRAMgANa_000512 gen de ARN ribosómico de ...	organismo inculto	1308	1308	90%	0.0	92,36%	1431	HQ765635.1
<input checked="" type="checkbox"/> Organismo no cultivado clon ELU0161-T363-S-NIPCRAMgANa_000241 gen de ARN ribosómico de su ...	organismo inculto	1308	1308	90%	0.0	92,36%	1425	HQ808610.1
<input checked="" type="checkbox"/> Gen de ARN ribosómico SInGs_01ASL4aGA 16S de clon de bacteria sin cultivar, secuencia parcial	bacteria no culti...	1306	1306	90%	0.0	92,35%	1333	JQ206335.1
<input checked="" type="checkbox"/> Clon de bacteria sin cultivar CE2_f05_1 Gen de ARN ribosómico 16S, secuencia parcial	bacteria no culti...	1306	1306	90%	0.0	92,35%	1371	EU467988.1
<input checked="" type="checkbox"/> Clostridium perfringens cepa 27-4 gen de ARN ribosómico 16S, secuencia parcial	Clostridium perf...	1304	1304	90%	0.0	92,25%	1352	MN567560.1
<input checked="" type="checkbox"/> Clon de bacteria no cultivado CE3_aai07d05 Gen de ARN ribosómico 16S, secuencia parcial	bacteria no culti...	1304	1304	90%	0.0	92,26%	1374	EU459403.1
<input checked="" type="checkbox"/> Clostridium perfringens cepa 3116 16S gen de ARN ribosómico, secuencia parcial	Clostridium perf...	1303	1303	90%	0.0	92,25%	1413	MT613499.1
<input checked="" type="checkbox"/> Clostridium perfringens cepa 9091 16S gen de ARN ribosómico, secuencia parcial	Clostridium perf...	1303	1303	90%	0.0	92,25%	1374	MT639085.1

14.11 Secuencias obtenidas de la base de datos NCBI.

>NC_008261.1:231433-232945 Clostridium perfringens ATCC 13124, complete sequence

```
TAAATTGAGAGTTTGTATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGAT
GAAGTTTTCCTTCGGGAAATGGATTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTCATAGAGT
GGAATAGCCTTCCGAAAGGAAGATTAATACCGCATAATGTTGAAAGATGGCATCATATTTAACCAAAGG
AGCAATCCGCTATGAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCGACG
ATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGTATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGG
CAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTT
CGGATCGTAAAGCTCTGTCTTTGGGGAAGATAATGACCGTACCCAAGGAGGAAGCCACGGCTAACTACGT
GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCGAGCGTTATCCGGATTTACTGGGCGTAAAGGGAGCGTAGGC
GGATGATTAAGTGGGATGTGAAATACCCGGGCTCAACTTGGGTGCTGCATTCCAAACTGGTTATCTAGAG
TGCAGGAGAGGAGAGTGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTAGGAAGAACACCAGTGGC
GAAGGCGACTCTCTGGACTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACC
CTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAATACTAGGTGTGGGGTTTTCAACACCTCCGTGCCGCCGCTAACG
CATTAAAGTATTCCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAATAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACA
AGTAGCGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCTACACTTGACATCCCTTGCAATT
ACTCTTAATCGAGGAAATCCCTTCGGGGACAAGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTGTCGTAGCTCGTGTGCG
TGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTGCTTAGTTACTACCATTAAGTTGAGGACT
CTAGCGAGACTGCCTGGGTTAACCAGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTGT
AGGGCTACACACGTGCTACAATGGCTGGTACAGAGAGATGCAATACCGCGAGGTGGAGCCAAACTTAAAA
ACCAGTCTCAGTTCCGATTGTAGGCTGAAACTCGCTACATGAAGCTGGAGTTACTAGTAATCGCGAATC
AGAATGTGCGGTTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCCGCCGTCACACCATGAGAGTTGGCAATAC
CCGAAGTCCGTGAGCTAACCGCAAGGAGGCAGCGCCGAAGGTAGGGTCAGCGATTGGGGTGAAGTCGTA
ACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCCTGCGGCTGGATCACCTCCTTT
```

>NC_008261.1:310699-312211 *Clostridium perfringens* ATCC 13124, complete sequence

TAAATTGAGAGTTTGGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGAT
GAAGTTTCCTTCGGGAAACGGATTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTCATAGAGT
GGAATAGCCTTCCGAAAGGAAGATTAATACCGCATAACGTTGAAAGATGGCATCATCATTCAACCAAAGG
AGCAATCCGCTATGAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCGACG
ATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGG
CAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTT
CGGATCGTAAAGCTCTGTCTTTGGGGAAGATAATGACGGTACCCAAGGAGGAAGTCACGGCTAACTACGT
GCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCGAGCGTTATCCGGATTTACTGGGCGTAAAGGGAGCGTAGGC
GGATGATTAAGTGGGATGTGAAATACCCGGGCTCAACTTGGGTGCTGCATTCCAAACTGGTTATCTAGAG
TGCAGGAGAGGAGAGTGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTAGGAAGAACACCAGTGGC
GAAGGCGACTCTCTGGACTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACC
CTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATACTAGGTGTGGGGTTTTCAACACCTCCGTGCCGCCGCTAACG
CATTAAGTATTCCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAATAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACA
AGTAGCGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCTACACTTGACATCCCTTGCAAT
ACTCTTAATCGAGGAAATCCCTTCGGGGACAAGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTGCGTCAGCTCGTGTGCG
TGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTGCTTAGTTACTACCATTAAGTTGAGGACT
CTAGCGAGACTGCCTGGGTAAACCAGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTGT
AGGGCTACACACGTGCTACAATGGCTGGTACAGAGAGATGCAATACCGCGAGGTGGAGCCAAACTTAAAA
ACCAGTCTCAGTTCCGATTGTAGGCTGAAACTCGCTACATGAAGCTGGAGTTACTAGTAATCGCGAATC
AGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCCGCCGTACACCATGAGAGTTGGCAATAC
CCGAAGTCCGTGAGCTAACCGCAAGGAGGCAGCGGCCGAAGGTAGGGTCAGCGATTGGGGTGAAGTCGTA
ACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCCTGCGGCTGGATCACCTCCTTT

>NC_008261.1:683149-684661 *Clostridium perfringens* ATCC 13124, complete sequence

TAAATTGAGAGTTTGGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGAT
GAAGTTTCCTTCGGGAAACGGATTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTCATAGAGT
GGAATAGCCTTCCGAAAGGAAGATTAATACCGCATAATGTTGAAAGATGGCATCATCATTCAACCAAAGG
AGCAATCCGCTATGAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCGACG
ATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGG
CAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTT
CGGATCGTAAAGCTCTGTCTTTGGGGAAGATAATGACGGTACCCAAGGAGGAAGCCACGGCTAACTACGT
GCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCGAGCGTTATCCGGATTTACTGGGCGTAAAGGGAGCGTAGGC
GGATGATTAAGTGGGATGTGAAATACCCGGGCTCAACTTGGGTGCTGCATTCCAAACTGGTTATCTAGAG
TGCAGGAGAGGAGAGTGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTAGGAAGAACACCAGTGGC
GAAGGCGACTCTCTGGACTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACC
CTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATACTAGGTGTGGGGTTTTCAACACCTCCGTGCCGCCGCTAACG
CATTAAGTATTCCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAATAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACA
AGTAGCGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCTACACTTGACATCCCTTGCAAT
ACTCTTAATCGAGGAAATCCCTTCGGGGACAAGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTGCGTCAGCTCGTGTGCG
TGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTGCTTAGTTACTACCATTAAGTTGAGGACT
CTAGCGAGACTGCCTGGGTAAACCAGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTGT
AGGGCTACACACGTGCTACAATGGCTGGTACAGAGAGATGCAATACCGCGAGGTGGAGCCAAACTTAAAA
ACCAGTCTCAGTTCCGATTGTAGGCTGAAACTCGCTACATGAAGCTGGAGTTACTAGTAATCGCGAATC
AGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCCGCCGTACACCATGAGAGTTGGCAATAC
CCGAAGTCCGTGAGCTAACCGTAAGGAGGCAGCGGCCGAAGGTAGGGTCAGCGATTGGGGTGAAGTCGTA
ACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCCTGCGGCTGGATCACCTCCTTT

>NC_008261.1:10168-11680 *Clostridium perfringens* ATCC 13124, complete sequence

TAAATTGAGAGTTTGGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGAT
GAAGTTTCCTTCGGGAAACGGATTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTCATAGAGT
GGAATAGCCTTCCGAAAGGAAGATTAATACCGCATAACGTTGAAAGATGGCATCATCATTCAACCAAAGG
AGCAATCCGCTATGAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCGACG
ATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGG

CAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTT
CGGATCGTAAAGCTCTGTCTTTGGGGAAGATAATGACGGTACCCAAGGAGGAAGCCACGGCTAACTACGT
GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCGAGCGTTATCCGGATTTACTGGGCGTAAAGGGAGCGTAGGC
GGATGATTAAGTGGGATGTGAAATACCCGGGCTCAACTTGGGTGCTGCATTCCAAACTGGTTATCTAGAG
TGCAGGAGAGGAGAGTGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTAGGAAGAACCAGTGGC
GAAGGCGACTCTCTGGACTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACC
CTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATACTAGGTGTGGGGGTTTCAACACCTCCGTGCCGCCGCTAACG
CATTAAGTATTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAATACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACA
AGTAGCGGAGCATGTGGTTTAATTTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCTACACTTGACATCCCTTGCAAT
ACTCTTAATCGAGGAAATCCCTTCGGGGACAAGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCG
TGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTGCTTAGTTACTACCATTAAGTTGAGGACT
CTAGCGAGACTGCCTGGGTTAACCAGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTGT
AGGGCTACACACGTGCTACAATGGCTGGTACAGAGAGATGCAATACCGCGAGGTGGAGCCAAACTTAAAA
ACCAGTCTCAGTTTCGGATTGTAGGCTGAAACTCGCTACATGAAGCTGGAGTTACTAGTAATCGCGAATC
AGAATGTGCGGTTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTGGCAATAC
CCGAAGTCCGTGAGCTAACCGCAAGGAGGCAGCGGCCGAAGGTAGGGTCAGCGATTGGGGTGAAGTCGTA
ACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCCTGCGGCTGGATCACCTCCTTT

>NC_008261.1:82382-83894 *Clostridium perfringens* ATCC 13124, complete
sequence

TAAATTGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGAT
GAAGTTTCCTTCGGGAAATGGATTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTCATAGAGT
GGAATAGCCTTCCGAAAGGAAGATTAATACCGCATAATGTTGAAAGATGGCATCATCATTCAACCAAAGG
AGCAATCCGCTATGAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCGACG
ATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGG
CAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTT
CGGATCGTAAAGCTCTGTCTTTGGGGAAGATAATGACGGTACCCAAGGAGGAAGCCACGGCTAACTACGT
GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCGAGCGTTATCCGGATTTACTGGGCGTAAAGGGAGCGTAGGC
GGATGATTAAGTGGGATGTGAAATACCCGGGCTCAACTTGGGTGCTGCATTCCAAACTGGTTATCTAGAG
TGCAGGAGAGGAGAGTGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTAGGAAGAACCAGTGGC
GAAGGCGACTCTCTGGACTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACC
CTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATACTAGGTGTGGGGGTTTCAACACCTCCGTGCCGCCGCTAACG
CATTAAGTATTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAATACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACA
AGTAGCGGAGCATGTGGTTTAATTTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCTACACTTGACATCCCTTGCAAT
ACTCTTAATCGAGGAAATCCCTTCGGGGACAAGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCG
TGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTGCTTAGTTACTACCATTAAGTTGAGGACT
CTAGCGAGACTGCCTGGGTTAACCAGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTGT
AGGGCTACACACGTGCTACAATGGCTGGTACAGAGAGATGCAATACCGCGAGGTGGAGCCAAACTTAAAA
ACCAGTCTCAGTTTCGGATTGTAGGCTGAAACTCGCTACATGAAGCTGGAGTTACTAGTAATCGCGAATC
AGAATGTGCGGTTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTGGCAATAC
CCGAAGTCCGTGAGCTAACCGCAAGGAGGCAGCGGCCGAAGGTAGGGTCAGCGATTGGGGTGAAGTCGTA
ACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCCTGCGGCTGGATCACCTCCTTT

>NC_008261.1:c2783349-2781837 *Clostridium perfringens* ATCC 13124,
complete
sequence

TAAATTGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGAT
GAAGTTTCCTTCGGGGAACGGATTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTCATAGAGT
GGAATAGCCTTCCGAAAGGAAGATTAATACCGCATAATGTTGAAAGATGGCATCATCATTCAACCAAAGG
AGCAATCCGCTATGAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCGACG
ATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGG
CAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTT
CGGATCGTAAAGCTCTGTCTTTGGGGAAGATAATGACGGTACCCAAGGAGGAAGCCACGGCTAACTACGT
GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCGAGCGTTATCCGGATTTACTGGGCGTAAAGGGAGCGTAGGC
GGATGATTAAGTGGGATGTGAAATACCCGGGCTCAACTTGGGTGCTGCATTCCAAACTGGTTATCTAGAG
TGCAGGAGAGGAGAGTGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTAGGAAGAACCAGTGGC
GAAGGCGACTCTCTGGACTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACC
CTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATACTAGGTGTGGGGGTTTCAACACCTCCGTGCCGCCGCTAACG

CATTAAGTATTCCGCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGATTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACA
AGTAGCGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTACACTTGACATCCCTTGCAATT
ACTCTTAATCGAGGAAATCCCTTCGGGGACAAGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTTCG
TGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTTCGTTAGTTACTACCATTAAGTTGAGGACT
CTAGCGAGACTGCCTGGGTAAACCAGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTGT
AGGGCTACACACGTGCTACAATGGCTGGTACAGAGAGATGCAATACCGCGAGGTGGAGCCAAACTTAAAA
ACCAGTCTCAGTTCCGATTGTAGGCTGAAACTCGCCTACATGAAGCTGGAGTTACTAGTAATCGCGAATC
AGAATGTTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCCGCCGTCACACCATGAGAGTTGGCAATAC
CCGAAGTCCGTGAGCTAACCGCAAGGAGGCAGCGGCCGAAGGTAGGGTCAGCGATTGGGGTGAAGTCGTA
ACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTT

>NC_008261.1:c3034246-3032734 *Clostridium perfringens* ATCC 13124,
complete sequence

TAAATTGAGAGTTTGCATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGAT
GAAGTTTCCCTTCGGGAAACGGATTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTCATAGAGT
GGAATAGCCTTCCGAAAGGAAGATTAATACCGCATAACGTTGAAAGATGGCATCATCATTTAACCAAAGG
AGCAATCCGCTATGAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCGACG
ATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGCATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGG
CAGCAGTGGGGAAATATTGCACAATGGGGGAAACCCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTT
CGGATCGTAAAGCTCTGTCTTTGGGGAAAGATAATGACGGTACCCAAGGAGGAAGCCACGGCTAACTACGT
GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCGAGCGTTATCCGGATTTACTGGGCGTAAAGGGAGCGTAGGC
GGATGATTAAGTGGGATGTGAAATACCCGGGCTCAACTTGGGTGCTGCATTCCAAACTGGTTATCTAGAG
TGCAGGAGAGGAGAGTGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTAGGAAGAACACCAAGTGGC
GAAGGCGACTCTCTGGACTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACC
CTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAATACTAGGTGTGGGGGTTTCAACACCTCCGTGCCGCCGCTAACG
CATTAAAGTATTCCGCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGATTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACA
AGTAGCGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTACACTTGACATCCCTTGCAATT
ACTCTTAATCGAGGAAATCCCTTCGGGGACAAGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTTCG
TGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTTCGTTAGTTACTACCATTAAGTTGAGGACT
CTAGCGAGACTGCCTGGGTAAACCAGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTGT
AGGGCTACACACGTGCTACAATGGCTGGTACAGAGAGATGCAATACCGCGAGGTGGAGCCAAACTTAAAA
ACCAGTCTCAGTTCCGATTGTAGGCTGAAACTCGCCTACATGAAGCTGGAGTTACTAGTAATCGCGAATC
AGAATGTTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCCGCCGTCACACCATGAGAGTTGGCAATAC
CCGAAGTCCGTGAGCTAACCGCAAGGAGGCAGCGGCCGAAGGTAGGGTCAGCGATTGGGGTGAAGTCGTA
ACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTT

>NC_008261.1:72551-74063 *Clostridium perfringens* ATCC 13124, complete
sequence

TAAATTGAGAGTTTGCATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGAT
GAAGTTTCCCTTCGGGAAACGGATTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTCATAGAGT
GGAATAGCCTTCCGAAAGGAAGATTAATACCGCATAATGTTGAAAGATGGCATCATCATTTAACCAAAGG
AGCAATCTGCTATGAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCGACG
ATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGCATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGG
CAGCAGTGGGGAAATATTGCACAATGGGGGAAACCCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTT
CGGATCGTAAAGCTCTGTCTTTGGGGAAAGATAATGACGGTACCCAAGGAGGAAGCCACGGCTAACTACGT
GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCGAGCGTTATCCGGATTTACTGGGCGTAAAGGGAGCGTAGGC
GGATGATTAAGTGGGATGTGAAATACCCGGGCTCAACTTGGGTGCTGCATTCCAAACTGGTTATCTAGAG
TGCAGGAGAGGAGAGTGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTAGGAAGAACACCAAGTGGC
GAAGGCGACTCTCTGGACTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACC
CTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAATACTAGGTGTGGGGGTTTCAACACCTCCGTGCCGCCGCTAACG
CATTAAAGTATTCCGCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGATTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACA
AGTAGCGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTACACTTGACATCCCTTGCAATT
ACTCTTAATCGAGGAAATCCCTTCGGGGACAAGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTTCG
TGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTTCGTTAGTTACTACCATTAAGTTGAGGACT
CTAGCGAGACTGCCTGGGTAAACCAGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTGT
AGGGCTACACACGTGCTACAATGGCTGGTACAGAGAGATGCAATACCGCGAGGTGGAGCCAAACTTAAAA
ACCAGTCTCAGTTCCGATTGTAGGCTGAAACTCGCCTACATGAAGCTGGAGTTACTAGTAATCGCGAATC

AGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTGGCAATAC
CCGAAGTCCGTGAGCTAACCGCAAGGAGGCAGCGCCGAAGGTAGGGTCAGCGATTGGGGTGAAGTCGTA
ACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTT

>NR_112172.1 Clostridioides difficile ATCC 9689 = DSM 1296 16S ribosomal
RNA, partial sequence

ATCATKGCTCABGATGAACGCTGGCGGGTGCCTAACACATGCAAGTTGAGCGATTTACTTTCGGTAAAGA
GCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGTAACCTACCCTGTACACACGGATAACATACCGAAAGGTATGCT
AATACGGGATAATATATTTGAGAGGCATCTCTTGAATATCAAAGGTGAGCCAGTACAGGATGGACCCGCG
TCTGATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATCAGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATC
GGCCACATTGGAAGTGAACGCGTCCAAACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGC
GAAAGCCTGATGCAGCAACGCGCGTGAAGGCTTCGGGTGCTAAAACCTCTGTCTCAAGGAA
GATAATGACGGTACTTGAAGGAGGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCANCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGG
CTAGCGTTATCCGGATTTACTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGGCGGTCTTTCAAGTCAGGAGTGAAAGGCTA
CGGCTCAACCGTAGTAAGCTCTTGAAGTGGGAGACTTGAAGTGCAGGAGAGGAGAGTGGAAATTCCTAGTG
TAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTTGCGAAGGCGGCTCTCTGGACTGTAAGTACG
CTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGAGTA
CTAGGTGTCGGGGGTTACCCCTTCGGTGCCGCACTAACGCATTAAGTACTCCGCCTGGGAAGTACGCTCG
CAAGAGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGTAGCGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCA
ACGCGAAGAACCTTACCTAAGCTTGAACATCCCAATGACATCTCCTTAATCGGAGAGTTCCTTCGGGGAC
ATTGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAG
CGCAACCTTGTCTTTAGTTGCCATCATTAAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCAGGGATAACCTGGAG
GAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGCTTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGGTAGT
ACAGAGGGTTGCCAAGCCGTAAGGTGGAGCTAATCCCTTAAAGTACTCTCAGTTCCGATTGTAGGCTGA
AACTCGCTACATGAAGCTGGAGTTACTANTAATCGCAATCAAATGCTGCGGTGAATGCGTTCCCGGGG
TCTTNTACACACCGCCCGTCACACCACGGGAGTTGGAAACGCCCGAAGCCGAATTATCTAACCTTTTGA
ANAANTCSTCGAAAGTGAATCAATAACTTGGGTNAANTCGTAACAAGGTAACCGTATCGGAAGT

14.12 Secuencias obtenidas de la base de datos ENA.

>ENA|EIA17207|EIA17207.1 Clostridium perfringens F262 triosephosphate
isomerase

ATGAGAACTCCAATAATCGCAGGAAACTGGAAAATGCACTATAACAATAGACGAGGCTGTTAAATTAGTTGAAG
AATTAAGCCATTAGTTAAAGATGCTAAATGTGAAGTTGTTGTTTGCCTAACTTTTGTGTTGCTTAGATGCAGT
TAAAAAAGCTGTTGAAGGAACAAACATAAAAGTAGGTGCTCAAAACATGCACTTTGAAAAAAGGAGCATTC
ACTGGAGAAATCGCTCCAAGAATGTTAGAAGCTATGAACATAGATTACGTTATAATTGGACATAGTGAAAGAA
GAGAATACTTCAACGAAACAGATGAAACTTGAACAAAAAAGTTAAAGCTGCTTTCGCACACAACCTAACTCC
AATCCTTTGCTGTGGAGAACTTTAGAGCAAAGAGAAAACGGAACACTACTAACGACGTTATAAAAGCTCAAATC
ACTGCTGATTTAGAAGGATTAACTAAAGAGCAAGCTGAGAAAGTTGTTATAGCTTACGAACCAATCTGGGCTA
TCGGAACTGGAAAACTGCTACTTCAGACCAAGCTAATGAAACAATAGCTGCTATAAGAGCTATGGTTGCTGA
AATGTTTCGGACAAGAAGTTGCTGATAAAGTAAGAATCCAATACGGTGGATCAGTTAAGCCTAACACAATAGCA
GAGCAAATGGCTAAATCAGACATCGATGGTGCTTTAGTTGGTGGAGCTAGCTTAGTTGCAGCTGACTTTGCTC
AAATCGTAAACTACTAA

>ENA|CCL81405|CCL81405.1 Clostridioides difficile E12 Triosephosphate
isomerase (TIM) (Triose-phosphate isomerase)

ATGAGAAAACCTATAATTGCAGGAAACTGGAAAATGCATAAAAACAATAAAAGAAGCTTTAGAATTTGTAAATG
AAGTTAAAGATAAAGTAAATTTCTGATAAAGTAGAAGCTGTTATATGTGCACCATTTACTTTATTAAAGGATTT
AAAAGAAGCTACTAAGGGTACAAATATAAAGATAGGTGCTCAAAATATGCACTTTGAAGAAAAAGGAGCATTT
ACAGGAGAAGTTTACCTCTTATGTTAAAAGAAATAGATATGGACTATGTTGTAATAGGACATTCAGAAAGAA
GACAATACTTCAATGAAACTGATGAAACTGTAAACAAGAAAGTTTTAAAAGCATTAGAAGTAGGAATAGACCC
AATATTATGTGTTGGAGAACTTTAGAACAAGAGAAAGCTGGAAAAACTAAAGATGTTTGTAAAGTTCAAGTT
GAAAAAGCTTTAGAAAATGTTCTTAAAGATGATTTAGCAAAAAGTAGTTGTTGCATATGAGCCAATCTGGGCTA
TTGGAAGTGGTAAACTGCAACTGCTGAAGATGCTAATGACGTTATATCTTATATAAGAGAAGTTATAAAAGG
ATTATATGGAGAATTAGCTAATGAAGTTAGAATACAATACGGTGGAAAGTGTAAACCTTCAAATGTAGCCGAA
ATAATGGGTCAAAGTGATATAGATGGAGCTTTAGTAGGTGGAGCTAGTTTAGCTAGTAATGATTACCTAGACC
TTGTTAATTTCTAA