



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS

POSGRADO DE MICROBIOLOGÍA

**“Análisis de genómica comparativa entre cepas de
Clostridioides difficile aisladas en México y de otras
partes del mundo”**

Tesis

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS
MICROBIOLÓGICAS CON OPCIÓN EN: MICROBIOLOGÍA MÉDICA

PRESENTA:

QC. CHARLEN GUZMAN ORTIZ FLORES

DIRECTOR DE TESIS:

D.C. CLAUDIA FABIOLA MARTÍNEZ DE LA PEÑA

DIRECTOR EXTERNO:

DC. ALBA ICXIUH ROMERO RODRÍGUEZ

PUEBLA, PUE.

Enero, 2024



Puebla, Pue. a 23 de enero 2024.

**A LA ACADEMIA DEL POSGRADO
EN MICROBIOLOGÍA
CICM-ICUAP
P R E S E N T E.**

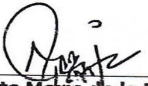
Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de tesis de maestría del alumno **Charlen Guzmán Ortiz Flores**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

“Análisis de genómica comparativa entre cepas de *Clostridioides difficile* aisladas en México y de otras partes del mundo”

A nuestro juicio, el alumno **Charlen Guzmán Ortiz Flores** puede proceder a la digitalización de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

Atentamente.
“Pensar Bien Para Vivir Mejor”


D.C. Margarita María de la Paz Arenas
Hernández


D.C. Rosa del Carmen Rocha Gracia


D.C. Candelario Vázquez Cruz


D.C. Patricia Lozano Zarain

Posgrado en Ciencias Microbiológicas
Instituto de Ciencias (ICUAP)

Edificio IC11,
Ciudad Universitaria
Col. San Manuel, Puebla, Pue. C.P. 72570
01 (222) 229 55 00 Ext. 2522
posgrado.microbiologia@correo.buap.mx

AGRADECIMIENTOS

Institucionales

- Agradezco sinceramente a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP) por permitirme formar parte de esta prestigiosa casa de estudios, proporcionándome el ambiente académico propicio para mi desarrollo.
- Mi gratitud al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca otorgada durante mis estudios de maestría con número de becario 982864, la cual desempeñó un papel fundamental en mi formación académica.
- Agradezco al Instituto de Ciencias BUAP (ICUAP) y al Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas (CICM) por brindarme la oportunidad de realizar mi maestría. Expreso mi agradecimiento por el constante apoyo, disponibilidad para tratar cualquier asunto y el valioso conocimiento adquirido en este centro. También agradezco el respaldo otorgado para la presentación de este trabajo en el XXVI Congreso Latinoamericano de Microbiología 2023 en Quito, Ecuador.
- Agradezco sinceramente al Hospital MAC Puebla por abrirme sus puertas. Mi agradecimiento se extiende al área del laboratorio clínico, los jefes coordinadores, al personal profesional y auxiliar por su cálida recepción y ayuda invaluable para la realización de la presente investigación.
- Expreso mi agradecimiento a la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado (VIEP) por su apoyo en la realización de este proyecto y por la beca de conclusión de tesis que ha sido fundamental para culminar con éxito mi maestría.
- Mi agradecimiento al Laboratorio de Biología Molecular de Enteropatógenos (LBME) por abrirme las puertas y permitirme desarrollar mi proyecto en sus instalaciones.
- Agradezco al Instituto de Química de la UNAM por su generoso apoyo y financiamiento en la secuenciación genómica, contribuyendo significativamente al avance de mi investigación.

AGRADECIMIENTOS

Personales

- Mi especial agradecimiento a mi directora de tesis la D.C. Claudia Fabiola Martínez de la Peña, aprecio profundamente la confianza que depositó en mi capacidad, lo cual ha sido un impulso motivador a lo largo de este proceso académico. Su guía ha sido invaluable y ha dejado una marca significativa en mi formación.
- A mi directora de tesis la D.C. Alba Ixiiuh Romero Rodríguez le agradezco por ser mi guía, su paciencia, dedicación de tiempo, consejos y confianza en mi capacidad ha sido invaluable.
- Mi agradecimiento a la Dra. Corina-Diana Ceapă por su apoyo y por abrirme las puertas de su laboratorio, su colaboración ha sido fundamental para el desarrollo exitoso de mi proyecto, y estoy sinceramente agradecido por su orientación.
- Expreso mi agradecimiento a la D.C. Patricia Lozano Zaráin por su apoyo constante, disponibilidad, tiempo y valiosos consejos que contribuyeron enriqueciendo este trabajo.
- Mi reconocimiento a la D.C. Margarita María de la Paz Arenas Hernández por su valioso apoyo y comentarios constructivos que fortalecieron mi trabajo durante este proyecto.
- Agradezco a la D.C. Rosa del Carmen Rocha Gracia por sus consejos, disponibilidad y apoyo constante que fueron fundamentales para el desarrollo de este proyecto.
- Mi agradecimiento al D.C. Candelario Vázquez Cruz por su disponibilidad, consejo y asesoría a lo largo de este proyecto.
- Expreso mi sincero agradecimiento al M.C. Javier Ximello Reyes por su generosidad al abrirme las puertas del laboratorio en el Hospital MAC Puebla. Su apoyo y disposición fueron fundamentales para el desarrollo de mi investigación.
- A todos mis amigos y compañeros del LBME, en especial a Montse, por las innumerables charlas y risas compartidas en el laboratorio, así como por nuestras múltiples colaboraciones. Su amistad ha sido invaluable.
- A Aranza y Dulce, agradezco su incondicional apoyo en nuestro grupo de trabajo. Su compromiso ha fortalecido significativamente nuestra labor.
- A mis compañeros de maestría, Alejandra, Verónica, Liset y Axel, agradezco su compañerismo y colaboración durante este emocionante viaje académico.
- A mis incondicionales amigos Humberto, Vidal, Jesús Cano gracias por estar siempre presentes

DEDICATORIAS

A mis queridos padres,

Modesta Flores y Pablo Ortiz, quiero expresar mi profundo agradecimiento por su inmenso esfuerzo, dedicación, sacrificios y enseñanzas a lo largo de mi vida. Más allá de todo, ha sido su amor, puro y grandioso, lo que ha constituido el sólido pilar en mi formación, tanto académica como personal. Su incondicional apoyo, sostenido a lo largo del tiempo, ha sido el motor que me impulsa a alcanzar mis metas. Han construido una familia ejemplar, llena de valores y buenas costumbres, y a pesar de las adversidades, me han enseñado el valor, la perseverancia y la tenacidad para perseguir este gran sueño. ¡Los amo con todo mi corazón!

A mis adoradas hermanas y cuñados,

Maribel y Griselda, ustedes son mis modelos a seguir, las amo con todo mi ser. No tengo palabras suficientes para agradecerles por el constante apoyo, amor y cariño que me han brindado desde mi infancia, cuando cuidaban de mí. A mis cuñados, Yovani y Jose los aprecio demasiado, gracias por todo su apoyo y cariño. Este logro también es de ustedes.

A mis adorables sobrinos,

Mis nenas Sayu y Maureen, y mis pequeños Isaac y Gadiel, son pequeños regalos de mis hermanas. ¡Los amo con todo mi corazón!

ÍNDICE

ABREVIATURAS	5
LISTAS DE FIGURAS.....	7
LISTAS DE TABLAS	9
RESUMEN.....	10
1. INTRODUCCIÓN.....	12
1.1 Características generales de <i>Clostridioides difficile</i>	12
1.2 Infección por <i>C. difficile</i> (ICD).....	12
1.3 Genoma de <i>Clostridioides difficile</i>	13
1.3.1 Caracterización molecular de <i>C. difficile</i> basado en MLST	15
1.4 Principales factores de virulencia.....	17
1.4.1 Locus <i>PaLoc</i>	19
1.4.1.1 Subtipificación de las toxinas TcdA y TcdB en <i>C. difficile</i>	20
1.4.2 Toxina binaria CDT.....	21
1.5 Mecanismo de patogenicidad.....	22
1.6 Mecanismos conocidos de resistencia antimicrobiana en <i>Clostridioides difficile</i>	23
1.6.1 Resistencia a los principales antibióticos usados para tratar ICD	24
1.6.1.1 Vancomicina.....	24
1.6.1.2 Metronidazol.....	26
1.6.1.3 Fidaxomicina.....	28
1.7 Genómica Comparativa en <i>C. difficile</i>	29
1.7.1 Fundamentos de la Genómica Comparativa.....	30
1.7.2 Metodologías de la Genómica Comparativa en <i>C. difficile</i>	31
1.7.2.1 Comparación mediante cgMLST	32

1.7.2.2	Análisis del Pangenoma	33
1.8	Distribución global de <i>C. difficile</i> : Epidemiología molecular en un contexto internacional	34
2.	ANTECEDENTES ESPECIFICOS	35
3.	JUSTIFICACIÓN	37
4.	OBJETIVOS	38
4.1	Objetivo general	38
4.2	Objetivos específicos	38
5.	MATERIALES Y METODOS	39
5.1	Estudio experimental	40
5.1.1	Muestreo y consideraciones clínicas	40
5.1.2	Aislamiento.....	42
5.1.3	Identificación de aislamientos.....	42
5.1.3.1	Extracción genómica de los aislamientos y detección de genes específicos (<i>tpi, tcdA, tcdB, cdtA, cdtB</i>) mediante PCR	42
5.1.4	Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana	43
5.1.5	Secuenciación del genoma completo (WGS)	45
5.2	Análisis <i>in silico</i>	46
5.2.1	Control de calidad, ensamble, anotación e identificación taxonómica de las secuencias genómicas.....	46
5.2.2	Tipificación de secuencias multilocus (MLST).....	47
5.2.3	Identificación de genes de virulencia	48
5.2.4	Identificación de genes y mutaciones puntuales asociados a resistencia a antibióticos	48
5.2.5	Identificación de plásmidos asociados a resistencia a antibióticos	49
5.2.6	Metodologías de genómica comparativa aplicadas en el presente estudio.....	49

5.2.6.1	Recopilación y selección de genomas para análisis comparativo.....	49
5.2.6.2	Inferencia filogenética basada en cgMLST	52
5.2.6.3	Construcción del pangenoma y relación filogenética.....	52
5.2.6.4	Comparación de factores de virulencia y resistencia antimicrobiana en las cepas de <i>C. difficile</i>	53
6.	RESULTADOS.....	54
6.1	Análisis experimental.....	54
6.1.1	Caracterización Microbiológica de las muestras recolectadas	54
6.1.2	Análisis genómico de las cepas aisladas	55
6.1.3	Análisis de susceptibilidad Antimicrobiana	57
6.2	Análisis <i>In silico</i>	60
6.2.1	Evaluación de la calidad de las secuencias.....	60
6.2.2	Análisis Genómico en base a la tipificación MLST.....	61
6.2.3	Análisis Filogenético de <i>C. difficile</i> basado en cgMLST.....	61
6.2.3.1	Análisis filogenético basado en cgMLST	62
6.2.4	Análisis del pangenoma de <i>C. difficile</i> : Comparación entre Cepas Mexicanas y de Otros Países	65
6.2.5	Análisis de comparación del viruloma entre cepas mexicanas y de otros países.....	71
6.2.6	Análisis de comparación del resistoma entre cepas mexicanas y de otros países	77
7.	DISCUSIÓN.....	87
7.1	Diversidad genómica y filogenia	87
7.2	Pangenoma y variabilidad genética:.....	88
7.3	Comparación del viruloma identificado en cepas de <i>C.difficile</i>	89
7.4	Comparación del resistoma identificado en cepas de <i>C.difficile</i>	91
8.	CONCLUSIONES.....	94

9. PERSPECTIVAS	95
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96
11. ANEXOS	108
11.1 ANEXO A. Solicitud de autorización para la recolección y utilización de muestras biológicas	108
11.2 ANEXO B. Bitácora de recolección de muestras en el Hospital MAC	110
11.3 ANEXO C. Protocolo de cultivo y aislamiento	113
11.4 ANEXO D. Protocolo de extracción y PCR	114
11.5 ANEXO E. Protocolos de pruebas de susceptibilidad	119
11.5.1 Preparación de soluciones Stock de antibióticos para realizar las pruebas de susceptibilidad por dilución en agar para <i>C. difficile</i>	119
11.5.2 Método de determinación de CMI por dilución en agar para <i>C. difficile</i> (método de referencia para bacterias anaerobias CLSI M11-A8 2012	123
11.5.3 Protocolo prueba susceptibilidad E-TEST	129
11.6 ANEXO F. Calidad de las secuencias genómicas	132

Abreviaturas

Abreviatura	Definición
AMR	Genes de resistencia antimicrobiana adquirida
AST	Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana
Casos	Secuencias codificantes de proteínas
CCFA	Agar Cicloserina-Cefoxitina-Fructosa
CDAD	Diarrea asociada a <i>C. difficile</i>
CDT	Toxina binaria o transferasa de <i>C. difficile</i>
CLSI	Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio
CRISPR	Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente
DAA	Diarrea asociada a antibióticos
EGM	Elementos genéticos móviles
EIA	Ensayo Inmunoenzimático
ESCMID	Sociedad Europea de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas
Fbp68	Proteína de unión a fibronectina
FliC	Flagelina (proteína flagelar)
FliD	Cap flagelar
GC	Contenido de guanina y citosina
GDH	Enzima glutamato deshidrogenasa
GroEL	Proteína de choque térmico
IDSA	Enfermedades Infecciosas de América
ICD	Infección por <i>C. difficile</i>
IS	Secuencias de inserción
LBME	Laboratorio de biología molecular de enteropatógenos
MDR	Multi drogo resistencia
MET-1	Ecosistema microbiano definido
MLST	Tipificación multilocus de secuencias

MLVA	Número variable multilocus de análisis de repetición en tándem
NGS	Secuenciación de nueva generación
PBP	Proteínas de unión a la penicilina
PaLoc	Locus de patogenicidad cromosómica
PFGE	Electroforesis en campo pulsado
PFOR	Piruvato-ferredoxina oxidoreductasas
REA	Análisis basados en restricción enzimática
SHEA	Sociedad Epidemiológica de Salud de Los Estados Unidos
SlpA	Proteína A de la capa S
SNP	Polimorfismos de nucleótido único
TFPI	Proteína inhibidora del factor de la vía del tejido
TMF	Trasplante de microbiota fecal
WGS	Secuenciación del genoma completo
cgMLST	Comparación MLST del genoma central
cgSNP	SNP del genoma central
wgMLST	Comparación MLST del genoma completo

Listas de figuras

Figura 1.	Principales factores de riesgo de la ICD.....	13
Figura 2.	Mapa circular del cromosoma de 4.3 Mb de la cepa 630 de <i>C. difficile</i>	14
Figura 3.	Árbol de máxima verosimilitud generado utilizando datos de MLST de todos los clados de <i>C. difficile</i> conocidos presentes en la base de datos PubMLST.....	17
Figura 4.	Organización y estructura del locus Paloc de <i>C. difficile</i>	20
Figura 5.	Diversidad de secuencias de aminoácidos de TcdA y TcdB.....	21
Figura 6.	Representación del locus CDT y sus componentes.....	22
Figura 7.	Patogénesis de <i>C. difficile</i> . Producción de Toxinas y formación de Pseudomembrana.....	23
Figura 8.	Esquema Ilustrativo de los Factores Conocidos que Contribuyen al Desarrollo de la Resistencia a los Antibióticos en <i>C. difficile</i>	24
Figura 9.	Representación del plásmido de resistencia al metronidazol pCD-METRO.....	28
Figura 10.	Mecanismos de resistencia de <i>C. difficile</i> frente a los principales antibióticos utilizados en el tratamiento de la ICD.....	29
Figura 11.	Diagrama del proceso analítico para examinar el genoma bacteriano.....	31
Figura 12.	Comparación entre enfoques de tipificación basados en alelos y SNPs.....	32
Figura 13.	Distribución geográfica de los ribotipos y clados comunes de <i>C. difficile</i> alrededor del mundo.....	35
Figura 14.	Esquema general de trabajo.....	39
Figura 15.	Esquema general del protocolo de cultivo y aislamiento de cepas de <i>C. difficile</i>	42
Figura 16.Esquema general del protocolo de extracción genómica y detección de genes específicos mediante PCR.....	43
Figura 17.	Cultivo microbiológico en CCFA-TC de muestras fecales y extracción genómica.....	55
Figura 18.	Gel representativo para la determinación del gen <i>tpi</i>	56
Figura 19.	Características demográficas de cepas de <i>C. difficile</i> y perfil toxigénico.....	56
Figura 20.	Patrón de frecuencia de susceptibilidad antimicrobiana en 39 aislados de <i>C. difficile</i>	58
Figura 21.	Diversidad de los STs identificados en los genomas de cepas mexicanas y de otros países.....	61
Figura 22.	Análisis filogenético basado en cgMLST de cepas mexicanas y de otros países.....	63
Figura 23.	Árboles de expansión mínima basado en el análisis cgMLST de cepas en México y en otros países.....	65
Figura 24.	Pangenoma de 149 cepas de <i>C. difficile</i>	66
Figura 25.	Matriz de presencia/ausencia de genes en el pangenoma de <i>C. difficile</i> en las cepas analizadas.....	68
Figura 26.	Pangenoma de <i>C. difficile</i> en las cepas del clado 2.....	69
Figura 27.	Pangenoma de <i>C. difficile</i> en las cepas del clado 1.....	70
Figura 28.	Pangenoma de <i>C. difficile</i> en las cepas del clado 4.....	71

<i>Figura 29.Análisis comparativo de genes de virulencia en cepas del clado 2 entre cepas mexicanas y de otros países</i>	<i>73</i>
<i>Figura 30.Análisis comparativo de genes de virulencia en cepas del clado 1 entre cepas mexicanas y de otros países</i>	<i>74</i>
<i>Figura 31.Análisis comparativo de genes de virulencia en cepas del clado 4 entre cepas mexicanas y de otros países</i>	<i>75</i>
<i>Figura 32. Análisis de los factores de virulencia identificados en las 9 cepas secuenciadas en el presente estudio....</i>	<i>76</i>
<i>Figura 33. Análisis comparativo del resistoma entre cepas mexicanas y de otros países en el clado 2.....</i>	<i>80</i>
<i>Figura 34. Análisis comparativo del resistoma entre cepas mexicanas y de otros países en el clado 1.....</i>	<i>81</i>
<i>Figura 35. Análisis comparativo del resistoma entre cepas mexicanas y de otros países en el clado 4.....</i>	<i>82</i>
<i>Figura 36. Correlación entre resistoma y su evaluación fenotípica en 9 cepas secuenciadas en el presente estudio.</i>	<i>84</i>
<i>Figura 37. Gráfico Comparativo de Identificación de Plásmidos en 149 cepas Analizadas.....</i>	<i>86</i>
<i>Figura 38. Preparación de las placas de agar con las diluciones de antibiótico. Basado en CLSI M11-A8 2012.....</i>	<i>126</i>
<i>Figura 39. Inoculación en las placas de agar con el antibiótico respectivo.....</i>	<i>127</i>
<i>Figura 40. Imagen representativa de los parámetros de calidad de ensamblaje en 9 cepas de C. difficile secuenciadas en el presente proyecto.....</i>	<i>132</i>
<i>Figura 41. Graficas estadísticas de calidad de ensamblaje en 9 cepas de C. difficile secuenciadas en el presente proyecto</i>	<i>132</i>

Listas de tablas

Tabla 1.	<i>Genes housekeeping utilizados para la tipificación MLST en C. difficile.....</i>	<i>16</i>
Tabla 2.	<i>Resumen de los principales factores de virulencia de C. difficile.....</i>	<i>18</i>
Tabla 3.	<i>Descripción de las categorías de los genes accesorios dentro del pan genoma.....</i>	<i>34</i>
Tabla 4.	<i>Descripción de antecedentes específicos sobre C. difficile relevantes para este estudio.....</i>	<i>35</i>
Tabla 5.	<i>Valores de corte de CMI de los antibióticos usados para las pruebas de susceptibilidad y perfil de susceptibilidad de la cepa de referencia R20291</i>	<i>44</i>
Tabla 6.	<i>Valores indicativos de pureza en muestras de ADN</i>	<i>45</i>
Tabla 7.	<i>Recopilación de Genomas completos de C. difficile de cepas aisladas de pacientes en México.....</i>	<i>50</i>
Tabla 8.	<i>Recopilación de Genomas de C. difficile de cepas aisladas en otras partes del mundo</i>	<i>51</i>
Tabla 9.	<i>Resultados de las pruebas de susceptibilidad de cepas del LBME por CMI, y perfil toxigénico por PCR.....</i>	<i>59</i>
Tabla 10.	<i>Resultados de las pruebas de susceptibilidad por CMI y perfil toxigénico por PCR 16 cepas recolectadas del Hospital MAC Puebla.....</i>	<i>59</i>
Tabla 11.	<i>Distribución de los genes de virulencia en los clados y STs en cepas mexicanas y de otros países</i>	<i>77</i>
Tabla 12.	<i>Resistoma identificado en las cepas analizadas.....</i>	<i>78</i>
Tabla 13.	<i>Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.....</i>	<i>117</i>
Tabla 14.	<i>Condiciones para la obtención de productos de PCR.....</i>	<i>117</i>

RESUMEN

La infección por *Clostridioides difficile* (ICD) plantea un desafío significativo para la salud pública a nivel mundial, dando origen a brotes de diarrea vinculados al uso de antibióticos y colitis pseudomembranosa en entornos clínicos. La prevalencia de cepas epidémicas, como la RT027/ST01, caracterizada por su alta virulencia y resistencia a antibióticos, ha experimentado un aumento global, alcanzando una notoria prevalencia del 63% en México. A pesar de este escenario, la investigación genómica en cepas mexicanas es limitada, sin comparaciones genómicas a nivel internacional. El presente trabajo tuvo como objetivo realizar un análisis de las características genómicas, filogenéticas y patogénicas de cepas aisladas en Puebla, México. Para esto, se recolectaron 93 muestras fecales de pacientes de un hospital privado en Puebla entre junio de 2022 y enero de 2023, a partir de las cuales se aislaron y tipificaron 16 cepas de *C. difficile* mediante PCR. Estas cepas se integraron con 22 cepas almacenadas en el Laboratorio de Biología Molecular de Enteropatógenos (LBME). Posteriormente se evaluó la susceptibilidad a antibióticos mediante concentración mínima inhibitoria (CMI) y se llevó a cabo la Secuenciación del Genoma Completo (WGS) de 9 cepas. La comparación de estas cepas con otros genomas de México (75 genomas) y de otros países (74 genomas) provenientes de bases de datos públicas permitió realizar la clasificación y análisis filogenético basado en Tipificación Multilocus de Secuencias (MLST). Asimismo, se identificó y comparó el viruloma y resistoma mediante análisis bioinformáticos. Los resultados de las pruebas de susceptibilidad revelaron una variabilidad significativa en los patrones de resistencia, destacando tasas de resistencia del 13% a vancomicina y del 26% a metronidazol. El análisis filogenético basado en MLST arrojó un árbol filogenético que evidenció una alta similitud genética entre las cepas mexicanas, identificándose un total de 19 secuencias tipo (STs) distribuidas en tres grupos filogenéticos o “clados” distintos (C1, C2 y C4), siendo especialmente notoria la prevalencia del ST01 que alcanzó un 44% en el clado 2, además, se detectaron 18 STs compartidos con cepas de otros países. Mediante la clasificación cgMLST se observó que las cepas del clado 2 comparten un mayor número de cgSTs dentro de las cepas de un mismo país, específicamente en México se encontró en el 5% de las cepas (n=7), esto indica que las cepas de este clado presentan una menor

variabilidad genética. En cuanto al pangenoma, el análisis de 149 cepas reveló un pangenoma "abierto" con 10,300 genes, donde el 26% pertenecía al genoma central y el 74% al genoma accesorio, con genes del núcleo blando (3%), genoma periférico (11%) y genoma diferencial (60%). En el análisis de los factores de virulencia, se encontró una similitud notable en la distribución de genes de toxinas entre cepas mexicanas y de otros países. Se detectaron 20 genes de virulencia, incluyendo toxinas, reguladores transcripcionales, y genes relacionados con adherencia y exoenzimas. La subtipificación de la toxina B reveló la presencia de múltiples subtipos, destacando el TcdB2.1 en cepas ST01 del clado 2. Además, la exploración del resistoma evidenció la presencia del clúster de genes *vanG*, constituido por genes *vanS* y *vanR*, cuyas mutaciones se han relacionados con la resistencia a vancomicina. Este clúster estuvo presente en el 100% en los clados 1 y 2, pero ausente en el clado 4. Se identificaron mutaciones puntuales asociadas con la elevada CMI en vancomicina como VanR T115A que estuvo presente en el 94% de cepas mexicanas ST01 del clado 2. Se identificó la presencia plásmidos asociados a resistencia, como pCD-METRO, vinculado a la resistencia al metronidazol. Sin embargo, al evaluar la resistencia fenotípica en nueve cepas que albergaban este clúster, se confirmó que el 100% de ellas mostraron sensibilidad a la vancomicina. Este resultado indica que, aunque esté presente, el clúster *vanG* por sí solo no es suficiente para conferir resistencia a este antimicrobiano. Además, la ausencia del plásmido Ptef1 en cepas mexicanas sugiere una variabilidad única en la resistencia a aminoglucósidos. Estos hallazgos resaltan la complejidad de los perfiles de resistencia y la variabilidad genética en cepas de *C. difficile*, con implicaciones importantes para la gestión clínica y la prevención de infecciones en México.

Palabras clave: *Clostridioides difficile*, genómica comparativa, susceptibilidad antimicrobiana, secuenciación genómica, análisis bioinformático.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Características generales de *Clostridioides difficile*

Clostridioides difficile, anteriormente conocido como *C. difficile*, es una bacteria Gram positiva del género *Clostridioides*. Esta bacteria es anaerobia estricta, móvil, esporulada y productora de enterotoxinas. Fue descrita por primera vez en 1935 tras su aislamiento en las heces de recién nacidos y originalmente nombrada *Bacillus difficilis* debido a las complicaciones asociadas con su cultivo (Lawson *et al.*, 2016). Esta bacteria, está presente en el tracto intestinal de humanos y animales como un organismo comensal. Sin embargo, en circunstancias particulares, como la alteración de la microbiota intestinal por el uso prolongado de antibióticos de amplio espectro, principalmente en pacientes hospitalizados, puede tornarse en un patógeno oportunista, desencadenando infecciones que varían desde diarreas leves hasta colitis grave (Lascurain de Mora, 2018). La emergencia de cepas hipervirulentas en diversas regiones del mundo ha ampliado el impacto de *C. difficile*, afectando a diferentes grupos poblacionales como a personas jóvenes de 0 a 30 años o de la comunidad, incluso cuando no han tenido previamente exposición a antibióticos. (Burke & Lamont, 2014). Este fenómeno destaca la necesidad crítica de investigar las cepas de *C. difficile*, subrayando la importancia de un análisis de genómica comparativa entre cepas aisladas en México y otras partes del mundo, proporcionando así una base sólida para el desarrollo de estrategias efectivas de prevención y tratamiento.

1.2 Infección por *C. difficile* (ICD)

La infección por *C. difficile* (ICD) representa un riesgo grave, especialmente para personas mayores de 65 años con microbiota intestinal alterada o sistemas inmunológicos comprometidos, debido a hospitalizaciones prolongadas y el uso extensivo de antibióticos de amplio espectro (**Figura 1**). Esta infección gastrointestinal puede variar desde diarrea leve hasta formas severas, incluyendo complicaciones como colitis pseudomembranosa y megacolon tóxico, siendo potencialmente fatal en casos extremos (Martinez-Melendez, J.A., 2018).

La ICD es mediada principalmente por toxinas que dañan la mucosa intestinal y está estrechamente relacionada con el uso de antibióticos, ya que estos alteran la microbiota normal permitiendo que *C. difficile* colonice el intestino (Muñoz-Días, C.M., 2018). Se estima que *C. difficile* es responsable del 25% al 30% de los casos de diarrea intrahospitalaria asociada a antibióticos (Álvarez-Hernández *et al.*, 2018). Sin embargo, numerosos casos ocurren en personas que no han recibido tratamiento con antibióticos ni han estado hospitalizadas. Se calcula que alrededor del 20% al 28% de ICD se adquieren en entornos comunitarios. En países como Estados Unidos, Suecia e Inglaterra, se registra una incidencia de 20 a 50 casos por cada 100,000 habitantes (Chitnis *et al.*, 2013)

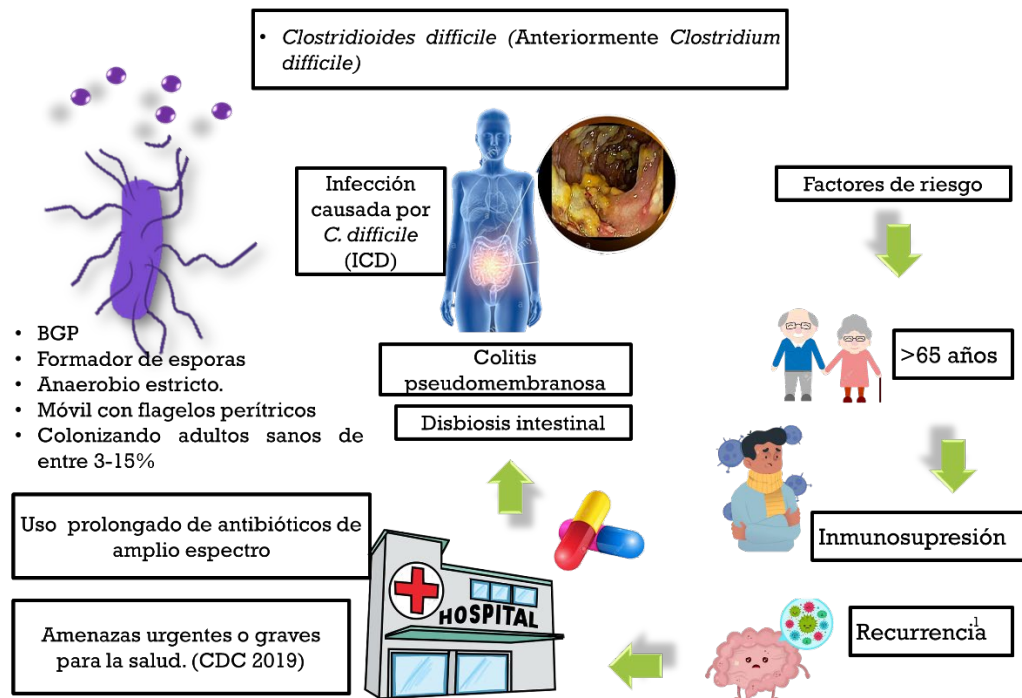


Figura 1. Principales factores de riesgo de la ICD. Elaboración propia 2023.

1.3 Genoma de *Clostridioides difficile*

La caracterización del genoma de *C. difficile* comenzó en 2006 por Sebaihia y colaboradores, en donde describieron el primer genoma completo secuenciado y anotado de *C. difficile* con la cepa 630 (RT012), aislada de un paciente con colitis pseudomembranosa en Suiza. Su genoma presenta un cromosoma circular de aproximadamente 4.3 millones de pares de

bases (4.3 Mb), alberga alrededor de 3,776 secuencias codificantes de proteínas (CDSs), y un contenido de GC del 29.06% (**Figura 2**). También se identificó un plásmido circular (pCD630) de 7,881 pares de bases que contiene 11 CDSs (Sebahia *et al.*, 2006).

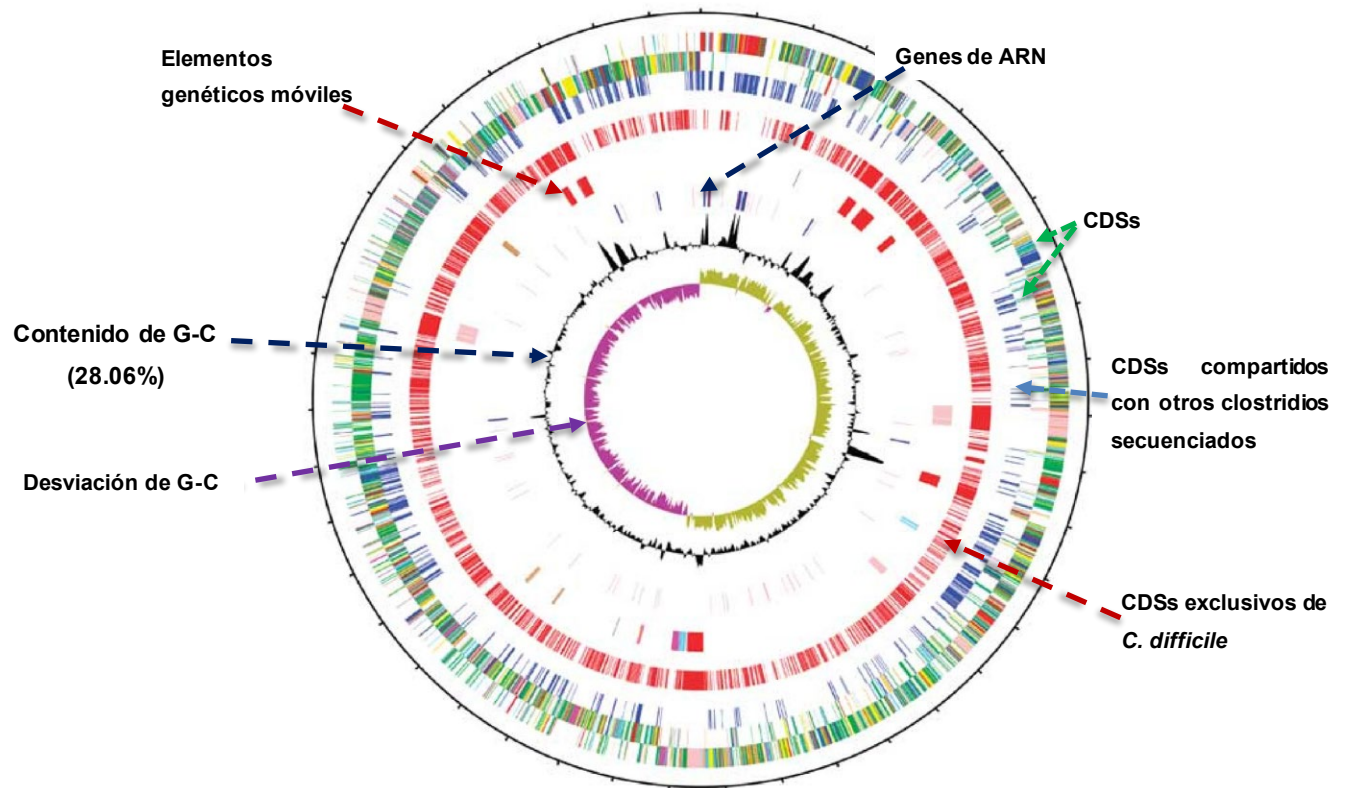


Figura 2. Mapa circular del cromosoma de 4.3 Mb de la cepa 630 de *C. difficile*.

Los círculos concéntricos se describen de la siguiente manera (de afuera hacia adentro): los círculos 1 y 2 representan 3,776 posibles secuencias codificantes de proteínas (CDSs) transcritas en direcciones opuestas; el círculo 3 muestra CDSs compartidos con otros clostridios secuenciados (en azul); el círculo 4 resalta CDSs exclusivos de *C. difficile* (en rojo); el círculo 5 identifica elementos móviles, como transposones en rojo/pálido, profagos en rosa, profagos/transposones parciales en marrón, el elemento skin en azul y las islas genómicas en magenta; el círculo 6 muestra genes de ARN, donde los rARNs están en azul, los tARNs en rojo y los ARN estables en morado; finalmente, los círculos 7 y 8 indican el contenido de G-C y la desviación de GC. Imagen modificada de Sebahia *et al.*, 2006.

Desde la secuenciación de la cepa 630, se han secuenciado y anotado completamente varios otros genomas con tamaños de 4,1 a 4,3 Mbp, revelando que el genoma de *C. difficile* es un mosaico genético dinámico, debido a que alrededor del 11% de su genoma está compuesto por elementos genéticos móviles, que incluyen bacteriófagos pertenecientes a las familias *Myoviridae* y *Siphoviridae*, que a menudo están involucrados en la regulación de la producción de toxinas y pueden llevar a cabo la transducción de otros elementos genéticos

(Elliott *et al.*, 2017), intrones del grupo I, secuencias de inserción (IS), elementos *sigK* intervinientes (*skin*), repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente (CRISPR)-cas, islas genómicas y elementos transponibles y conjugativos. Esta alta proporción de elementos móviles sugiere la capacidad de *C. difficile* para adquirir y transferir genes rápidamente, lo que contribuye a su adaptabilidad y virulencia (Knight *et al.* 2015)

La diversidad genómica de *C. difficile* se puede definir mediante su pangenoma, el cual representa el repertorio genético de la especie o "pool génico". El pangenoma está compuesto por un genoma central (los genes presentes en todos los aislados) que contiene genes esenciales para las funciones celulares básicas y factores de virulencia asociados con la patogenicidad, y un genoma accesorio o adaptativo altamente variable (genes ausentes en uno o más cepas o únicos de una cepa en particular). Además, se ha observado que el pangenoma de *C. difficile* es "abierto", esto se refiere a que su tamaño aumenta indefinidamente al agregar nuevos genomas; por lo tanto, la secuenciación de cepas adicionales probablemente producirá genes nuevos, indicando una gran capacidad de intercambio genético (Norsigian *et al.*, 2022).

1.3.1 Caracterización molecular de *C. difficile* basado en MLST

La tipificación por multilocus de secuencias (MLST) es un método ampliamente usado para el tipado molecular de *C. difficile*. Implica amplificar y secuenciar entre 300 y 500 pares de bases de siete genes constitutivos (*adk*, *atpA*, *dxr*, *glyA*, *recA*, *sodA* y *tpi*) (**Tabla 1**) en *C. difficile*, asignando a cada variante de secuencia un número específico. Estos números se combinan para formar un perfil alélico denominado secuencia tipo o ST (Lemée & Pons, 2010) (**Figura 11**). La comparación de los ST de diferentes cepas se realiza fácilmente mediante bases de datos en línea como PubMLST (Jolley *et al.* 2018), que actualmente cuenta con información sobre 3179 ST de *C. difficile* (<http://pubmlst.org/organisms/Clostridioides-difficile/>, última actualización el 21 de agosto de 2023).

Tabla 1. Genes housekeeping utilizados para la tipificación MLST en *C. difficile*
 Basado en (Lemée & Pons, 2010; Jolley *et al.* 2018)

GEN	FUNCIÓN	PAPEL	RELEVANCIA
<i>adk</i> (adenylate kinase)	Síntesis y mantenimiento de nucleótidos de adenina	Generación de ATP	Energía celular
<i>atpA</i> (subunidad a de la atp sintasa)	Producción de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico	Respiración celular	Conversión de energía
<i>dxr</i> (1-desoxirribulosa-5-fosfato reductoisomerasa)	Vía de síntesis de isoprenoides	Componentes de la membrana celular	Estructura celular
<i>glyA</i> (serina hidroximetiltransferasa)	Metabolismo de la serina	Síntesis de aminoácidos esenciales	Nutrición celular
<i>recA</i> (recombinasa a)	Reparación del ADN y recombinación genética	Respuesta al daño genético	Integridad genómica
<i>sodA</i> (superóxido dismutasa a)	Neutralización de radicales libres de oxígeno	Protección contra el daño oxidativo	Estrés oxidativo
<i>tpi</i> (triosa fosfato isomerasa)	Interconversión de triosas fosfato	Producción de energía y precursores metabólicos	Metabolismo celular

Una ventaja fundamental del MLST es su habilidad para establecer relaciones evolutivas entre diversas cepas, lo que ha permitido investigar la filogenia de *C. difficile*. Esta bacteria se compone de al menos seis grupos o clados filogenéticos: Clados principales 1 a 5, y tres clados crípticos designados como C-I, C-II y C-III. Un clado críptico se refiere a un grupo de organismos que comparten una ascendencia común pero que no son fácilmente distinguibles por características morfológicas o fenotípicas. Estos clados crípticos pueden representar ramificaciones evolutivas más recientes o grupos más divergentes dentro de la especie, y su

identificación se basa en análisis moleculares que revelan diferencias genéticas. El Clado 5, el más divergente entre los clados no crípticos, se estima que se separó del resto de la especie hace entre 1.1 y 85 millones de años (Elliott *et al.*, 2017). Destaca que en el clado 1 se agrupan la mayoría de los STs identificados hasta el momento, lo que ofrece valiosa información sobre la diversidad genética y la evolución de este microorganismo (**Figura 3**). Este método se ha revelado esencial para comprender la variabilidad genética y epidemiológica de *C. difficile* (Roberts & Mullany, 2016).

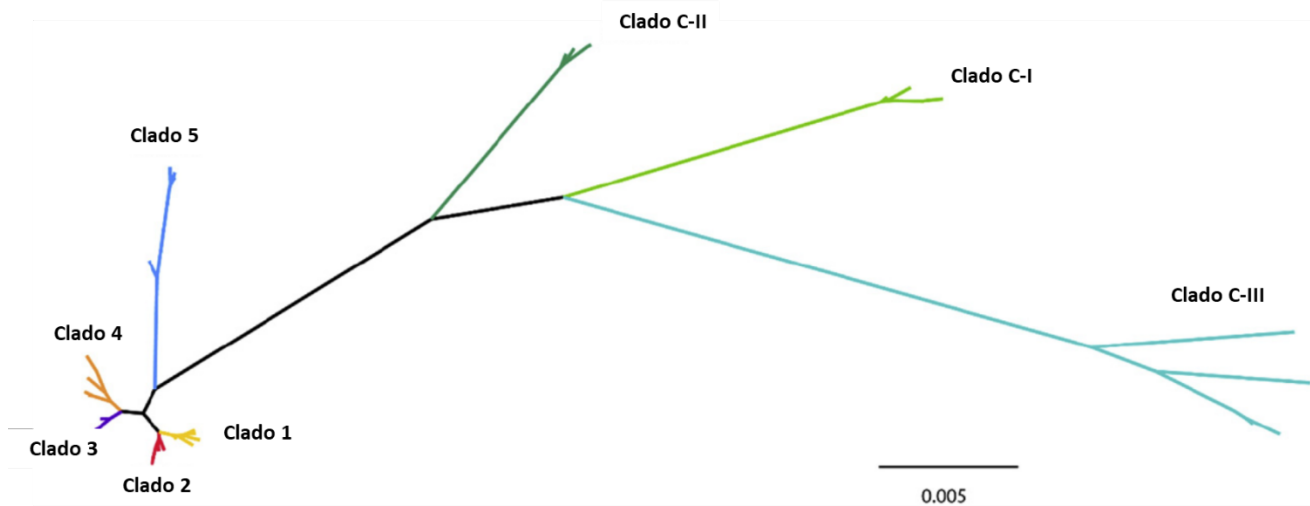


Figura 3. Árbol de máxima verosimilitud generado utilizando datos de MLST de todos los clados de *C. difficile* conocidos presentes en la base de datos PubMLST.

La historia evolutiva fue inferida utilizando el método de máxima verosimilitud basado en el modelo Tamura-Nei. El árbol está representado a escala, con longitudes de ramas medidas en el número de sustituciones por sitio. Imagen modificada de Elliott *et al.*, 2017.

1.4 Principales factores de virulencia

La presentación clínica de la ICD está influenciada por una serie de factores de virulencia, que incluyen la adherencia, producción de toxinas, enzimas y proteínas de superficie, (**Tabla 2**). Principalmente, la patogénesis está impulsada por la actividad de las toxinas A y B, codificadas dentro del locus de patogenicidad (*PaLoc*).

Tabla 2. Resumen de los principales factores de virulencia de *C. difficile*

Factor de Virulencia	Función	Referencia
Adherencia a las células epiteliales		
CbpA	Proteína A de unión al colágeno	Tulli L, <i>et al.</i> , 2013
CD0873, CD2831, CD3246	Implicadas en la adherencia, colonización, unión al colágeno	Arato <i>et al.</i> , 2019
Cwp66	Proteína de pared celular, contribuye a la adhesión en células epiteliales y permite la tolerancia al estrés.	Zhou <i>et al.</i> , 2022
CwpV	Proteína de pared celular, propiedades auto agregativas.	Sekulovic <i>et al.</i> , 2015
FbpA/Fbp68	Proteína A de unión a la fibronectina.	Barketi-Klai A, <i>et al.</i> , 2011
Exotoxinas		
CDT Toxina binaria	Desorganiza el citoesqueleto y aumenta la adherencia a las células epiteliales	Papatheodorou P, <i>et al.</i> , 2011
TcdA (Toxina A), TcdB (Toxina B)	Inactivan Rho GTPasas y desorganizan el citoesqueleto.	Kuehne SA, <i>et al.</i> , 2010
Exoenzimas		
Cwp84	Proteasa de cisteína asociada a la superficie celular de la bacteria, permite la degradación de proteínas de la matriz extracelular de las células epiteliales, permitiendo la colonización	Poquet I, <i>et al.</i> , 2018
Zmp1	Metaloproteasa dependiente de zinc que degrada componentes de la matriz extracelular, y modula la adhesión a través de la escisión de la proteína CD2831.	Hensbergen <i>et al.</i> , 2015, Martínez-Melendez, J.A., 2018
Características de Virulencia Amplias		
Resistencia a lisozima	Resistencia a la hidrólisis de la lisozima.	Lanzoni-Mangutchi <i>et al.</i> , 2022
Biofilm	Facilita la resistencia y persistencia.	
Formación de esporas	Esencial para la transmisión y resistencia ambiental. Internalización en enterocitos (ref. Castro-Córdova nature communications)	Frost <i>et al.</i> , 2021;
Truncamiento de regulador TcdC	Aumenta producción de toxinas A y B, asociada con cepas hipervirulentas como RT027	Carter <i>et al.</i> , 2011

1.4.1 Locus *PaLoc*

El *PaLoc* (locus de patogenicidad) de *C. difficile* es una región genómica que abarca aproximadamente 19.6 kb y codifica 5 proteínas, las toxinas A y B (TcdA y TcdB), y los reguladores TcdR, TcdE y TcdC, (**Figura 4**) (Lital Meyer *et al.*, 2014).

Las toxinas A y B constan de cuatro dominios similares (**Figura 4A**): el dominio de glucosiltransferasa (GTD) en el extremo N-terminal inactiva las Rho GTPasas, mientras que el dominio de proteasa de cisteína (CPD) se encarga del auto-procesamiento y liberación del GTD. El Dominio de Entrega y Unión al Receptor (DRBD) facilita la translocación del GTD desde las vesículas endocíticas al citoplasma. El dominio C-terminal de unión al receptor (CROPS) está involucrado en la unión al receptor (Hartley-Tassell *et al.*, 2019). TcdA y TcdB se unen a receptores celulares específicos, se internalizan y forman canales en la membrana celular. En el citosol, inactivan las Rho GTPasas, provocando la disfunción celular y la alteración del citoesqueleto de actina (Donnelly *et al.*, 2022).

La proteína TcdR es un regulador positivo de la producción de toxinas, mientras que TcdC actúa como un regulador negativo, reprimiendo la expresión de las toxinas, además su mutación se ha relacionado con la hipervirulencia de ciertas cepas clínicas. Mutaciones de ganancia de parada (stop-gain) o deleciones provocan la formación de una proteína TcdC truncada. Estas mutaciones ocasionan la interrupción prematura de la secuencia de la proteína TcdC, dando como resultado una proteína más corta y sin funcionalidad. La proteína TcdE actúa como una proteína similar a holinas que forman poros en la membrana celular, permitiendo la liberación de toxinas u otros compuestos al exterior de la célula (**Figura 4B**) (Buddle & Fagan, 2023).

El *PaLoc* se encuentra en el mismo sitio de integración cromosómica en todas las cepas toxigénicas de *C. difficile*, sin embargo, las cepas que carecen de *PaLoc* en su genoma no están asociadas con la ICD. No obstante, se ha observado la transferencia horizontal de *PaLoc* entre diferentes cepas, lo que puede transformar una cepa inicialmente no toxigénica en toxigénica (Kachrimanidou y Malisiovas 2011).

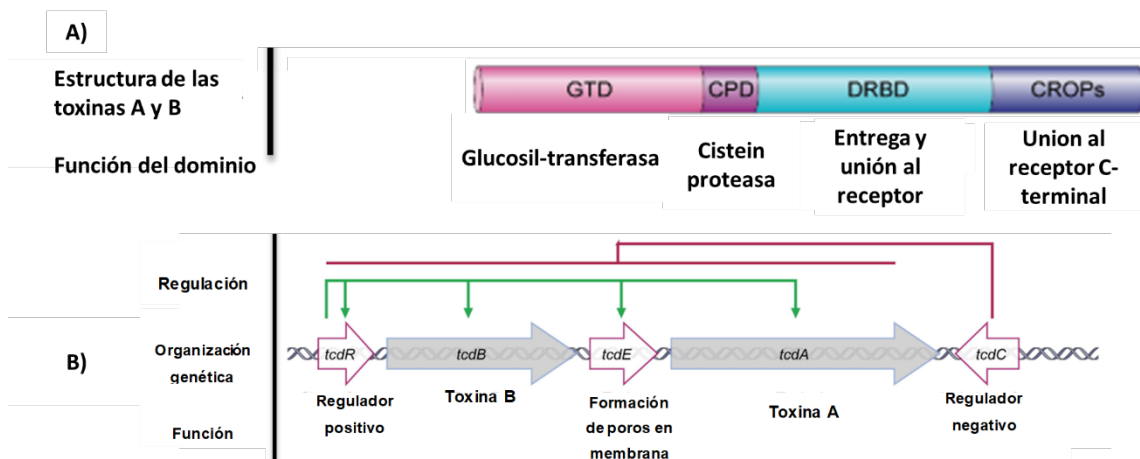


Figura 4. Organización y estructura del locus *PaLoc* de *C. difficile*

A) Estructura de las toxinas A y B, y la función del dominio. B) Estructura del *PaLoc* y función de los reguladores. El locus de patogenicidad (*PaLoc*) consta de cinco genes: *tcdA* y *tcdB*, que codifican las toxinas A y B; *tcdR*, un factor sigma alternativo y posible regulador positivo del *PaLoc* (Flechas en verde); *tcdE*, que codifica una proteína similar a holinas implicada en la secreción de toxinas; y *tcdC*, un regulador negativo de los genes del *PaLoc* (Flechas en rojo). Las toxinas A y B comparten una estructura de cuatro dominios, con el dominio glucosiltransferasa (GTD) siendo la porción activa. La proteína *tcdE* participa en la translocación de GTD al citoplasma, y el dominio receptor C-terminal se une a receptores celulares. Mutaciones en *tcdC*, como ganancia de parada o deleciones, resultan en una proteína TcdC truncada e ineficaz. Imagen modificada de Buddle & Fagan, 2023.

1.4.1.1 Subtipificación de las toxinas TcdA y TcdB en *C. difficile*

El estudio detallado de las secuencias de aminoácidos de las toxinas TcdA y TcdB en *C. difficile* ha revelado múltiples variantes con diferencias significativas en su estructura y conservación de aminoácidos, lo que afectan la funcionalidad de las toxinas (Mansfield *et al.*, 2020). Se han identificado 7 subtipos para TcdA y 12 subtipos para TcdB, siendo los tipos dominantes TcdB1-4 en los aislamientos epidémicos principales (**Figura 5**). Por ejemplo, subtipos como TcdB2, asociados con cepas epidémicas como RT027/ST01, exhiben mayor virulencia al adherirse eficientemente a células intestinales y evadir la respuesta inmune (Pan *et al.*, 2021). La identificación de subtipos de TcdB con diferencias del 5.03% en la secuencia de aminoácidos sugiere variaciones estructurales significativas, influyendo en aspectos clave como la unión a receptores celulares y la capacidad de glucosilación. Los subtipos TcdB1, TcdB2 y TcdB3, que muestran una mayor variabilidad, prevalencia y potencia en ensayos de inyección en ratones, podrían ser más virulentos y estar estrechamente asociados con enfermedades graves en humanos y animales (Shen *et al.*, 2020).

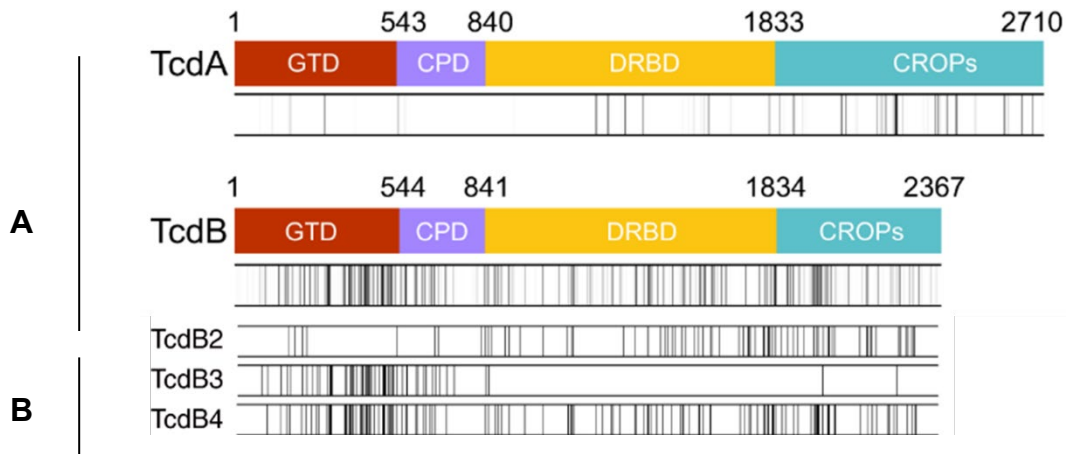


Figura 5. Diversidad de secuencias de aminoácidos de TcdA y TcdB.

- A) Se observa que en TcdA los residuos no conservados se encuentran principalmente en la región CROPs, mientras que en TcdB los residuos no conservados se dispersan en toda la secuencia. B) Variaciones de secuencia entre TcdB1 y los tipos dominantes TcdB1-4. Las líneas verticales en los gráficos representan las posiciones de los residuos de aminoácidos no conservados. Imagen modificada de Shen *et al.*, 2020.

1.4.2 Toxina binaria CDT

Algunas cepas de *C. difficile*, en particular la cepa hipervirulenta RT027/ST01, también expresan otra toxina, denominada toxina binaria o transferasa de *C. difficile* (CDT), que puede potenciar la virulencia y no está codificada en el locus *Paloc* (Gerding *et al.*, 2014). Esta toxina, está compuesta por dos proteínas *CdtA* y *CdtB*, ubicados dentro de una región de 6,2 kb designada como el locus *CDTloc* (Figura 6), además contiene el gen *cdtR* de regulación positiva de la producción de CDT (Carter *et al.*, 2007). Se ha observado que en ciertas cepas como RT027 el gen *cdtR* regula positivamente la producción de las toxinas TcdA y TcdB, esta regulación ocurre a nivel transcripcional, posiblemente a través de la regulación indirecta de TcdR, sin embargo, este efecto puede variar en cada cepa (Lyon *et al.*, 2016).

La proteína CdtA, es una ADP-ribosil transferasa que ribosila la actina de la membrana celular en células eucariotas, y CdtB, que forma poros en endosomas acidificados y facilita la transferencia de CdtA al citosol, lo que da como resultado protuberancias celulares formadas por microtúbulos y un mejor suministro de fibronectina a la superficie celular, lo que mejora la adhesión de *C. difficile* a los enterocitos/ o epitelio colónico (Schwan *et al.*, 2014; (Abt *et al.*, 2016).

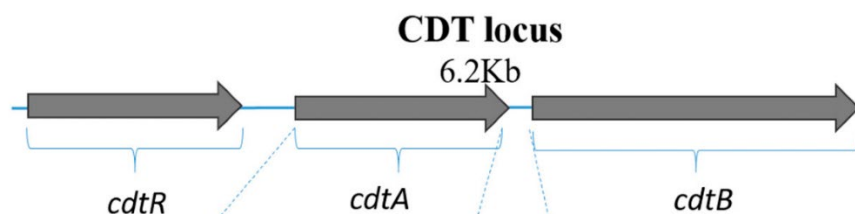


Figura 6. Representación del locus CDT y sus componentes
 Imagen modificada de Martínez-Meléndez *et al.*, 2022

1.5 Mecanismo de patogenicidad

C. difficile, como anaerobio estricto con competencia limitada por nutrientes, utiliza sus esporas como principal medio de transmisión, infección y persistencia en el colon, su nicho ecológico (**Figura 7**). Aunque las esporas son ubicuas, solo germinan, proliferan y producen toxinas tras la alteración de la microbiota intestinal principalmente por antibióticos de amplio espectro (Lital Meyer *et al.*, 2014). La germinación está condicionada por sales biliares primarias y ciertos aminoácidos, mientras que algunas sales, como el ácido quenodeoxicólico, actúan como inhibidores (Paredes-Sabja *et al.*, 2014). La terapia antimicrobiana, al cambiar la microbiota, aumenta los niveles de ácido cólico, favoreciendo la germinación en el colon, la colonización y liberación de toxinas. Este proceso, junto con la reducción de competidores microbianos, desencadena la ICD (Hernández-Rocha *et al.*, 2012).

Las toxinas TcdA y TcdB inactivan las proteínas de las células epiteliales del colon, provocando la deformación del citoesqueleto y la pérdida de la función de barrera epitelial. Como resultado, se activan respuestas inmunitarias que agravan la inflamación y la permeabilidad vascular (**Figura 7**) (Martínez-Meléndez, J.A., 2018). Las cepas productoras de toxinas CDT pueden incrementar su adherencia a las células epiteliales intestinales al inducir protuberancias de microtúbulos, mejorando así la adhesión de *C. difficile* a estas células (Abt *et al.*, 2016). Esta alteración en la integridad del epitelio promueve la liberación de citocinas proinflamatorias, facilitando el ingreso de neutrófilos al lumen intestinal, desempeñando un papel significativo en el proceso de formación de pseudomembranas. La infección resultante puede manifestarse en diarrea, colitis pseudomembranosa y megacolon tóxico, pudiendo llegar incluso a ser letal en casos graves. A pesar de los tratamientos con

antibióticos orales, la recolonización adecuada de la flora intestinal normal no se promueve, lo que conduce a casos recurrentes de infección por *C. difficile* en un porcentaje significativo de pacientes adultos (Shields *et al.*, 2015).

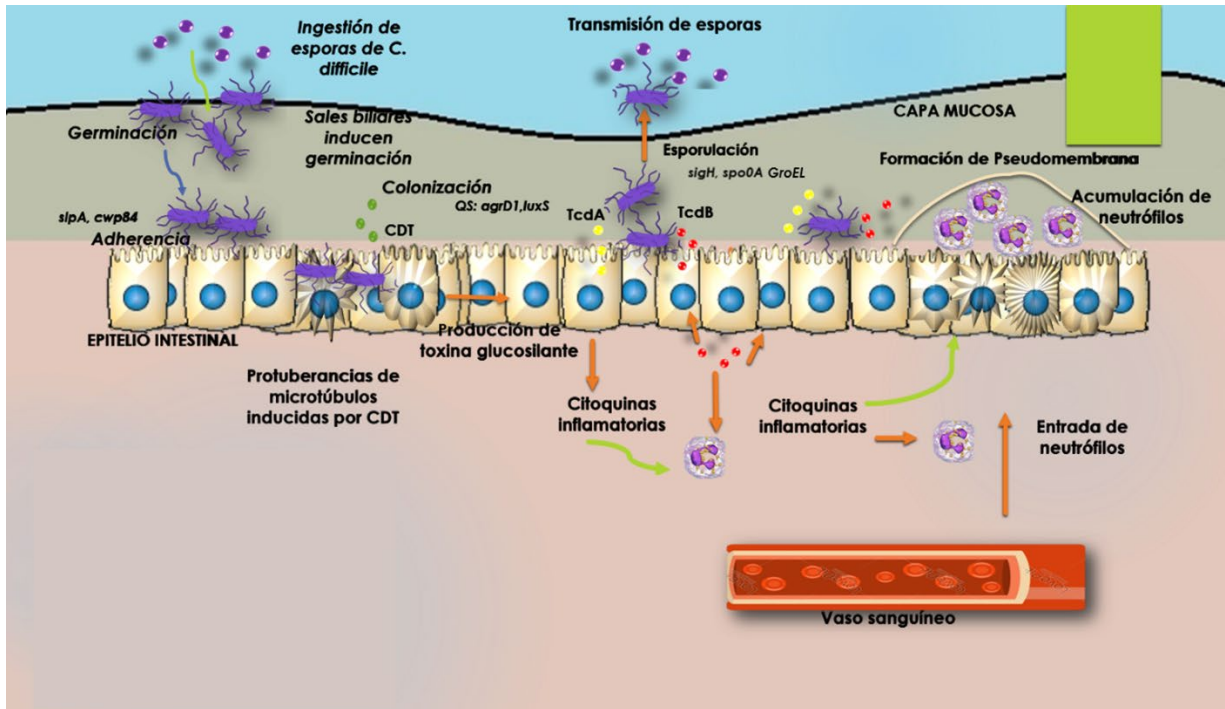


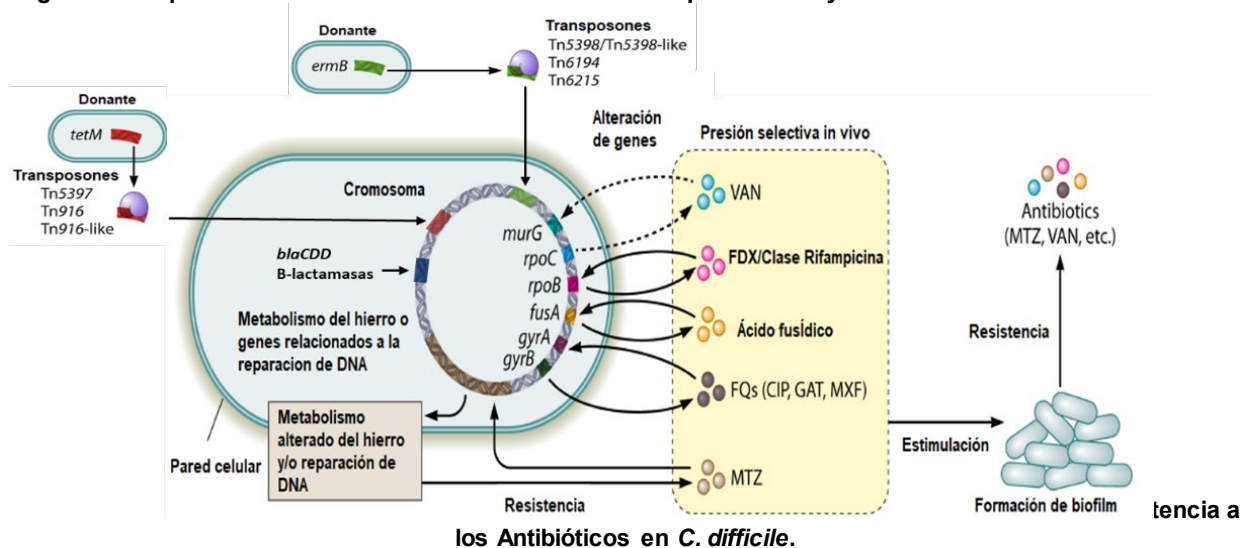
Figura 7. Patogénesis de *C. difficile*. Producción de Toxinas y formación de Pseudomembrana. Elaboración propia, basado en Shen, 2012; Abt *et al.*, 2016; Martínez-Melendez, J.A., 2018.

1.6 Mecanismos conocidos de resistencia antimicrobiana en *Clostridioides difficile*

La resistencia antimicrobiana en *C. difficile* involucra distintos mecanismos, estos incluyen la presencia de genes en su ADN cromosómico como β -lactamasas y proteínas de unión a la penicilina (Spigaglia, 2016). También se han identificado elementos genéticos móviles (EGM) como transposones y plásmidos, que facilitan la transferencia de genes de resistencia (Fig. 7). En estos se incluyen aquellos responsables de la metilación del ARN ribosómico 23S (*ermB*), proporcionando resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas B (MLSB), o transposones como *Tn5397* y *Tn916*, que transfieren genes como *tet(M)* y *tet(W)* que proporcionan resistencia a tetraciclinas (Dingle *et al.*, 2014). También se han observado

mutaciones puntuales como en *gyrA* que afecta de ADN girasa, implicadas en la resistencia a fluoroquinolonas, junto con cambios metabólicos relacionados con nitrorreductasas, captación de hierro y reparación del ADN. La presión selectiva *in vivo* induce alteraciones en los objetivos de los antibióticos y estimula la formación de biopelículas, confiriendo adaptabilidad ante los desafíos antimicrobianos (**Figura 8**) (Peng *et al.*, 2017).

Figura 8. Esquema Ilustrativo de los Factores Conocidos que Contribuyen al Desarrollo de la Resistencia a los Antibióticos en *C. difficile*.



Transferencias de EMG mediante conjugación, transducción y/o transformación (por ejemplo, transposones) o la ocurrencia natural de mutaciones génicas (por ejemplo, genes de β -lactamasa). La presión selectiva in vivo y la formación de biopelículas. FQs, fluoroquinolonas; GAT, gatifloxacino; MTZ, metronidazol; TET, tetraciclina; VAN, vancomicina; MXF: Fluoroquinolonas; TetM, proteína transportadora de tetraciclina; ermB: Gen de resistencia a macrólidos (Modificado de Peng *et al.*, 2017).

1.6.1 Resistencia a los principales antibióticos usados para tratar ICD

1.6.1.1 Vancomicina

La vancomicina es un glucopéptido de amplio uso en el tratamiento de infecciones causadas por patógenos Gram positivos, ejerce su acción en la biogénesis de la pared celular. Al unirse al terminal D-ala-D-ala, no solo impide el entrecruzamiento de cadenas peptídicas, sino que también inhibe la glucosiltransferasa, contribuyendo a su acción bactericida mediante la generación de estrés osmótico. Sin embargo, la resistencia a la vancomicina en *C. difficile* aun no se comprende completamente (Dureja *et al.*, 2022).

En *C. difficile*, los mecanismos de resistencia más detalladamente estudiados involucran alteraciones en el sitio diana mediadas por grupos o clústeres de genes *van*, que modifican el motivo terminal D-Ala-D-Ala del lípido II, donde la vancomicina se une para ejercer su mecanismo de acción. Estos genes de resistencia, bien caracterizados en *Enterococcus spp.*, también están presentes en *C. difficile* (Eubank *et al.*, 2022). Las modificaciones en el terminal D-Ala incluyen resistencia de alto nivel, codificada por los clusters *vanA* y *vanB*, y resistencia de bajo nivel causada por clústeres *vanC*, *vanE* y *vanG* (Dureja *et al.*, 2022).

Se ha identificado un clúster *vanG* críptico, lo que indica que este clúster no se manifiesta de manera evidente o activa en cepas de *C. difficile* sensibles a la vancomicina, específicamente *vanGCd*, presente en aproximadamente el 85% de las cepas de *C. difficile*, que no induce resistencia en cepas susceptibles, posiblemente debido a la preferencia de las células por precursores de peptidoglicano que terminan en el dipeptido D-Ala-D-Ala (Ammam *et al.*, 2013). La expresión de estos grupos está finamente controlada un sistema regulador de dos componentes, VanSR, compuesto por la cinasa de membrana VanS y el regulador de la respuesta citoplasmática VanR (Eubank *et al.*, 2022). VanS, al detectar la presencia de vancomicina, inicia la autofosforilación y transfiere su grupo fosforilo a VanR. El VanR fosforilado se une a la región promotora para inducir la transcripción de *vanG*, alterando el extremo del péptido D-Ala-D-Ala del peptidoglicano y reduciendo su afinidad por la vancomicina (Figura 9) (Depardieu *et al.*, 2015). Investigaciones recientes revelaron que mutaciones en los reguladores VanS (*Thr349Ile*, *Ser313Phe Gly319Asp*, *Arg314Leu*) y VanR (*Thr115Ala*) desencadenaron la expresión constitutiva de VanG, otorgando resistencia a la vancomicina en cepas de *C. difficile* RT027 (**Figura 10**) (W.-J. Shen *et al.*, 2020). Estos clústeres, como *vanA*, *vanB*, *vanG* y *vanW*, junto con ortólogos de *vanZ*, están asociados con mayores valores de Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de vancomicina en *C. difficile* (Woods *et al.*, 2018).

Se ha observado que los plásmidos pueden desempeñar un papel en la resistencia a la vancomicina, como la adquisición del plásmido pX18-498 que se ha observado que reduce la susceptibilidad a la vancomicina en *C. difficile* (**Figura 10**) (Dureja *et al.*, 2022). Este

plásmido tiene una estructura circular de ADN y contiene 51 ORFs (Open Reading Frames, por sus siglas en inglés), que son secuencias de codificación de proteínas o elementos funcionales. Uno de los elementos codifica una enzima llamada N-acetilmuramoil-L-alanina-amidasa. Esta enzima está implicada en la remodelación del peptidoglicano. La actividad de la N-acetilmuramoil-L-alanina-amidasa contribuye a alterar la estructura del peptidoglicano, lo que puede tener como consecuencia la disminución de la susceptibilidad de las cepas de *C. difficile* a la vancomicina. Además, estudios en ratones infectados con cepas de *C. difficile* que portan el plásmido pX18-498 han demostrado un fenotipo de enfermedad más severo cuando los ratones son tratados con vancomicina (Pu *et al.*, 2021).

También se ha documentado alteraciones en los aminoácidos de proteínas MurG asociadas a la biosíntesis del peptidoglicano, afectando la actividad de la vancomicina (**Figura 8**). Sin embargo, los mecanismos de resistencia a la vancomicina en *C. difficile* siguen siendo poco comprendidos, a pesar de la presencia de genes *van*, ortólogos y plásmidos (Woods *et al.*, 2018).

1.6.1.2 Metronidazol

El metronidazol de la clase de nitroimidazoles es un antimicrobiano que inhibe la síntesis de ADN después de su reducción parcial por ciertas bacterias anaeróbicas, lo que conduce a la citotoxicidad. A pesar de haber sido el tratamiento de elección para las ICD durante muchos años, ya no se recomienda según la IDSA (Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América) debido a tasas de curación inferiores tanto en casos iniciales como recurrentes en comparación con la vancomicina. Además, se ha relacionado el uso repetido o prolongado de metronidazol con neurotoxicidad (Johnson *et al.*, 2021).

Los mecanismos de resistencia al metronidazol en *C. difficile* aún están en proceso de comprensión, pero parecen ser procesos que involucran alteraciones en el metabolismo, como las nitrorreductasas, la captación de hierro, la reparación del ADN o la formación de biofilm (**Figura 8**). En otras especies bacterianas, los mecanismos de resistencia al metronidazol incluyen la reducción en las tasas de crecimiento y captación del fármaco,

efusión activa, la presencia de nitroimidazol reductasas codificadas por genes *nim*, modificaciones en las vías de piruvato-ferredoxina oxidoreductasas (pfo o PFOR) y rutas de respuesta al estrés, o mutaciones en genes como *hemN*, el regulador de captación de hierro ferrico (*fur*), mutaciones en las proteínas FeoB1 e IscR, que afectan su activación (**Figura 10**) (O'Grady *et al.*, 2021).

Uno de los aspectos más interesantes de la investigación sobre la resistencia al metronidazol en *C. difficile* es el plásmido pCD-METRO (**Figura 9**) Este plásmido de alto número de copias, que mide 7 kb, se ha encontrado en cepas resistentes al metronidazol y se ha dispersado internacionalmente en cepas toxigénicas y no toxigénicas (Boekhoud *et al.*, 2020). Aunque su mecanismo de resistencia no está completamente claro, el plásmido pCD-METRO contiene genes relacionados con la resistencia al metronidazol. Por ejemplo, contiene un pequeño pseudogen con similitud de proteínas a NimB de *Bacteroides fragilis*, aunque carece del dominio catalítico necesario para conferir resistencia en el laboratorio (O'Grady *et al.*, 2021). También alberga un gen de metalohidrasa/oxidoreductasa que aún no se ha caracterizado en detalle. Lo intrigante es que este plásmido persiste en cepas resistentes incluso en ausencia de metronidazol, lo que sugiere que otorga una ventaja de supervivencia a las cepas que lo albergan. Esto podría contribuir a la propagación de la resistencia y complicar su control (Smits *et al.*, 2022). Se ha observado que el contenido de guanina y citosina (GC%) del plásmido pCD-METRO (41.6%) no coincide con el estándar de *C. difficile* (28–30%). Esto indica que el plásmido podría haber sido adquirido mediante transferencia horizontal de genes de otro organismo no identificado. El origen preciso del plásmido pCD-METRO sigue siendo objeto de investigación (Boekhoud *et al.*, 2020).

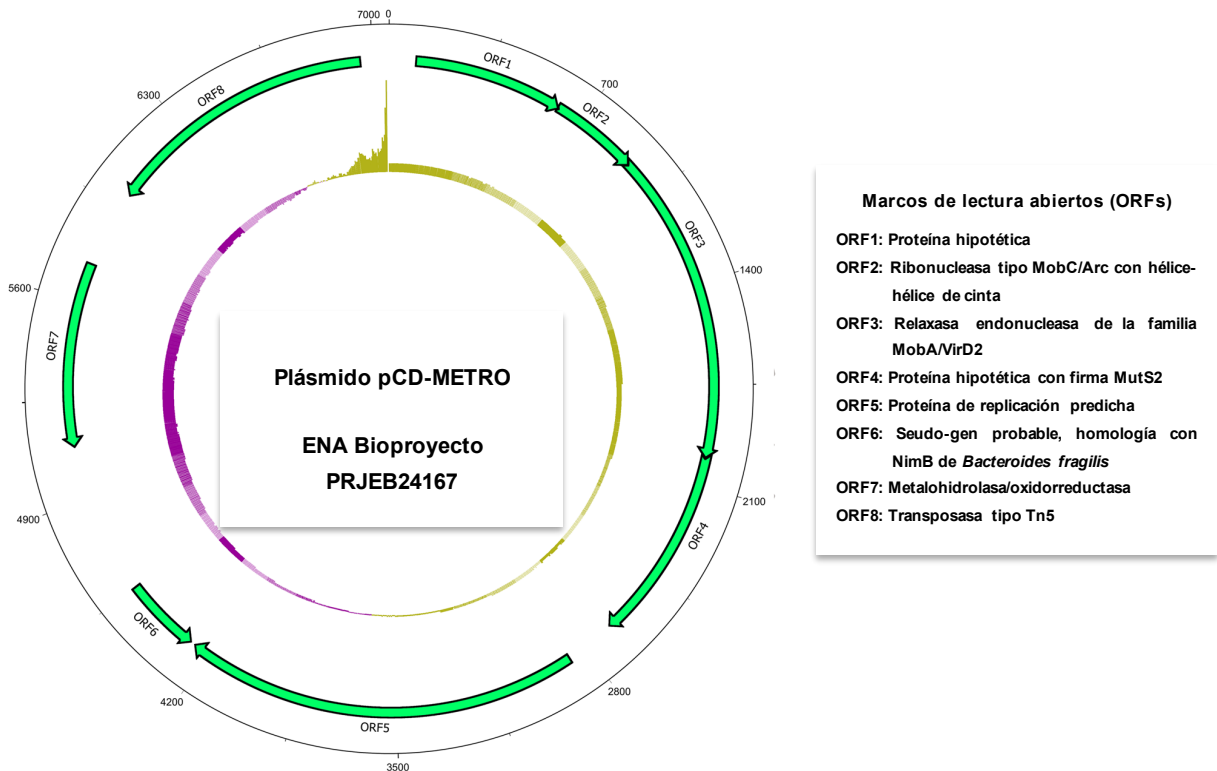


Figura 9. Representación del plásmido de resistencia al metronidazol pCD-METRO.

El plásmido pCD-METRO muestra posibles marcos de lectura abierta (ORFs) en verde en el círculo exterior, y los productos génicos se enumeran al lado. El círculo interior representa el contenido de GC, con valores por encima del promedio en amarillo y por debajo del promedio en morado. Imagen modificada de Boekhoud *et al.*, 2020

1.6.1.3 Fidaxomicina

La fidaxomicina es un antibiótico de espectro reducido perteneciente a la clase de los macrólidos, ejerce su acción al inhibir la síntesis de ARN al interferir con la formación del complejo de polimerasa de ADN-ARN antes de que pueda iniciar la transcripción. Su efecto se centra en la ARN polimerasa de *C. difficile*, que es inhibida por la fidaxomicina; dicha enzima posee un residuo específico (lisina 84) al cual la fidaxomicina se une, actuando como un sensibilizador crucial que posibilita la actividad bactericida de este antibiótico (Giacobbe *et al.*, 2022).

Este residuo específico está ausente en las bacterias comunes de la microbiota intestinal, como aquellas pertenecientes a los filos *Bacteroides* y *Proteobacteria*. Al bloquear esta enzima esencial para la síntesis de ARN, la fidaxomicina interrumpe la replicación celular e

inhibe la expresión de genes de esporulación (*spolIID* y *spolIR*) en *C. difficile* (Babakhani *et al.*, 2012). Esto la convierte en una opción atractiva debido a su capacidad para dirigirse específicamente a *C. difficile*, con efectos mínimos en otros componentes del microbioma intestinal y tasas similares de curación inicial en comparación con vancomicina (Dureja *et al.*, 2022). Sin embargo, la resistencia a fidaxomicina ha sido documentada, aunque se considera una ocurrencia rara en comparación con otros antibióticos. Las mutaciones en las subunidades RpoB y RpoC de la ARN polimerasa son las principales responsables de la resistencia a fidaxomicina en *C. difficile* (Figura 10) Buddle & Fagan, 2023.

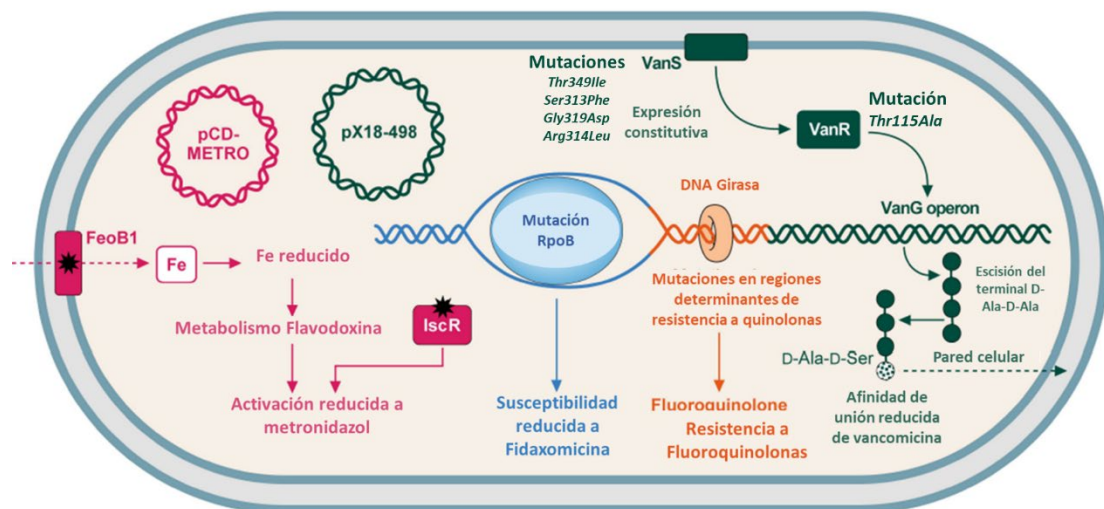


Figura 10. Mecanismos de resistencia de *C. difficile* frente a los principales antibióticos utilizados en el tratamiento de la ICD.

Estos mecanismos incluyen la adquisición de resistencia mediante plásmidos y mutaciones en proteínas clave. Imagen modificada de Buddle & Fagan, 2023.

1.7 Genómica Comparativa en *C. difficile*

La genómica comparativa se ha convertido en una herramienta invaluable en la investigación científica y la epidemiología molecular, y su aplicación en el estudio de *C. difficile* no es una excepción. En esta sección, se explorarán en detalle los fundamentos y la relevancia de la genómica comparativa en el contexto de *C. difficile*, destacando cómo este enfoque ha revolucionado nuestra comprensión de la diversidad genómica, la evolución y la distribución global de las cepas de esta bacteria patógena.

1.7.1 Fundamentos de la Genómica Comparativa

La genómica comparativa se basa en la comparación de secuencias genómicas completas o parciales entre diferentes cepas o especies. En el caso de *C. difficile*, este enfoque implica realizar la secuenciación del genoma completo (WGS), analizar los genomas de múltiples cepas y comparar sus características genéticas. Esto se ha vuelto más accesible gracias al rápido avance de las tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS), permitiendo la lectura simultánea de millones a miles de millones de secuencias de ADN, lo que ha impulsado estudios sobre microbiota, microbioma y metagenoma de manera rápida (Kobras *et al.*, 2021). Estas tecnologías permiten la creación de genomas bacterianos, cuyas secuencias pueden ser almacenadas en bases de datos públicas como NCBI (National Center for Biotechnology Information), Enterobase, el cual permite analizar y visualizar la variación genómica dentro de las bacterias entéricas. (Quainoo *et al.*, 2017).

En el proceso de secuenciación masiva, se realizan cuatro etapas principales (**Figura 11**): extracción de ADN, preparación de bibliotecas, secuenciación y análisis bioinformático. Las herramientas bioinformáticas desempeñan un papel crucial en este proceso, desde el control de calidad de las secuencias hasta el ensamblaje y análisis de variantes genéticas. La bioinformática también permite identificar genes de interés, realizar la anotación del genoma y construir dendrogramas para comparar aislados y comprender las relaciones genéticas (Hernández *et al.*, 2020).

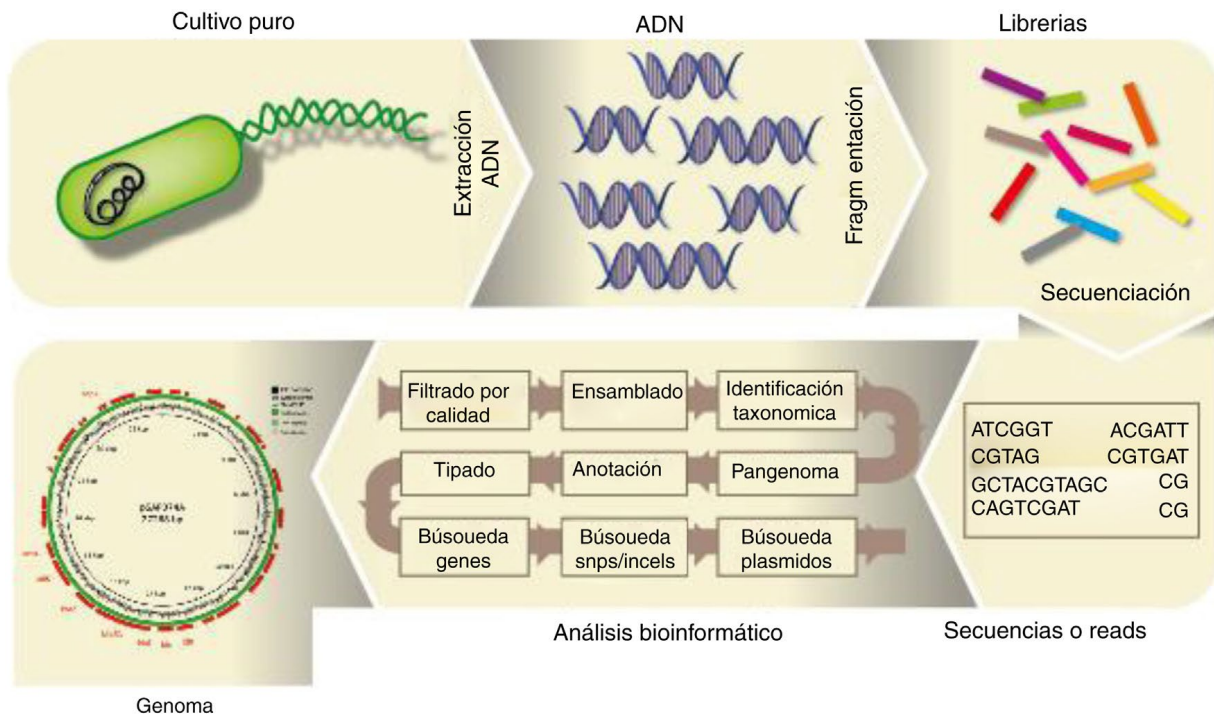


Figura 11. Diagrama del proceso analítico para examinar el genoma bacteriano
 Imagen adaptada de Hernández *et al.*, 2020.

1.7.2 Metodologías de la Genómica Comparativa en *C. difficile*

El estudio de *C. difficile* a nivel genómico mediante genómica comparativa se ha vuelto esencial en la investigación epidemiológica y la caracterización de esta bacteria patógena, que se encuentra cada vez más en entornos hospitalarios y comunitarios, así como en reservorios no humanos. Las metodologías de genómica comparativa proporcionan una comprensión detallada de la epidemiología y la transmisión de *C. difficile*, y permiten identificar las similitudes y diferencias genéticas entre las cepas. En este contexto, se utilizan distintos enfoques principales: el análisis de polimorfismos de nucleótido único (SNP), métodos basados en la comparación MLST del genoma central (cgMLST) o MLST de genoma completo, (wgMLST) (**Figura 12**), análisis basado en el pangenoma (Janezic & Rupnik, 2019)

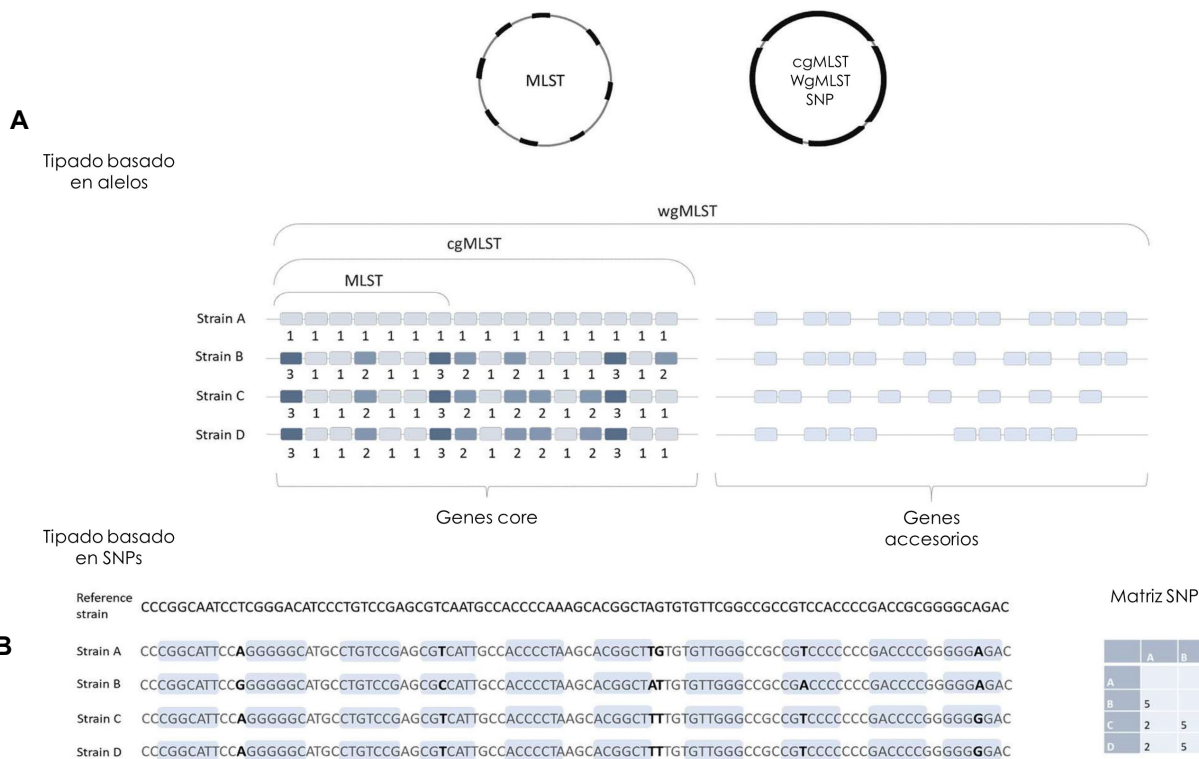


Figura 12. Comparación entre enfoques de tipificación basados en alelos y SNPs.

A) Mientras que MLST se basa en solo siete genes de referencia y puede identificar cepas idénticas en estos genes, los enfoques cgMLST y wgMLST analizan múltiples loci en todo el genoma, lo que permite una mayor resolución. B) En el enfoque de SNP, se alinean secuencias cortas con un genoma de referencia para identificar diferencias en regiones codificantes y no codificantes, proporcionando información sobre el número de diferencias de SNP entre pares de aislados (Imagen modificada de Janezic & Rupnik, 2019).

1.7.2.1 Comparación mediante cgMLST

El enfoque de comparación de genes a nivel genómico, conocido como cgMLST (MLST del genoma central), se basa en el mismo principio que la MLST clásica, pero con una ampliación significativa. Mientras que la MLST tradicional analiza un conjunto limitado de siete genes constitutivos para asignar perfiles alélicos para distinguir cepas, cgMLST amplía la comparación a múltiples locus en todo el genoma central (**Figura 12**) (Janezic & Rupnik, 2019).

La implementación de cgMLST en *C. difficile* sigue un enfoque que utiliza un conjunto específico de genes dentro de un esquema de MLST de genoma completo (wgMLST), el cual se define a partir de la construcción del pangenoma de *C. difficile*. Este pangenoma

representa todos los ortólogos de copia única dentro de un conjunto representativo de aislados bacterianos. A partir de esto se selecciona un subconjunto específico de genes que formarán parte del genoma central para el esquema de cgMLST. Este subconjunto de genes varía dependiendo del esquema de tipificación que se utilice, en el esquema de tipificación cgMLST de la plataforma ENTEROBASE (<https://enterobase.warwick.ac.uk/species/index/clostridium>) se utilizan 2556 genes centrales, que se eligen según ciertos criterios, como su presencia en una proporción específica del conjunto de referencia, su integridad y su falta de excesiva divergencia (Frentrup *et al.*, 2020). El cgMLST utiliza perfiles alélicos de estos genes centrales para asignar un secuenciotipo del genoma central (cgST) a cada cepa. El cgST es un código numérico que representa subtipos o variantes de alelos del genoma central, facilitando comparaciones precisas entre cepas, incluso aquellas con el mismo ST. Esta metodología se revela como una herramienta valiosa para estudios epidemiológicos, investigaciones de transmisión, análisis filogenéticos y para comprender la diversidad genética de *C. difficile* (Quainoo *et al.*, 2017; Janezic & Rupnik, 2019).

1.7.2.2 Análisis del Pangenoma

El análisis del Pangenoma es un enfoque bioinformático que implica la recopilación y comparación de secuencias genómicas de múltiples cepas de *C. difficile*, las cuales son anotadas para identificar genes y características genéticas específicas, como genes de virulencia o resistencia a antibióticos. Luego, se comparan estas secuencias para determinar los genes compartidos (genoma central) y los genes específicos de ciertas cepas (genoma accesorio), estos últimos se dividen en categorías descritas en la **Tabla 3** (Page *et al.*, 2015).

Además, se evalúa la estabilidad del pangenoma al agregar nuevas secuencias genómicas para determinar si el pangenoma es "abierto", es decir, si sigue aumentando con nuevas cepas, o "cerrado", indicando una relativa estabilidad en la diversidad genética. Estos análisis proporcionan información crucial sobre la diversidad genética, la evolución y la adaptación de la especie bacteriana estudiada, lo que es esencial para comprender su patogenicidad y

para el desarrollo de estrategias terapéuticas y preventivas más precisas y efectivas (Chordia Golchha *et al.*, 2022)

Tabla 3. Descripción de las categorías de los genes accesorios dentro del pan genoma
Basado en Page *et al.*, 2015

Categoría	Descripción
Genes centrales (Core)	Presentes en el 100% de los genomas
Genes del núcleo blando (Soft core)	Se encuentran en el 95% al 99% de los genomas analizados
Genes periféricos (Shell)	Se observan en el 15% al 95% de los genomas
Genes del núcleo blando (Soft core)	Presentes en el 1% al 15% de los genomas analizados.

1.8 Distribución global de *C. difficile*: Epidemiología molecular en un contexto internacional

La epidemiología molecular de *C. difficile* es de suma importancia en el ámbito internacional debido a su papel como causa principal de la diarrea asociada a antibióticos en seres humanos. A nivel global, la investigación ha estado históricamente concentrada en regiones como el Reino Unido, América del Norte y Australia, donde se han identificado diversas cepas y se ha estudiado su evolución molecular a lo largo del tiempo (Elliott *et al.*, 2017).

En particular en 2021 un estudio global realizado por Zhao *et al.* evaluó la distribución geográfica de los clados y ribotipos de *C. difficile* en todo el mundo, revelando patrones notables. Se han identificado cinco clados y se ha analizado su presencia en diferentes continentes. El clado 1, el más diverso, se ha encontrado en todos los países/regiones y predominó en Oceanía y Asia. Los clados 2 y 5, representados por ribotipos RT027 y RT078, fueron más comunes en América del Norte y Europa, respectivamente. En los Estados Unidos, clado 2 fue más común en las costas este y oeste, mientras que clado 1 prevaleció en el interior. El clado 3 se encontró principalmente en Europa, y el clado 4 predominó en

Asia (Figura 13) (Zhao *et al.*, 2021).

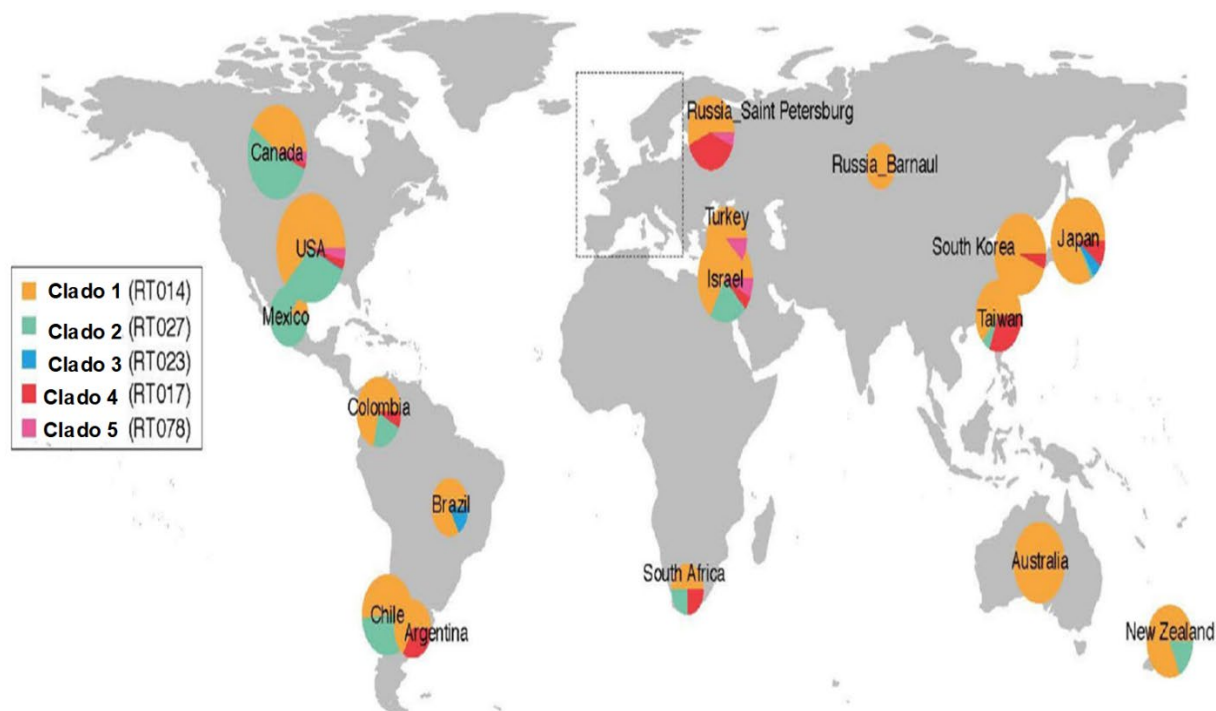


Figura 13. Distribución geográfica de los ribotipos y clados comunes de *C. difficile* alrededor del mundo. Obtenido de Zhao *et al.* 2021

En el contexto de América Latina, y específicamente en México, la investigación sobre la epidemiología molecular de *C. difficile* ha comenzado a cobrar relevancia. Un estudio realizado por Aguilar-Zamora y colaboradores, en siete hospitales de la Ciudad de México entre 2014 y 2018 examinó 94 aislamientos de *C. difficile* utilizando WGS. Los resultados revelaron una diversidad de cepas con 20 ST, principalmente del clado 2 y clado 1. El ST01 fue predominante tanto en adultos como en niños (Aguilar-Zamora *et al.*, 2022).

2. ANTECEDENTES ESPECIFICOS

Tabla 4. Descripción de antecedentes específicos sobre *C. difficile* relevantes para este estudio

Estudio y Año	Descripción del Estudio
Camacho <i>et al.</i> , 2009 y 2015 (México)	- Métodos: Estudio del brote en un hospital de la Ciudad de México. Identificación de cepa NAP1/ribotipo 027/ST01. Análisis filogenético comparativo de cepas en México y Latinoamérica.

	<p>Resultados: Detección del brote en 2005 con aumento significativo en la incidencia. Identificación de cepa NAP1/ribotipo 027/ST01 en México y otros países latinoamericanos. Presencia de genes de resistencia a antibióticos en cepas de Chile, Honduras y México.</p>
Ramírez-Vargas et al., 2017 (Costa Rica)	<p>- Métodos: Estudio del linaje endémico de <i>C. difficile</i> (NAPCR1 / RT012 / ST54) en hospitales de Costa Rica. Análisis genómico para identificar mutaciones y elementos genéticos móviles.</p> <p>Resultados: Identificación de SNPs asociados a resistencia en genes como <i>gyrA</i> y <i>rpoB</i>. Presencia de 8-9 genes de resistencia antimicrobiana adquirida (AMR) en los aislamientos. Genes AMR ubicados en elementos genéticos móviles indicaron capacidad para adquirir genes AMR.</p>
Gómez Rivera et al., 2019 (México)	<p>- Métodos: Detección de <i>C. difficile</i> en muestras de heces de pacientes de tres hospitales mexicanos. Análisis del gen <i>tpi</i> y genes de toxinas.</p> <p>Resultados: Aislamiento de <i>C. difficile</i> en 23 de 44 muestras. Identificación del genotipo A+B+ en la mayoría. Presencia de toxinas A+B+CDT+ en dos muestras.</p>
Guerrero-Araya et al., Latinoamérica, 2020	<p>- Métodos: Comparación de secuencias WGS de 25 aislamientos clínicos de <i>C. difficile</i> en Costa Rica, Chile, Honduras y México. Filogenética bayesiana y análisis de SNP.</p> <p>Resultados: Introducciones independientes de cepas B1/NAP1/RT027/ST01 desde linajes FQR1 y FQR2 en Latinoamérica. Mutaciones distintas y genes de resistencia a antibióticos en cepas latinoamericanas. Presencia de genes similares a <i>cfr</i> y <i>tetM</i> en elementos genéticos móviles putativos.</p>
Velázquez Romero et al., 2021 (México)	<p>- Métodos: Investigación de portadores asintomáticos en Puebla y Tehuacán. Cultivo anaeróbico y pruebas de PCR para genes de toxinas.</p> <p>Resultados: 16% (n=6) de las muestras fueron positivas para el gen <i>tpi</i> de las 38 muestras que resultaron positivas en el cultivo. Dos cepas toxigénicas identificadas (una amplificó <i>tcdA</i> y otra <i>cdtA</i>). Presencia de <i>C. difficile</i> no toxigénico en otras muestras.</p>
Ahn et al., 2021 (Corea)	<p>- Métodos: Aislamiento de 9 cepas de <i>C. difficile</i> de pacientes con infección por <i>C. difficile</i> (ICD) en el Hospital Universitario Nacional de Corea. Secuenciación completa del genoma y análisis filogenético basado en 16S rRNA y MLST. Comparación con 51 cepas de referencia.</p> <p>Resultados: Todas las cepas (60 en total) pertenecían al género <i>Clostridioides</i>. Se dividieron en cinco grupos</p>

	<p>filogenéticos distintos. Se identificó resistencia a clindamicina en todas las cepas, con variabilidad en otros genes de resistencia. Se destacaron seis cepas del tipo de secuencia 17 con características genómicas únicas para genes de toxina y resistencia a antibióticos.</p>
Aguilar-Zamora et al., 2022 (México)	<p>- Métodos: Investigación de 94 aislados de <i>C. difficile</i> de siete hospitales en Ciudad de México (2014-2018). Secuenciación WGS y correlación genotipo-fenotipo.</p> <p>Resultados: Identificación de 20 tipos de secuencia diferentes (ST). Cepas predominantemente toxigénicas (87.2%) principalmente del clado 2 y clado 1. El ST01 fue predominante tanto en adultos como en niños y resistentes a varios antibióticos, como linezolid y clindamicina. Correlación entre mutaciones en <i>rpoB</i>, <i>rpoC</i> y <i>fusA</i> y resistencia a antibióticos. Presencia del gen <i>cfrE</i> en cepas resistentes a linezolid.</p>

3. JUSTIFICACIÓN

La ICD se ha convertido en uno de los principales patógenos causantes de infecciones nosocomiales en países desarrollados. Sin embargo, no se han explorado los determinantes genotípicos de virulencia y resistencia de la ICD en México, y particularmente en el estado de Puebla. Por lo tanto, este estudio pretende analizar las características genómicas, filogenéticas, funcionales y patogénicas de cepas que ya se tienen caracterizadas de *C. difficile* aisladas de pacientes mexicanos, además de seguir recolectando más cepas provenientes de pacientes sintomáticos y asintomáticos, y así realizar un análisis genómico comparativo con otras cepas aisladas de varios países Junto con las características genómicas identificadas de los aislados de *C. difficile* de México. La acumulación de más información de la secuencia del genoma completo de diversas cepas de *C. difficile* podría servir como información básica para la prevención y el tratamiento de la ICD en México.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Realizar la comparación genómica entre genomas de *C. difficile* aislados de pacientes mexicanos y de genomas reportados en otras partes del mundo.

4.2 Objetivos específicos

1. Ampliar la identificación y aislamiento de cepas de *C. difficile* en pacientes sintomáticos
2. Caracterizar la susceptibilidad fenotípica a distintos grupos de antibióticos en cepas de *C. difficile* recolectadas durante el actual estudio como del banco de cepas existente del periodo 2019-2020.
3. Investigar por PCR la presencia de los genes *tpi*, *tcdA* y *tcdB* y toxinas CDT en las cepas aisladas, durante la investigación actual y en aquellas recopiladas en el banco de cepas existente entre 2019 y 2020.
4. Seleccionar cepas toxigénicas y no toxigénicas para la secuenciación de genoma completo
5. Realizar un análisis *in silico* del resistoma y viruloma mediante las secuencias de genoma completo de aislados obtenidos en el presente estudio.
6. Realizar estudio de genómica comparativa con las secuencias de cepas aisladas en este estudio, con cepas reportadas en bases de datos aisladas en otras partes del mundo.

5. MATERIALES Y METODOS

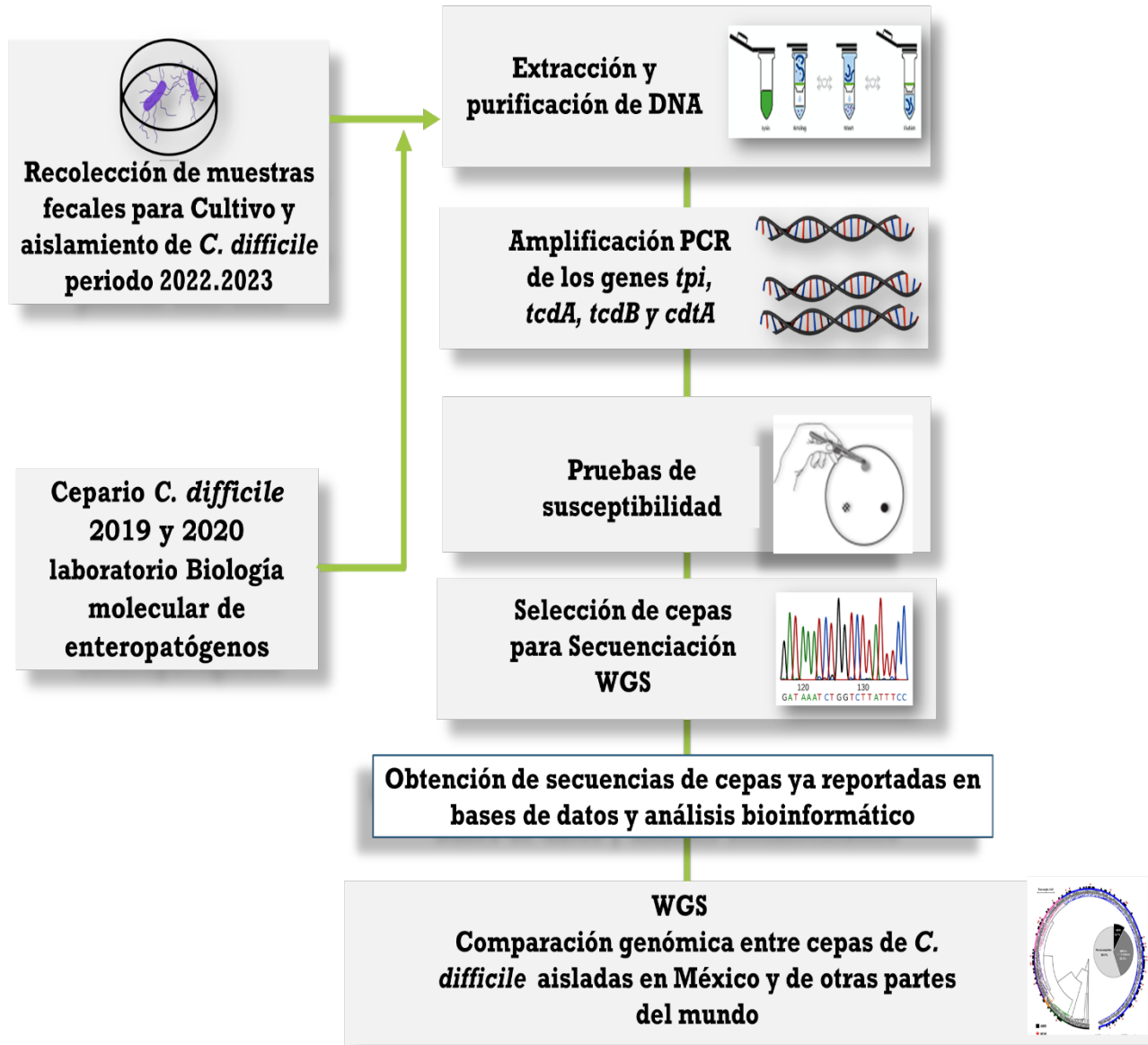


Figura 14. Esquema general de trabajo

5.1 Estudio experimental

5.1.1 Muestreo y consideraciones clínicas

Durante el periodo comprendido entre junio de 2022 y enero de 2023, se llevó a cabo la recolección de un total de 93 muestras fecales de pacientes provenientes del Hospital particular MAC Puebla. Este proceso formó parte de un estudio retrospectivo, descriptivo y observacional en el cual se incluyeron a todas las muestras de pacientes que fueron referenciados al laboratorio clínico del hospital, incluyendo casos de diarrea con o sin solicitud de la prueba inmunoenzimática para la detección de las Toxinas A y B de *C. difficile*.

Se presentó una solicitud formal de autorización para la recolección y utilización de muestras biológicas para el presente proyecto de investigación. Esta solicitud fue dirigida al director médico y al jefe de enseñanza del hospital, quienes brindaron su aprobación para llevar a cabo el estudio. El documento oficial de aprobación se encuentra adjunto en el **Anexo A** para su referencia. Es relevante destacar que, en este proceso, no se solicitó directamente el consentimiento informado a los pacientes, ya que no se llevaron a cabo intervenciones clínicas adicionales. La autorización obtenida respeta los protocolos éticos y legales necesarios para la recolección y uso de muestras biológicas en el ámbito de la investigación, garantizando la integridad y privacidad de los participantes.

Los criterios de inclusión, exclusión y eliminación aplicados en esta fase del estudio se detallan a continuación:

Criterios de Inclusión:

Todas las muestras fecales que llegaron al laboratorio clínico del Hospital se incluyeron en esta investigación. Esta decisión se basó en la premisa de que las muestras ya no eran necesarias para los fines clínicos después de que el personal del laboratorio había completado las pruebas de laboratorio pertinentes. Por lo tanto, se consideró esencial incluir todas las muestras disponibles para representar integralmente el conjunto de datos del estudio.

Criterios de Exclusión:

No se aplicaron criterios estrictos de exclusión en este contexto debido a las características específicas de la recolección de muestras retrospectivas. Sin embargo, se evaluaron las muestras en busca de posibles problemas, como la falta de información de identificación del paciente o signos de deterioro o contaminación. Estas evaluaciones se llevaron a cabo para garantizar la calidad de los datos y la confiabilidad de los resultados.

Criterios de Eliminación:

Las muestras fecales se recolectaron después de la finalización de las pruebas de laboratorio clínico, no fue necesario eliminar muestras específicas del conjunto de datos.

Es importante destacar que se protegió rigurosamente la confidencialidad de los pacientes en todo momento, y se siguieron todas las regulaciones éticas y legales aplicables en relación con la recopilación y el uso de las muestras. Las muestras fueron recolectadas en recipientes herméticos y etiquetados con el nombre del donante. A cada muestra se le otorgó un código de identificación. Luego, se almacenaron en un ultracongelador a una temperatura de -80°C para su conservación, hasta su procesamiento.

Durante todo el proceso de recolección y almacenamiento, se rigió por las pautas establecidas para la gestión de residuos biológico-infecciosos peligrosos, conforme a lo dispuesto en la normativa NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002. Estas directrices aseguran el manejo adecuado y la disposición final responsable de las muestras, en línea con los estándares medioambientales y sanitarios establecidos. Cabe destacar que el Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas (CICM) de la BUAP, cuenta con la autorización para el manejo y desecho de muestras biológicas bajo la autorización SEMARNAT NRA: UAP2111400417.

Se recolectaron datos demográficos, incluyendo edad y sexo, así como información pertinente sobre el servicio médico de ingreso y la fecha de admisión. Estos detalles fueron registrados en una bitácora de recolección de datos, cuyo formato se describe detalladamente en el **Anexo B**.

5.1.2 Aislamiento

Para el cultivo y aislamiento de *C. difficile*, se siguió el protocolo detallado por Roberts & Mullany 2016, con algunas modificaciones específicas para nuestras muestras, el proceso de cultivo y aislamiento se detalla en el **Anexo C**. En la **Figura 15** se resume el protocolo de cultivo y aislamiento de cepas de *C. difficile*.

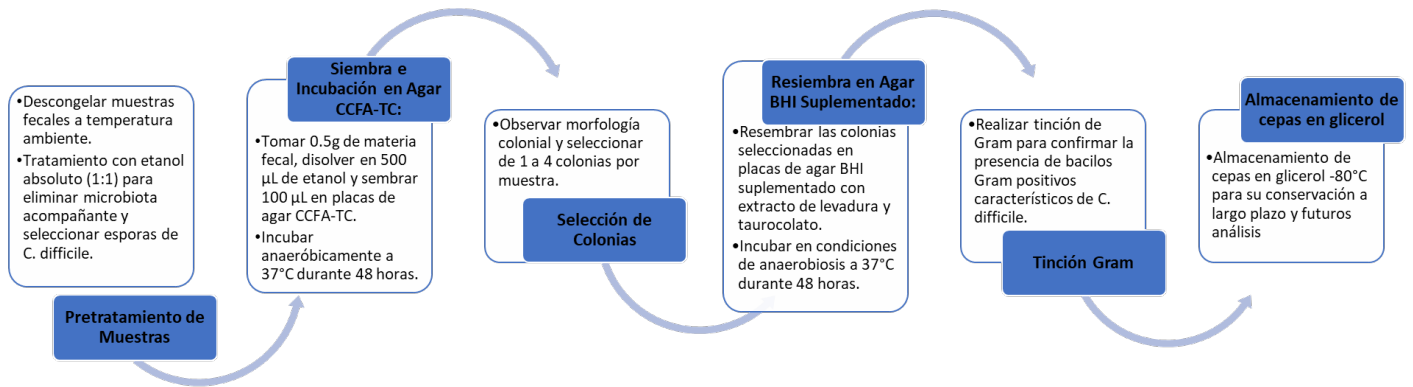


Figura 15. Esquema general del protocolo de cultivo y aislamiento de cepas de *C. difficile*

5.1.3 Identificación de aislamientos

5.1.3.1 Extracción genómica de los aislamientos y detección de genes específicos (*tpi*, *tcdA*, *tcdB*, *cdtA*, *cdtB*) mediante PCR

El protocolo de extracción de ADN utilizado en esta investigación se realizó mediante fenol-cloroformo, basado en la metodología descrita por Andreou en 2013 con algunas modificaciones. La confirmación de cepas de *C. difficile* se llevó a cabo mediante la detección del gen *tpi* utilizando la técnica de PCR en punto final, siguiendo los procedimientos y condiciones previamente establecidos por Lemee y Dhalluin *et al.* en 2004. Se utilizó la cepa de referencia R20291 como control positivo. La detección de los genes de toxinas *tcdA*, *tcdB*, *cdtA* y *cdtB* se llevó a cabo mediante cuatro reacciones de PCR separadas, cada una empleando sus respectivos oligonucleótidos. El protocolo de extracción, las condiciones de amplificación de PCR para los genes específicos y los oligonucleótidos utilizados se detallan en el **Anexo D**. En la **Figura 16** se resume protocolo de extracción genómica y detección de

genes específicos.

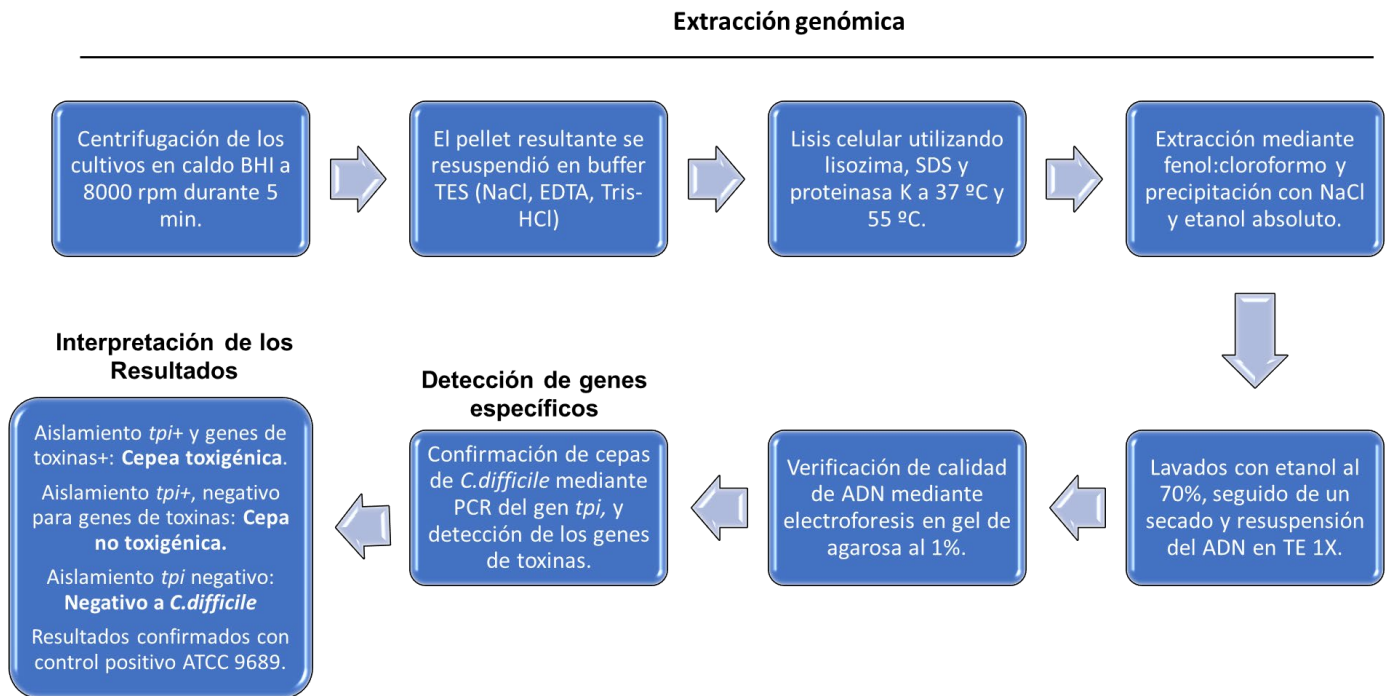


Figura 16. Esquema general del protocolo de extracción genómica y detección de genes específicos mediante PCR.

5.1.4 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana

Se llevó a cabo una evaluación de la susceptibilidad antimicrobiana por concentración mínima inhibitoria (CMI) de 16 cepas de *C. difficile* aisladas en el presente estudio, junto con 22 cepas que se tenían resguardadas en el cepario del laboratorio de biología molecular de enteropatógenos (LBME) provenientes de los estudios realizados por Gómez Rivera en 2019 y Velázquez Romero en 2021.

Se probó la susceptibilidad en una cepa de referencia de *C. difficile* R20291 con CMI conocidas de acuerdo con lo reportado por Stabler *et al.*, 2009. Aunque no se encontraron CMI para cefotaxima en la cepa R20291, se tomó como referencia la CMI para cefalosporinas de acuerdo con lo reportado por Gargis *et al.*, 2023. Esta cepa R20291 se utilizó como control interno (**Tabla 6**).

La determinación del perfil de susceptibilidad se realizó mediante el método de dilución en agar y por epsilometria con pruebas ETEST de la marca BioMérieux, este último se aplicó específicamente para evaluar la susceptibilidad a la vancomicina y se realizó en 25 de las cepas estudiadas. Se siguieron los protocolos de susceptibilidad establecidos por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI), tal como se especifica en el manual para microorganismos anaerobios M11-9ed 2023. Se probó la susceptibilidad a vancomicina y metronidazol siendo los antibióticos considerados de primera línea para el tratamiento de ICD. También se probó la susceptibilidad a cefotaxima, eritromicina, cloranfenicol y tetraciclina considerados como antibióticos que pueden facilitar el desarrollo de la ICD. Los valores de corte CMI para vancomicina, metronidazol, cefotaxima y cloranfenicol se basaron en las tablas 2J-M11 del CLSI M100-Ed33 2023. Sin embargo, dado que no existen valores de corte definidos por el CLSI ni el EUCAST para eritromicina y tetraciclina, se tomaron como referencia los informes de Valiente *et al.*, 2012 y Mutai *et al.*, 2021 (**Tabla 5**). Los protocolos de dilución en agar y ETEST se detallan en el **Anexo E**.

Tabla 5. Valores de corte de CMI de los antibióticos usados para las pruebas de susceptibilidad

	CMI µg/mL			Referencia
	S	I	R	
VAN	-	-	≥4	CLSI 2021
MTZ	≤8	16	≥32	CLSI 2021
CTX	-	-	≥32	CLSI 2021
ERY	-	-	≥8	Mutai et al., 2021
CHL	≤8	16	≥32	CLSI 2021
TET	-	-	≥32	Valiente et al., 2012

VAN: Vancomicina, MTZ: Metronidazol, CTX: Cefotaxima, ERY: Eritromicina, CHL: Cloranfenicol, TET: Tetraciclina

Tabla 6. Perfil de susceptibilidad de la cepa de referencia R20291

<i>C. difficile</i> R20291		
CMI	Interpretación	Referencia
0.93	S	Stabler et al., 2009
0.9	S	Stabler et al., 2009
64	R	Gargis et al., 2023
≥ 256	R	Stabler et al., 2009
16	I	Stabler et al., 2009
0.22	S	Stabler et al., 2009

S: Sensible; R: Resistente; I: Intermedio

5.1.5 Secuenciación del genoma completo (WGS)

Posterior a la extracción genómica por fenol-cloroformo descrito en la sección anterior, se cuantificó la cantidad de ADN genómico extraído mediante Nanodrop, se ajustó la concentración a 300 ng, asegurando así que se cumplieran los requisitos de pureza para la secuenciación descritos en la **Tabla 6**. Se logro realizar la secuenciación completa del genoma (WGS) de 9 aislados de *C. difficile*. La secuenciación se llevó a cabo en colaboración con el grupo de investigación de la Dra. Corina-Diana Ceapă, en el Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), en conjunto con el servicio de secuenciación Analitek/Illumina, Mexico. Además, algunas cepas fueron enviadas al servicio de secuenciación SeqCenter en Pittsburgh, Estados Unidos.

Tabla 7. Valores indicativos de pureza en muestras de ADN

Basado en Departamento de control de calidad del Banco Nacional de ADN Carlos III 2020; SeqCenter Illumina DNA sequencing 2022.

Técnica de análisis	Análisis	Parametros	Criterios de validez
	A260/280	Pureza	≥1.8-2.1 Pureza óptima ≥1.6-1.7 Pureza aceptable <1.6 ADN contaminado con compuestos aromaticos
Espectrofotometría			>2.1 ADN contaminado con ARN
	A260/230	Pureza	>2-2.2 Pureza optima* >1.8 Pureza aceptable* <1.8 ADN contaminado con sales, fenol, hidratos de carbono

<1.5 ADN altamente contaminado con sales, fenol, hidratos de carbono
--

* Estas ratios solo tendrán validez con concentraciones altas de ADN (aprox > 50ng/ul)

Para la selección de las cepas de *C. difficile*, se tomaron en consideración las características genotípicas relacionadas con la expresión de los genes de las toxinas, los cuales habían sido previamente identificados mediante PCR, así como los datos clínicos asociados a los pacientes. Se incluyeron cepas del presente estudio, así como cepas de los estudios realizados por Gómez Rivera en 2019 y Velázquez Romero en 2021 del cepario del LBME. Se optó por incluir cepas con diversos perfiles de toxigénicos, abarcando desde cepas no toxigénicas hasta aquellas con diferentes perfiles de toxigenicidad. La secuenciación se llevó a cabo utilizando la tecnología Illumina NextSeq 2000 con una cobertura de 100X, lo que resultó en la generación de lecturas de 2x151 pares de bases por muestra.

5.2 Análisis *in silico*

5.2.1 Control de calidad, ensamble, anotación e identificación taxonómica de las secuencias genómicas

En esta sección, se detalla el análisis *in silico* realizado como parte del procesamiento de las lecturas obtenidas después de la secuenciación por Illumina. Las secuencias o reads en crudo en formato FASTQ se cargaron en la plataforma en línea BV-BRC v3.31.12 (Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center). Inicialmente, se utilizó el servicio de ensamblaje dentro de la plataforma para unir las secuencias o lecturas. Este proceso se inició con la limpieza de secuencias mediante la herramienta "trim-galore" v0.6.10, con el propósito de eliminar bases o lecturas de baja calidad, adaptadores, secuencias contaminantes o regiones no deseadas en el ADN. A continuación, se realizó un análisis de calidad de las secuencias recortadas utilizando FASTQC v0.11.9 para garantizar que la calidad promedio (Phred) fuera igual o superior a 30 (Q30) en la mayoría de las posiciones de las lecturas.

El siguiente paso consistió en llevar a cabo un ensamblaje genómico *de novo* utilizando Spades v3.13.0 para obtener los *contigs* correspondientes. La calidad de los ensamblajes

genómicos se evaluó mediante la herramienta QUAST v5.2.0 (Quality Assessment Tool for Genome Assemblies). Se descartaron ensamblajes con una longitud menor a 3.8 Mbp, ya que esta longitud es la esperable mínima para *C. difficile*. Para la selección del mejor ensamblaje de cada cepa, se consideraron los criterios de mayor valor de N50 y menor valor de L50, donde L50 representa la cantidad de secuencias necesarias para alcanzar el valor de N50. Los valores de N50 obtenidos se compararon con los reportados en el estudio de Dingle y colaboradores (Dingle *et al.*, 2014). También se retuvieron aquellas secuencias con un contenido de GC (%GC) en el rango del 28% al 29% y una longitud promedio del genoma de 4 a 5 megabases (Mb) debido a que corresponden al contenido de GC y tamaño promedio del genoma de *C. difficile*.

Para llevar a cabo la anotación de los archivos de ensamblaje, las secuencias FASTA de ensamblaje se cargaron en la plataforma en línea Galaxy (<https://usegalaxy.eu/>), donde se empleó Prokka v1.14.6 (Prokaryotic Genome Annotation) como un programa de línea de comandos con los parámetros predeterminados. Este proceso generó archivos anotados en formato GFF3, que se utilizaron para análisis posteriores.

Finalmente, la identificación taxonómica se realizó mediante el servicio Similar Genome Finder de la plataforma BV-BRC. Esta herramienta comparó las secuencias de consulta con genomas públicos de referencia o representativos almacenados en BV-BRC, calculando la distancia genómica utilizando la técnica de Mash/MinHash.

5.2.2 Tipificación de secuencias multilocus (MLST)

Con el objetivo de determinar la secuencia tipo (ST) y llevar a cabo la clasificación de los clados a través del esquema de tipificación MLST, se empleó el esquema disponible en la base de datos de PubMLST de *C. difficile*, la cual se encuentra accesible en la siguiente dirección web: <http://pubmlst.org/cdifficile>. Para llevar a cabo este análisis, se utilizaron las secuencias de ensamblaje genómico en formato FASTA. La información resultante permitió no solo la asignación de ST que facilitan la caracterización de las cepas individuales, sino también la agrupación de cepas en clados en función de similitudes genéticas. Esto

contribuyó a una comprensión más profunda de la diversidad y las relaciones evolutivas dentro de la población de *C. difficile* investigada.

5.2.3 Identificación de genes de virulencia

En el proceso de búsqueda y caracterización de genes de virulencia se empleó la base de datos VFDB (Virulence Factors Data Base), la cual se encuentra compilada en la herramienta ABRicate v1.0.1. Esta tarea se llevó a cabo mediante la ejecución de comandos en un entorno Ubuntu v22.04.2LTS con el uso de Conda v23.5.0. Además, se realizó una identificación más exhaustiva de los genes de virulencia utilizando la herramienta de línea de comandos NCBI AMRFinderPlus v3.10.24 (Antimicrobial Resistance Gene Finder Plus), con la opción --plus. Esta opción proporciona resultados adicionales, como factores de virulencia, genes de respuesta al estrés y mutaciones puntuales. Para considerar un gen como relevante, se estableció un criterio de conservación con un porcentaje de identidad igual o superior al 90% y un porcentaje de cobertura igual o superior al 80% de las secuencias correspondientes. Los resultados obtenidos se almacenaron en un formato tabular de Excel para su posterior análisis.

La subtipificación de las toxinas TcdB en las cepas de *C. difficile* se realizó mediante la base de datos pública DiffBase (<https://diffbase.uwaterloo.ca/>). Primeramente, se extrajeron las secuencias genéticas de la toxina *tcdB* de las cepas a partir de los archivos en formato FASTA, mediante un análisis de similitud con el gen *tcdB* (GenBank: AJP10336.1) de la cepa de referencia CD630 utilizando la herramienta Blastn. Se estableció un criterio de cobertura del 95% para garantizar la integridad de las secuencias comparadas. Posteriormente, las secuencias genéticas obtenidas se tradujeron a secuencias de proteínas utilizando la herramienta Translate de Expasy (<https://web.expasy.org/translate/>). Esta traducción permitió analizar las variantes de las proteínas asociadas con la toxina *tcdB* en la base de datos de diffBase. La subtipificación se basó en un criterio de identidad del 99% o superior, lo que garantizó la identificación precisa de los subtipos.

5.2.4 Identificación de genes y mutaciones puntuales asociados a resistencia

a antibióticos

Para detectar genes de resistencia y mutaciones puntuales a partir de los ensamblajes FASTA se emplearon las herramientas AMR Finder Plus v3.10.24 de la base de datos de NCBI y la base de datos RGI 6.0.2 (Resistance Gene Identifier) dentro de la herramienta CARD 3.2.7 (Comprehensive Antibiotic Resistance Database). Para considerar un gen como relevante en términos de resistencia a antibióticos, se estableció un criterio de conservación con un porcentaje de identidad mayor al 90% y una cobertura superior al 60%, tanto para mutaciones cromosómicas como para genes adquiridos relacionados con la resistencia a antimicrobianos. Los resultados obtenidos fueron almacenados en un formato tabular de Excel para análisis posteriores.

5.2.5 Identificación de plásmidos asociados a resistencia a antibióticos

Para identificar la presencia de plásmidos, se utilizó la base de datos Plasmidfinder 2.1, integrada en la herramienta ABRicate v1.0.1. La identificación específica del plásmido PCD-METRO se realizó manualmente, ya que Plasmidfinder aún no incluye este plásmido en su base de datos. Inicialmente, se llevó a cabo un análisis de similitud utilizando blastn en todas las secuencias de ensamblaje genómico en formato FASTA. Se utilizó la secuencia de referencia del plásmido pCD-METRO caracterizado por Boekhoud *et al.*, 2020 (GenBank: OM972905.1) como guía para la identificación precisa de este plásmido en las muestras analizadas. Se consideró relevante la presencia de un plásmido si se cumplían ciertos criterios de conservación: un porcentaje de identidad igual o superior al 90% y un porcentaje de cobertura igual o superior al 80% de las secuencias correspondientes.

5.2.6 Metodologías de genómica comparativa aplicadas en el presente estudio

5.2.6.1 Recopilación y selección de genomas para análisis comparativo

Recopilación de Genomas de *C. difficile* de Cepas Mexicanas:

Se incluyeron en el análisis las 9 cepas secuenciadas en el presente estudio, junto con 66 cepas de *C. difficile* de distintos estudios cuyos genomas completos presentaban una calidad de secuencia mayor al 90%, y estaban disponibles en las bases de datos del NCBI y del CNGBdb (China National GeneBank DataBase). El número total de genomas completos de cepas mexicanas de *C. difficile* utilizados en el análisis fue de 75. En la **Tabla 7** se resume el número de cepas utilizadas de acuerdo con cada estudio realizado.

Tabla 8. Recopilación de Genomas completos de *C. difficile* de cepas aisladas de pacientes en México

Nombre del estudio	Autores/Base de datos utilizada	Número de Cepas Utilizadas/Region
Molecular Epidemiology and Antimicrobial Resistance of <i>Clostridioides difficile</i> in Hospitalized Patients From Mexico	Aguilar-Zamora <i>et al.</i> (2022) /NCBI	58 cepas de Ciudad de México
Origin, genomic diversity and microevolution of the <i>C. difficile</i> B1/NAP1/RT027/ST01 strain in Costa Rica, Chile, Honduras and Mexico	Guerrero-Araya <i>et al.</i> (2020) /NCBI	1 cepa de Ciudad de México
Global Landscape of <i>Clostridioides difficile</i> Phylogeography, Antibiotic Susceptibility, and Toxin Polymorphisms by Post-Hoc Whole-Genome Sequencing from the MODIFY I/II Studies	Zhao <i>et al.</i> (2021) / CNGBdb	7 cepas de Guadalajara, México
Análisis de genómica comparativa entre cepas de <i>Clostridioides difficile</i> aisladas en México y de otras partes del mundo	Cepas del presente estudio	9 cepas de Puebla, México
Total de Genomas de Cepas Mexicanas		75 cepas

Recopilación de Genomas de *C. difficile* de Cepas Aisladas en Otras Partes del Mundo:

Se tomó la decisión de recopilar genomas completos de *C. difficile* de diferentes partes del mundo utilizando bases de datos públicas como NCBI, Enterobase y CNGBdb. Se recolectaron en total 74 cepas de genomas completos de *C. difficile*, en correspondencia con la cantidad de cepas mexicanas disponibles (75 cepas mexicanas). En el proceso de recopilación se procuró incluir una cantidad similar de cepas de cada ST. Estos genomas se obtuvieron de estudios previos que abordaron aspectos específicos de *C. difficile*. En la **Tabla**

8 se resume el número de cepas utilizadas de acuerdo con cada estudio, autores, país de origen y base de datos utilizada.

Todos los genomas recopilados se ensamblaron de novo a partir de lecturas pareadas de Illumina utilizando el servicio de ensamblaje de la plataforma BV-BRC. Este servicio permitió la carga directa de archivos de lectura utilizando los números de acceso SRA de las secuencias de lectura del NCBI y siguió el mismo protocolo de control de calidad y ensamblaje mencionado en la sección 5.2.1.

Tabla 9. Recopilación de Genomas de *C. difficile* de cepas aisladas en otras partes del mundo

Estudio	Autores/Base de datos utilizada	Número de Cepas Utilizadas/País de origen
Plasmid-mediated metronidazole resistance in <i>Clostridioides difficile</i>	Boekhoud <i>et al.</i> (2020) /NCBI	2 cepas de Países Bajos
Antibiotic resistance and genomic features of <i>Clostridioides difficile</i> in southwest China	Gu <i>et al.</i> (2022) /NCBI	1 cepas de China
Origin, genomic diversity and microevolution of the <i>C. difficile</i> B1/NAP1/RT027/ST01 strain in Costa Rica, Chile, Honduras and Mexico	Guerrero-Araya <i>et al.</i> (2020) /NCBI	14 cepas de varios países
Emergence and global spread of epidemic healthcare-associated <i>C. difficile</i>	He <i>et al.</i> (2013) /NCBI	15 cepas de varios países
Base de datos https://enterobase.warwick.ac.uk/species/index/Clostridium	Enterobase (2005-2012)	20 cepas de varios países
New Insights into <i>C. difficile</i> (CD) Infection in Latin America: Novel Description of Toxigenic Profiles of Diarrhea-Associated to CD in Bogotá, Colombia	Muñoz <i>et al.</i> (2018) /NCBI	8 cepas de Colombia
Genomic Analysis of <i>Clostridioides difficile</i> in 2 Regions of the United States Reveals a Diversity of Strains and Limited Transmission	Pecora <i>et al.</i> (2022) /NCBI	9 cepas de Estados Unidos
Plasmid acquisition alters vancomycin susceptibility in <i>Clostridioides difficile</i>	Pu <i>et al.</i> (2021) /NCBI	1 cepa de Estados Unidos
Comparative genome and phenotypic analysis of <i>C. difficile</i> 027 strains provides insight into the evolution of a hypervirulent bacterium	Stabler <i>et al.</i> (2009) /NCBI	1 cepa de Reino Unido
Global Landscape of <i>Clostridioides difficile</i> Phylogeography, Antibiotic Susceptibility, and Toxin Polymorphisms by Post-Hoc Whole-Genome Sequencing from the MODIFY I/II Studies	Zhao <i>et al.</i> (2021) / CNGBdb	3 cepas (2 de Brasil, 1 de Argentina)
Total de genomas de cepas de otras partes del mundo		74 cepas

5.2.6.2 Inferencia filogenética basada en cgMLST

La tipificación de secuencias mediante MLST y la asignación de clados de las 149 secuencias genómicas recopiladas, se realizó siguiendo la misma metodología descrita en la sección **5.1.7**. Con el objetivo de visualizar y comparar la diversidad genética revelada por el MLST, se construyó un árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en los clados obtenidos. Este análisis se realizó utilizando la herramienta cgMLSTFinder V1.2 de la plataforma CGE (Center for Genomic Epidemiology) (<https://cge.food.dtu.dk/services/cgMLSTFinder/>), que utiliza el esquema de tipificación cgMLST de *C. difficile* de la base de datos de Enterobase. Todas las secuencias en formato FASTA fueron cargadas en la plataforma para su análisis. Posteriormente, las alineaciones, los archivos de árboles y la información sobre cgMLST estuvieron disponibles para su descarga una vez que el programa finalizó su ejecución.

Un árbol de expansión mínima, conocido como Minimum Spanning Tree (MST), funciona como un mapa simplificado que resalta las conexiones fundamentales entre distintos elementos, ya sea especies o secuencias genéticas. Este tipo de árbol proporciona una representación sencilla y eficiente de las relaciones más importantes en un conjunto de datos. En el contexto de nuestro análisis, se ha creado un árbol de expansión mínima basado en cgMLST. El propósito de este árbol es visualizar la distribución de secuencias cgMLST (cgST) en las cepas examinadas. Para realizar este proceso, se utilizó un archivo .txt que contenía los resultados de perfiles alélicos identificados por cgMLSTFinder. Además, se empleó un archivo .txt auxiliar que incluía datos generales sobre las cepas analizadas. Estos archivos fueron posteriormente cargados en la plataforma PHYLOViZ Online (<https://online.phyloviz.net/index>) con el fin de construir y editar el árbol. De esta manera, se logró representar de manera gráfica y comprensible las conexiones esenciales entre las secuencias cgMLST, ofreciendo una visión clara de la estructura filogenética en el conjunto de cepas estudiadas.

5.2.6.3 Construcción del pangenoma y relación filogenética

El análisis del pangenoma de las 149 secuencias genómicas de *C. difficile* se realizó

mediante la herramienta Roary v3.11.2 dentro de la plataforma Galaxy, el cual permite realizar un alineamiento del genoma central a partir de los archivos de anotación genómica en formato GFF3, generando una matriz de presencia y ausencia de genes Core y accesorios, además de toda la información pan genómica identificada. Se configuró con un umbral predeterminado para la asignación del núcleo del 99%, y se utilizaron dos umbrales diferentes para la identidad de BlastP, específicamente del 95% y del 90%. La elección de Galaxy como plataforma se debió a que ya contenía tanto los datos genómicos como los archivos GFF3 anotados por Prokka, lo que optimizó significativamente el tiempo de análisis y redujo la probabilidad de errores durante la carga de archivos. Finalmente, para una visualización clara y comprensiva, los resultados del análisis del pangenoma producidos por Roary, se correlacionaron con los árboles filogenéticos basados en cgMLST, mediante su visualización conjunta en la plataforma Phandango v1.3.0, permitiendo una visualización interactiva de filogenias del genoma.

5.2.6.4 Comparación de factores de virulencia y resistencia antimicrobiana en las cepas de *C. difficile*

El análisis comparativo implicó la evaluación de la presencia y ausencia de genes de virulencia, genes de resistencia, así como la identificación de plásmidos y mutaciones puntuales asociadas con la resistencia antimicrobiana. Para llevar a cabo este análisis se utilizó la herramienta de visualización Microreact (<https://microreact.org/>), el cual es un visualizador en línea que permite la integración de conjuntos de datos de secuenciación. Esta herramienta posibilita una visualización integrada de diversos aspectos, permitiendo correlacionar los árboles filogenéticos basados en cgMLST con los determinantes de resistencia y virulencia, datos geográficos y temporales, entre otras variables de interés para la epidemiología genómica. Además, es importante destacar que esta visualización se basó en una sólida base de datos construida previamente en Excel.

6. RESULTADOS

6.1 Análisis experimental

6.1.1 Caracterización Microbiológica de las muestras recolectadas

Durante el período de junio de 2022 a enero de 2023, se recolectaron un total de 93 muestras fecales de pacientes del Hospital MAC Puebla, incluyendo casos de diarrea con o sin solicitud de la prueba inmunoenzimática para la detección de las Toxinas A y B de *C. difficile*. Cada muestra fue catalogada con un nombre interno, comenzando con MX_MAC seguido de un número correlativo según el orden de recepción. Las muestras fecales se cultivaron y aislaron en agar CCFA-TC bajo condiciones de anaerobiosis, revelando una amplia gama de morfologías coloniales, con un diámetro que oscila entre 2 y 5 milímetros, de color rosa y amarillo, con bordes circulares y, en algunas ocasiones, irregulares. La superficie de estas colonias era convexa, con consistencia mucoide y opaca (**ver Figura 17A**). Dependiendo de las variaciones en la morfología colonial, se seleccionaron de 1 a 3 clonas de cada aislado para ser resembradas en agar BHI con taurocolato, manteniendo las condiciones de anaerobiosis. Posteriormente, se realizó una tinción de Gram para confirmar la presencia de bacilos Gram positivos en las diferentes clonas aisladas (**ver Figura 17B**). De las 93 muestras recolectadas, se observó crecimiento en agar CCFA-TC en 37 muestras (40%). Estas clonas seleccionadas fueron resembradas en agar BHI y posteriormente se cultivaron en caldo BHI para llevar a cabo la extracción genómica mediante el método de fenol-cloroformo, obteniéndose un rango de concentración de ADN de 50 a 100 ng/uL (**ver Figura 17C**).

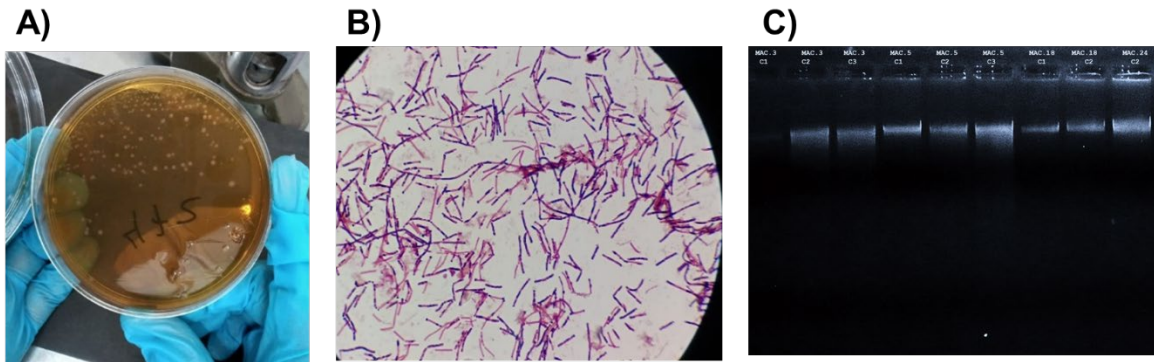


Figura 17. Cultivo microbiológico en CCFA-TC de muestras fecales y extracción genómica

A) Cultivo microbiológico en agar CCFA-TC de muestras de fecales, se observaron morfologías coloniales de 2 a 5 mm, de color rosa y amarillo, con bordes circulares, en algunas irregulares, con una superficie convexa, consistencia mucóide y opacas. B) Tinción Gram de los aislamientos, se observaron bacilos Gram positivos. C) Gel representativo de las extracciones genómicas realizadas por método de fenol-cloroformo.

6.1.2 Análisis genómico de las cepas aisladas

Se realizó la detección del gen *tpi* mediante PCR en 16 de los 37 aislamientos en agar CCFA-TC (43%) (**Figura 18**). En cuanto al origen de las muestras, 13 correspondieron a pacientes de consulta externa, 2 a pacientes de terapia intensiva y 1 a un paciente hospitalizado. Del total, 7 muestras (44%) pertenecían a pacientes de 50 a 90 años, 6 muestras (37%) a pacientes de 30 a 50 años y 3 muestras (19%) a pacientes menores de 18 años (**Figura 19A**). A continuación, se llevó a cabo un análisis de los principales factores de virulencia, incluyendo la Ttoxina A (*tcdA*), la Ttoxina B (*tcdB*) y la toxina binaria (*cdtA* y *cdtB*). Este análisis reveló los siguientes fenotipos en las 16 muestras evaluadas: 37.5% (n=6) presentaron el gen *tcdB*, 12.5% (n=2) mostraron *tcdA* y *tcdB*, 37.5% (n=6) no exhibieron toxigenicidad, 6% (n=1) mostró *tcdB*, *cdtA* y *cdtB*, y 6% (n=1) exhibió *cdtA* y *cdtB* (**Figura 19B**).

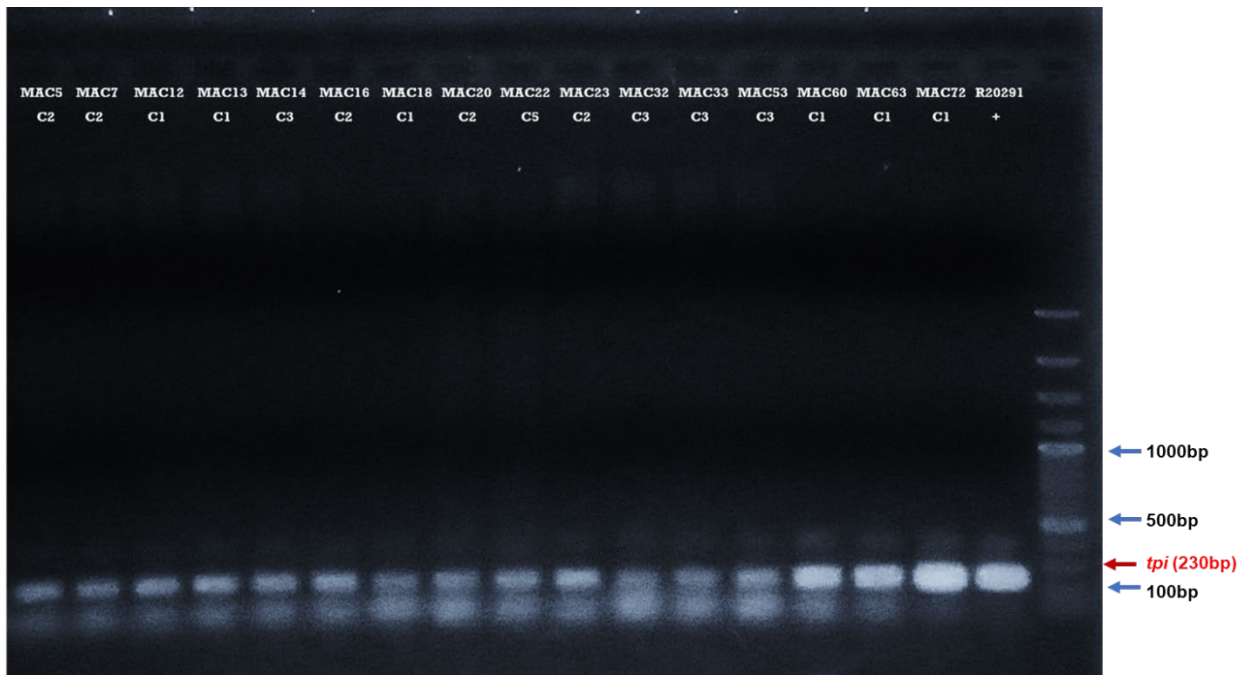


Figura 18. Gel representativo para la determinación del gen *tpi*

Gel al 1% de agarosa, cada carril corresponde a una cepa, se utilizó la cepa de referencia R20291 como control positivo para la amplificación de PCR, Carril M, 100 pb Plus DNA Ladder.

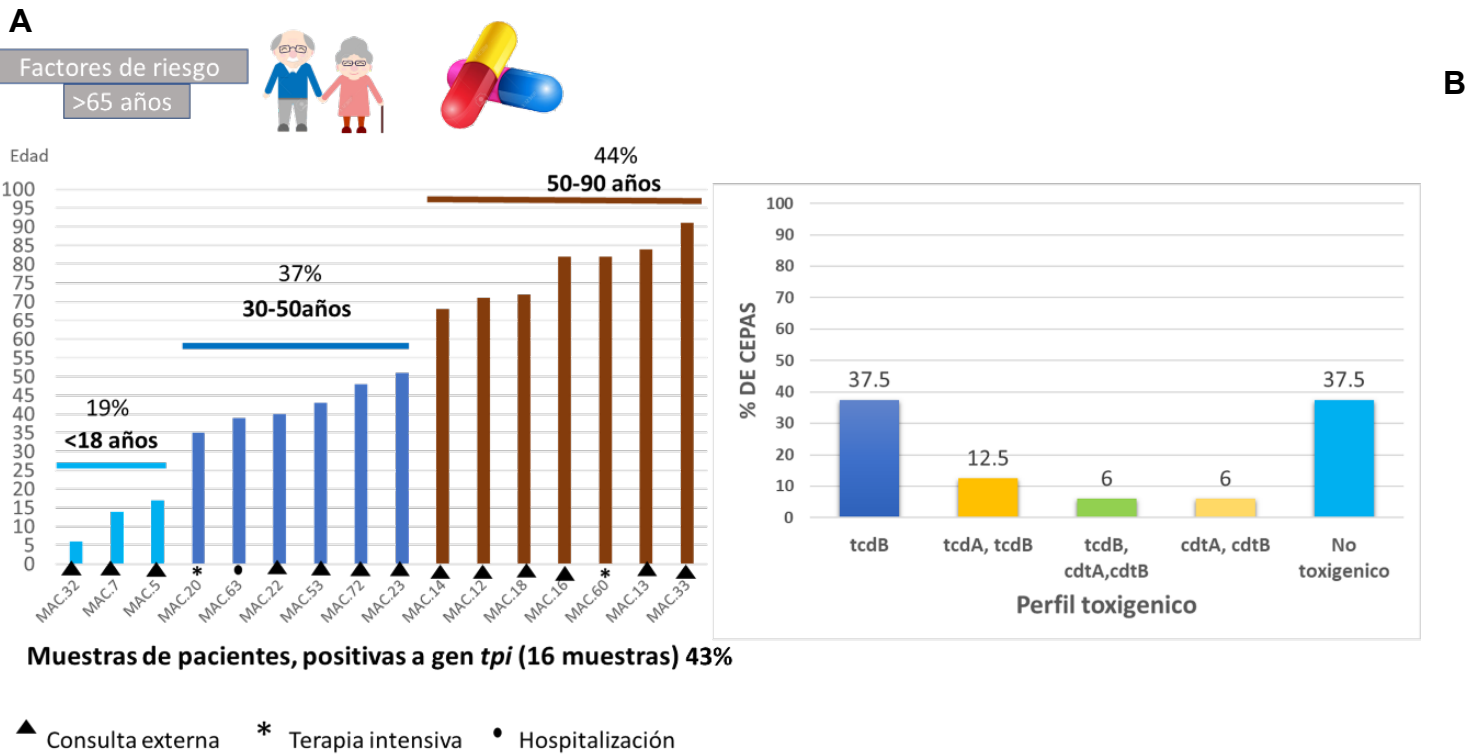


Figura 19. Características demográficas de cepas de *C. difficile* y perfil toxigénico

Análisis detallado de las cepas de *C. difficile* aisladas, centrándose en dos aspectos fundamentales. En la Parte A, se ilustra la distribución demográfica de los pacientes de los cuales se obtuvieron las muestras, destacando la variabilidad en las edades y los tipos de pacientes, como los provenientes de consulta externa y terapia intensiva. En la Parte B, se muestra la variabilidad en los factores de virulencia, incluyendo las toxinas A y B, así como las toxinas binarias, revelando diferentes patrones toxigénicos presentes en las cepas analizadas.

6.1.3 Análisis de susceptibilidad Antimicrobiana

Los resultados de las pruebas de susceptibilidad realizadas en 38 cepas de *C. difficile*, junto con la cepa de referencia R20291, revelaron patrones diversos de susceptibilidad. Se observaron elevados porcentajes de susceptibilidad para todos los antibióticos evaluados, con la excepción de cefotaxima, que exhibió mayores porcentajes de resistencia.

En detalle, se identificó resistencia a vancomicina en el 13% de las cepas (n=5), mientras que se encontró resistencia a metronidazol en el 26% (n=10), eritromicina en el 46% (n=18), cefotaxima en el 59% (n=23), tetraciclina en el 8% (n=3) y cloranfenicol en el 13% (n=5).

Es importante destacar la variabilidad significativa en los rangos de CMI, que oscilaron desde las concentraciones más bajas hasta las más altas probadas para cada antibiótico evaluado, como se ilustra en la **Figura 20**.

Antibióticos	Rango CMI µg/ml	Valores de corte µg/mL			Frecuencia %		
		S	I	R	S	I	R
VAN	0.064 - ≥4	-	-	≥4	87% (n=34)	-	13% (n=5)
MTZ	8 - ≥64	≤8	16	≥32	74% (n=29)	-	26% (n=10)
CTX	8 - ≥64	-	-	≥32	41% (n=16)	-	59% (n=23)
ERY	2 - ≥16	-	-	≥8	54% (n=21)	-	46% (n=18)
CHL	8-32	≤8	16	≥32	87% (n=34)	-	13% (n=5)
TET	8-≥64	-	-	≥32	92% (n=36)	-	8% (n=3)

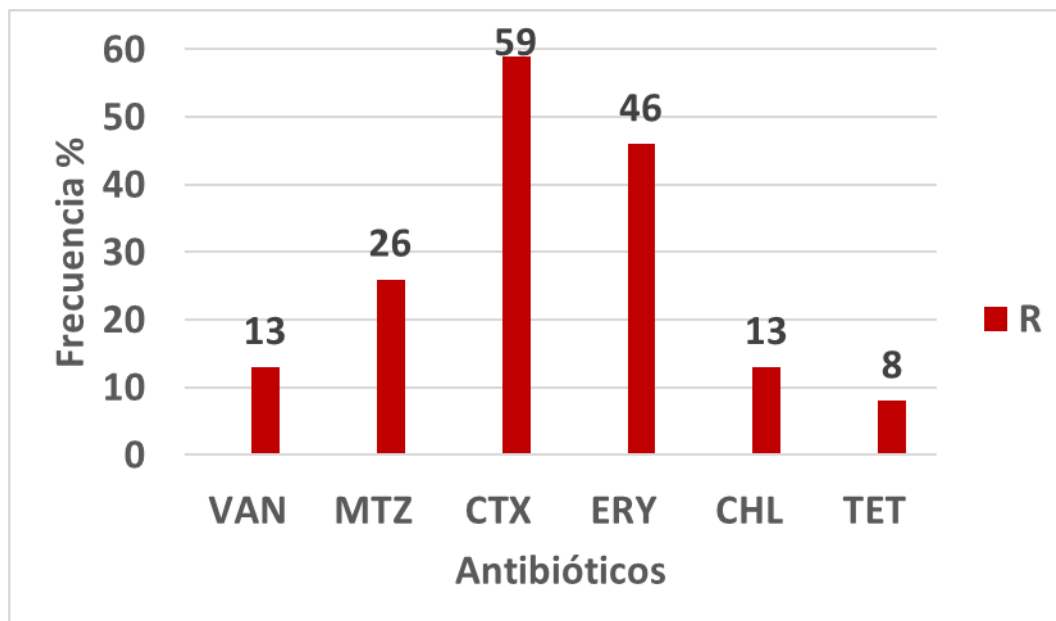


Figura 20. Patrón de frecuencia de susceptibilidad antimicrobiana en 39 aislados de *C. difficile*

VAN: Vancomicina, MTZ: Metronidazol, CTX: Cefotaxima, ERY: Eritromicina, CHL: Cloranfenicol, TET: Tetraciclina. S: Sensible, I: Intermedio, R: Resistente

En la **Tabla 9**, que representa las cepas que integran el cepario de *C. difficile* del LBME. Se identificaron 19 muestras aisladas de pacientes hospitalizados y 3 provenientes de aislamientos en pacientes asintomáticos. Entre estas últimas, dos cepas fueron obtenidas de recién nacidos, destacando que la cepa no toxigénica 001CI-C1 demostró susceptibilidad a todos los antibióticos evaluados. Todas las muestras de este grupo exhibieron sensibilidad a vancomicina, mientras que 3 cepas aisladas de pacientes hospitalizados y 1 cepa de portador asintomático mostraron resistencia a metronidazol.

En contraste, la **Tabla 10** presenta el conjunto de las 16 cepas del presente estudio aisladas en el Hospital MAC Puebla, junto con la cepa de referencia *C. difficile* R20291. En este conjunto, se observó que 5 cepas presentaron resistencia a vancomicina y 6 cepas fueron resistentes a metronidazol. Es relevante señalar que una cepa aislada de la unidad de terapia intensiva demostró resistencia a 5 de los 6 antibióticos evaluados, siendo susceptible únicamente a tetraciclina. Las cepas destacadas en verde fueron elegidas para llevar a cabo la secuenciación genómica, mientras que las demás cepas fueron almacenadas para ser secuenciadas en una etapa posterior.

Adicionalmente, se observaron diferencias en los rangos de CMI en la cepa de referencia, en comparación con lo reportado previamente, destacándose principalmente la resistencia obtenida en metronidazol (≥ 64 $\mu\text{g/mL}$) y cloranfenicol (32 $\mu\text{g/mL}$).

Tabla 10. Resultados de las pruebas de susceptibilidad de cepas del LBME por CMI, y perfil toxigénico por PCR

A)

Cepario LBME-CICM-ICUAP ID de cepa	SEXO	EDAD	VAN	MTZ	ERY	CTX	TET	CHL	Perfil toxigénico por PCR				
			≥ 4	≥ 32	≥ 8	≥ 32	≥ 32	≥ 32	tcdA	tcdB	cdtA	cdtB	
1	100 CI	-	-	0.19	8	8	32	8	8				
2	355 CI	-	-	0.094	8	8	32	8	8				
3	571 CI	-	-	0.094	8	2	32	8	8				
4	602	-	-	0.094	≥ 64	2	32	8	8				
5	572 CI	-	-	0.094	8	2	32	8	8				
6	246	-	-	0.19	8	8	32	8	8				
7	774	-	-	0.25	8	2	32	8	8				
8	799	-	-	0.25	8	2	8	8	8				
9	472	-	-	0.25	8	2	32	8	8				
10	Cdnd2-C1	-	-	0.38	≥ 64	8	32	16	8				
11	Cdnd1 E-C2	-	-	1.0	8	2	32	8	8				
12	Cdnd3-C2	-	-	1.0	8	≥ 16	≥ 64	≥ 64	8				
13	Cdnd4-C1	-	-	0.125	8	8	32	16	8				
14	Cdnd 6-c1	-	-	0.125	8	2	32	8	8				
15	Cdnd10-C2	-	-	0.25	8	8	32	16	8				
16	Cd014-C5	F	66	0.094	8	8	32	8	8				
17	Cd010-C1	F	43	2.0	≥ 64	2	32	16	8				
18	Cd018-C1	M	1	0.125	8	2	32	8	8				
19	Cd021-C1	F	20	0.94	8	2	8	8	8				
20	O25CA-C1	F	25	2.0	≥ 64	8	32	16	8				
21	001CI-C1	M	1	1.0	8	2	8	8	8				
22	033CI-C1	M	1	0.5	8	≥ 16	≥ 64	16	8				

Antibióticos CMI ug/mL

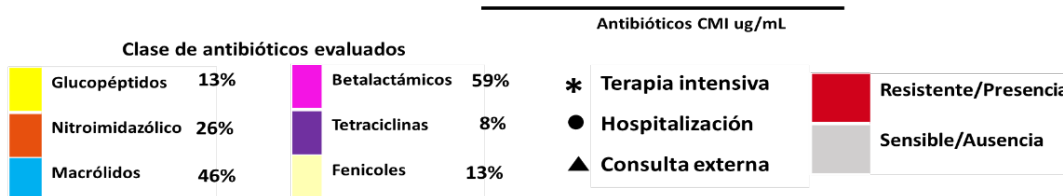
Cepas de pacientes aisladas en hospitales

Cepas de portadores asintomáticos

Tabla 11. Resultados de las pruebas de susceptibilidad por CMI y perfil toxigénico por PCR 16 cepas recolectadas del Hospital MAC Puebla periodo 2022-2023

B)

	Hospital MAC	SEXO	EDAD	VAN	MTZ	ERY	CTX	TET	CHL	Perfil toxígeno por PCR				
				≥4	≥32	≥ 8	≥32	≥32	≥32	tcdA	tcdB	cdtA	cdtB	
	ID CEPA													
23 ▲	MAC.5-C2	F	17	2.0	≥64	≥ 16	≥64	32	8					
24 ▲	MAC.7-C2	F	14	0.5	8	2	8	8	8					
25 ▲	MAC 12.C1	F	71	≥4	8	≥ 16	8	32	8					
26 ▲	MAC 13.C1	F	84	0.5	8	2	8	8	8					
27 ▲	MAC 14.C3	M	68	1.0	8	2	16	8	8					
28 ▲	MAC 16.C2	F	82	0.25	8	2	8	8	8					
29 ▲	MAC 18.C1	F	72	0.5	8	≥ 16	≥64	8	8					
30 *	MAC 20.C2	M	35	≥4.0	≥64	8	32	16	32					
31 ▲	MAC 22.C5	M	40	≥4.0	≥64	8	16	8	32					
32 ▲	MAC 23.C2	F	51	≥4.0	≥64	8	8	8	32					
33 ▲	MAC 32.C3	M	6	≥4.0	32	8	8	8	32					
34 ▲	MAC 33.C3	M	91	0.5	8	2	8	8	8					
35 ▲	MAC 53.C3	M	43	2.0	8	2	8	8	8					
36 *	MAC 60.C1	F	82	0.25	8	2	8	16	8					
37 ●	MAC 63.C1	M	39	0.5	8	2	8	16	8					
38 ▲	MAC 72.C1	M	48	0.5	8	2	8	16	8					
39	REF.R20291			1.0	>64	8	32	16	32					



Las cepas destacadas en verde fueron elegidas para llevar a cabo la secuenciación genómica, mientras que las demás cepas fueron almacenadas para ser secuenciadas en una etapa posterior..

6.2 Análisis *In silico*

6.2.1 Evaluación de la calidad de las secuencias

Tras la implementación de la estrategia de ensamblaje descrita en la metodología, se obtuvieron genomas con un tamaño promedio que osciló entre 3.81 y 4.31 Mb. Estos ensamblajes consistían en un número variable de secuencias contiguas o “*contigs*”, que iba desde 25 hasta 634. Además, se observó una uniformidad en el contenido de guanina-citosina (%GC), que se mantuvo constante en un rango de 28.17% a 29.11%. El valor N50 promedio, indicando la longitud del contig donde se encuentra el 50% del genoma, fue de 161440.2 bp, con un rango de 54813 a 397470. Además, el valor L50 promedio de 17.8, con un rango de 9 a 40, sugería que se necesitaban alrededor de 18 *contigs* en promedio para cubrir la mitad del genoma de *C. difficile*. Estos resultados revelaron información importante

sobre la calidad y complejidad de los ensamblajes genómicos de esta bacteria. La información ampliada de los resultados obtenidos de los genomas puede ser consultada en el **Anexo F**.

6.2.2 Análisis Genómico en base a la tipificación MLST

Los resultados del análisis MLST de las 75 cepas mexicanas revelaron una notable diversidad genética, clasificándose en 19 secuencias tipo (STs) distribuidas en 3 clados diferentes (C1, C2 y C4). Como se puede observar en la **Figura 22B**. Dentro del clado 2, el ST01 fue el más predominante, abarcando el 44% (n=33) de las cepas, como se detalla en la **Figura 21**.

Al comparar estas cepas mexicanas con 74 cepas de genoma completo de otros países, se encontraron 18 STs en común como se observa en la **Figura 21**. Sin embargo, 1 STs (ST-245) presente en las cepas mexicanas no se encontraron en las bases de datos públicas.

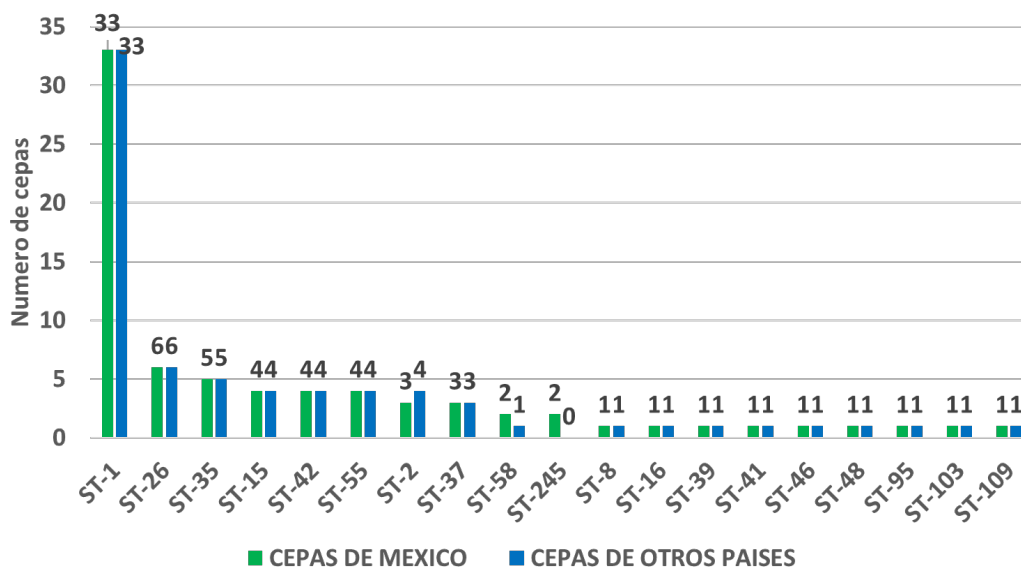


Figura 21. Diversidad de los STs identificados en los genomas de cepas mexicanas y de otros países
 En el grafico se representan los 19 STs identificados en cepas. Las barras en color verde representan el número de cepas mexicanas, y las barras en color azul representan en número de cepas aisladas en otras partes del mundo recuperadas de bases de datos públicas.

6.2.3 Análisis Filogenético de *C. difficile* basado en cgMLST

6.2.3.1 Análisis filogenético basado en cgMLST

La investigación sobre la variabilidad genética en 149 cepas de *C. difficile* aisladas en México mediante cgMLST reveló hallazgos significativos. Cada cepa fue analizada utilizando 2556 locus genéticos de acuerdo con el esquema de tipificación cgMLST de ENTEROBASE, y se encontró que el porcentaje de alelos llamados varió entre el 87.4% y el 93.27%. Este porcentaje representa la cantidad relativa de variantes genéticas encontradas de todos los posibles alelos en los 2556 locus. Para profundizar en las relaciones genéticas, se construyó un árbol filogenético Neighbor-Joining basado en el análisis de cgMLST (**Figura 22A**), lo cual reveló la amplia distribución de las cepas ST01 en el clado 2. Este árbol fue utilizado para análisis posteriores.

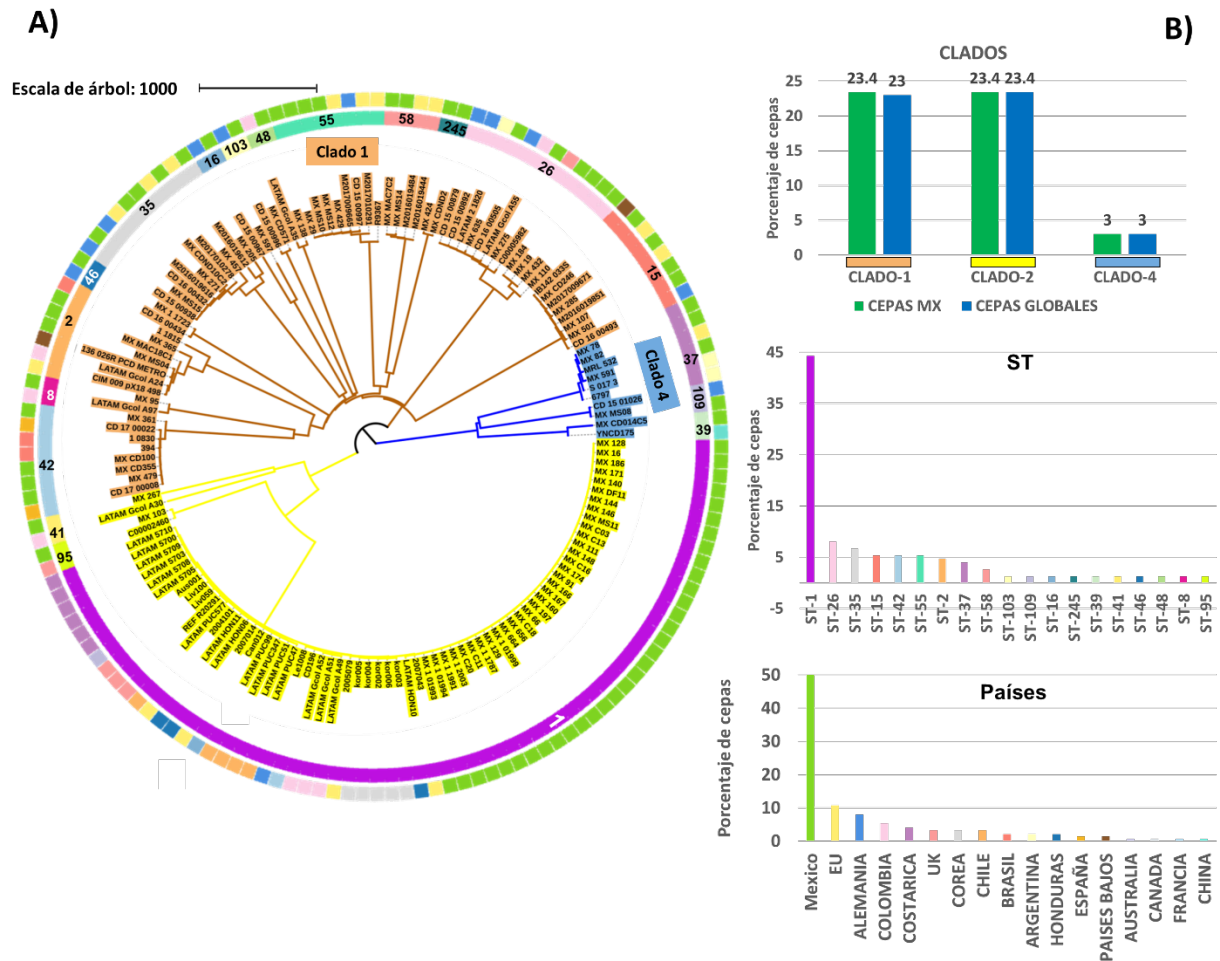


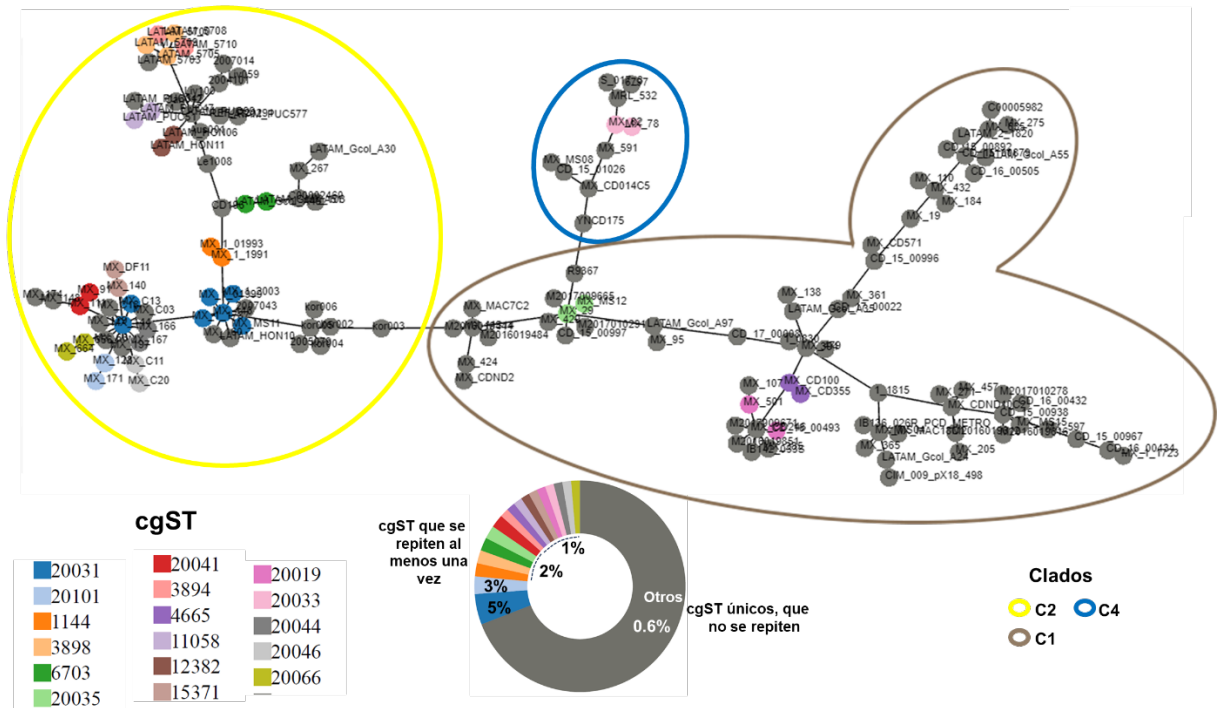
Figura 22. Análisis filogenético basado en cgMLST de cepas mexicanas y de otros países

A) Árbol filogenético circular neighbor-joining, basado en cgMLST de 149 cepas de *C. difficile*. Se observan las relaciones filogenéticas entre los 19 ST de cepas mexicanas y cepas de otros países. El contenido de los círculos, organizados de manera progresiva desde el más interno, se detalla de la siguiente manera: El círculo 1 indica el árbol filogenético agrupado en 3 clados representado por colores. El círculo 2 indica la distribución de STs en las cepas. El círculo 3 indica los países a los que pertenecen las cepas analizadas. B) Gráficas de porcentajes de distribución. Gráfica del círculo 2, ST, que indica los porcentajes de distribución de STs en las cepas analizadas. Gráfica del círculo 3, Países, que indica los porcentajes de distribución de los países a los que pertenecen las cepas analizadas. Árbol filogenético construido mediante cgMLSTFinder V1.2. Editado y visualizado mediante iTOL v6.

Se construyeron árboles de expansión mínima basado en el análisis cgMLST, observando que las cepas analizadas se clasificaron en 120 cgSTs, observándose una clara agrupación por clados como se observa en la figura **Figura 23A**. Es importante destacar que se identificaron 7 cepas (5%) idénticas de acuerdo a la clasificación cgMLST, especialmente en las cepas ST01 del clado 2 de cepas mexicanas. Esto indica que las cepas de este clado presentan una menor variabilidad genética, como se puede observar en la **Figura 23B**, ya

que las cepas que se repiten al menos una vez se agrupan mayormente en el clado 1 de las cepas mexicanas que se denotan con color verde. Sin embargo, las cepas de otros clados, aunque comparten el mismo tipo ST, mostraron variaciones en las secuencias cgST, lo que sugiere una mayor diversidad genética entre estas cepas, lo cual puede influir en la virulencia, resistencia a antibióticos u otras propiedades biológicas de las cepas, y tener implicaciones en la respuesta al tratamiento y la propagación de la enfermedad.

A)



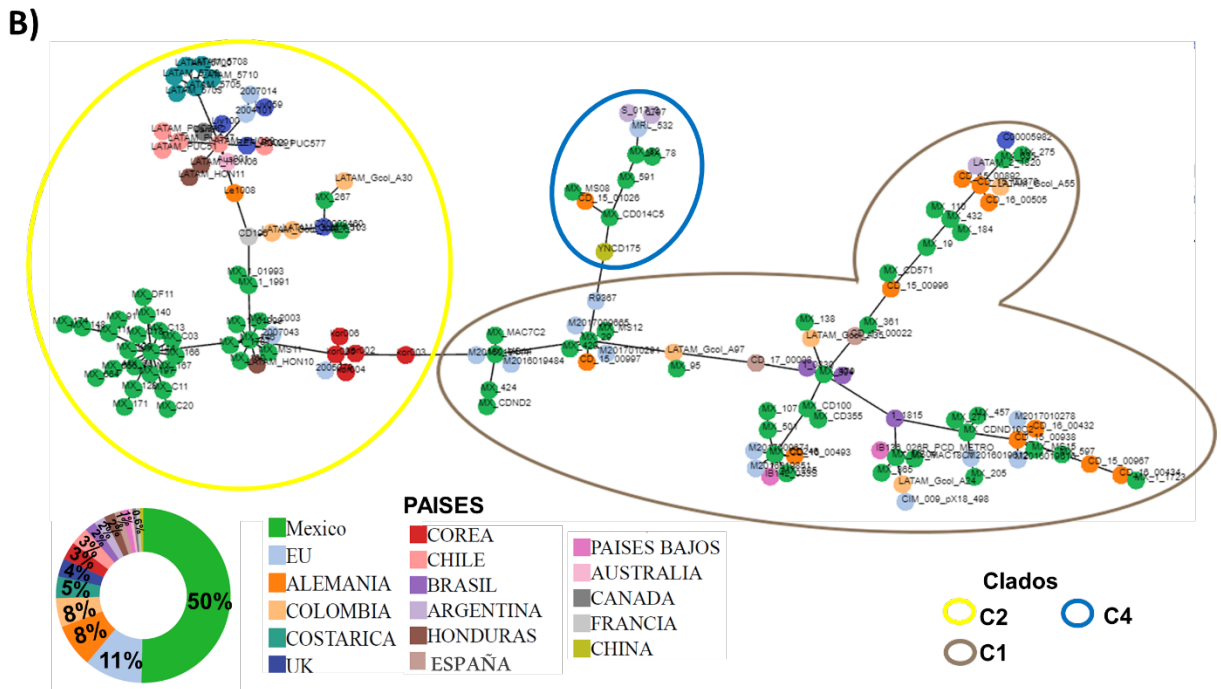


Figura 23. Árboles de expansión mínima basado en el análisis cgMLST de cepas en México y en otros países Árboles divididos en los 3 clados identificados. Cada nodo del árbol representa una cepa específica.

A) Los nodos coloreados indican perfiles alélicos cgST que se repiten al menos una vez, mientras que los nodos en gris representan perfiles cgST únicos que no se repiten. Además, el gráfico circular ilustra el porcentaje de distribución de estos perfiles alélicos cgST en el conjunto de datos. B) Los nodos coloreados indican los países a los que pertenecen las cepas. El gráfico circular ilustra el porcentaje de distribución de los países en las cepas analizadas. Árboles filogenéticos construidos y editados en PHYLOViZ Online.

6.2.4 Análisis del pangenoma de *C. difficile*: Comparación entre Cepas Mexicanas y de Otros Países

En análisis del pangenoma de *C. difficile* se evaluaron 149 cepas, de las cuales 75 son cepas provenientes de México y 74 cepas de diferentes países, revelando patrones distintivos en las cepas de diferentes regiones geográficas, mostrando en ambos grupos una gran diversidad genética, con características de un pangenoma "abierto", que de acuerdo con la definición de Tettelin *et al.* 2008 el pangenoma no está fijo y puede expandirse a medida que se secuencian y analizan nuevas cepas (**Figura 24A**).

El conjunto de 149 cepas presentó un pangenoma total de 10,300 genes de los cuales el 26% (2650 genes) pertenecen al genoma central, y el 74% (7650 genes) pertenecen al genoma accesorio, incluyendo los genes del núcleo blando (3%), genes periféricos (11%) y

genes diferenciales (60%) (**Figura 24B**). Estos genes, que no son esenciales para la especie, pero confieren diversidad y adaptabilidad, están presentes en diferentes proporciones en estas cepas, esto indica una considerable diversidad y adaptación genética, posiblemente como resultado de presiones ambientales y evolutivas únicas en esas regiones geográficas específicas.

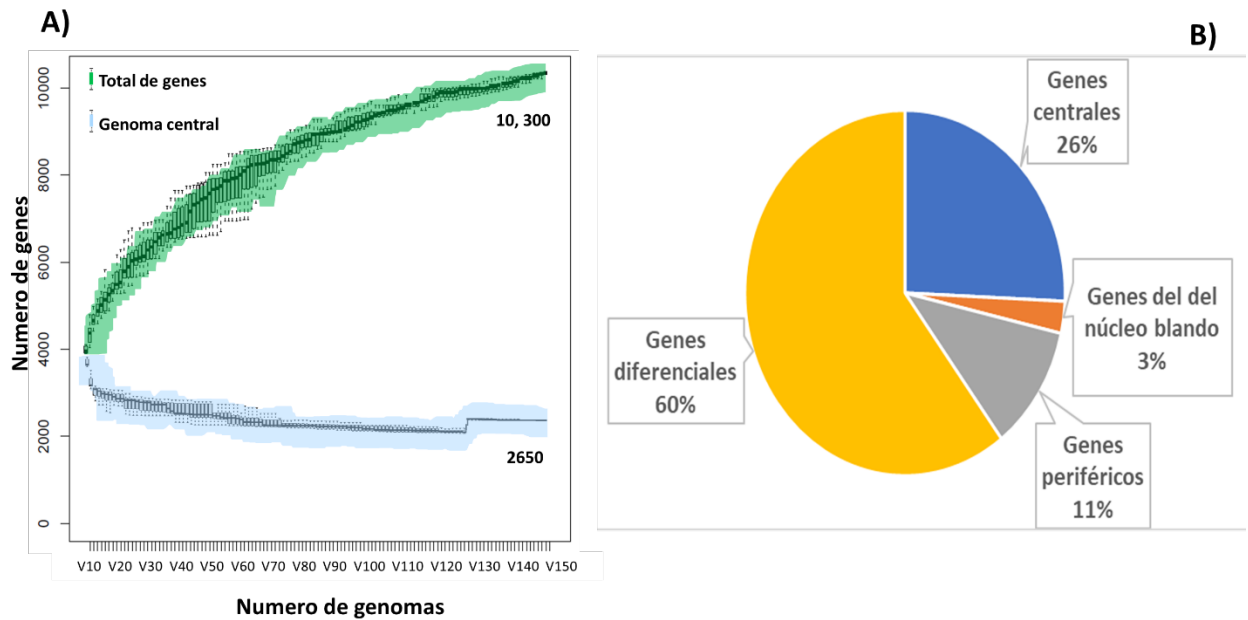


Figura 24. Pangenoma de 149 cepas de *C. difficile*

A) Curvas de visualización del pangenoma. Siguiendo la definición de Tettelin *et al.* 2008. El pangenoma de la especie *C. difficile* mostró características de un pangenoma “abierto”, esto quiere decir que la curva del pangenoma seguirá aumentando a medida que se incluyan más genomas en el análisis. Grafico de la curva construido mediante Roary v3.13. B) Gráfico circular que representa el pangenoma de 149 cepas aisladas en México y en otros países. El gráfico muestra la proporción de genes centrales y accesorios presentes en las cepas.

La construcción de gráficos de matriz de presencia/ ausencia de genes en el pangenoma, y el análisis combinado con el árbol filogenético basado en cgMLST proporcionó una visión más profunda de la estructura genética de las cepas de *C. difficile* (**Figura 25**). Tanto en las cepas mexicanas, como en las cepas aisladas en otros países se observó una variabilidad descendente en el tamaño del genoma central y la dispersión de genes accesorios en relación con los clados, lo que revela patrones interesantes en la diversidad genética de esta bacteria.

Específicamente, las cepas del clado 2 constituidas por 70 genomas, exhibieron un total de

5,480 genes, destacando un núcleo genético amplio compuesto por 3,190 genes (58%) y 2,290 genes accesorios menos dispersos. Estos últimos se constituyeron principalmente por genes del núcleo blando (30%), genes periféricos (7%), y genes diferenciales (5%), sugiriendo una mayor homogeneidad genética dentro de este clado (**Figura 26**).

En contraste, las cepas del clado 1 constituidas por 69 genomas mostraron un total de 8,584 genes, con un genoma central de 2,583 genes (30%) menos extenso que el de las cepas del clado 2. Además, presentaron 6,001 genes accesorios más dispersos, mayormente conformados por genes del núcleo blando (51%), genes periféricos (13%), y genes diferenciales (6%), indicando una estructura genética más variable en comparación con el clado 2 (**Figura 27**).

Por otro lado, las cepas del clado 4, compuestas por 10 genomas, exhibieron un total de 4,784 genes, con un genoma central de 3,036 genes (63%). Además, presentaron 1,748 genes accesorios, predominantemente constituidos por genes periféricos (26%) y genes del núcleo blando (11%) (**Figura 28**).

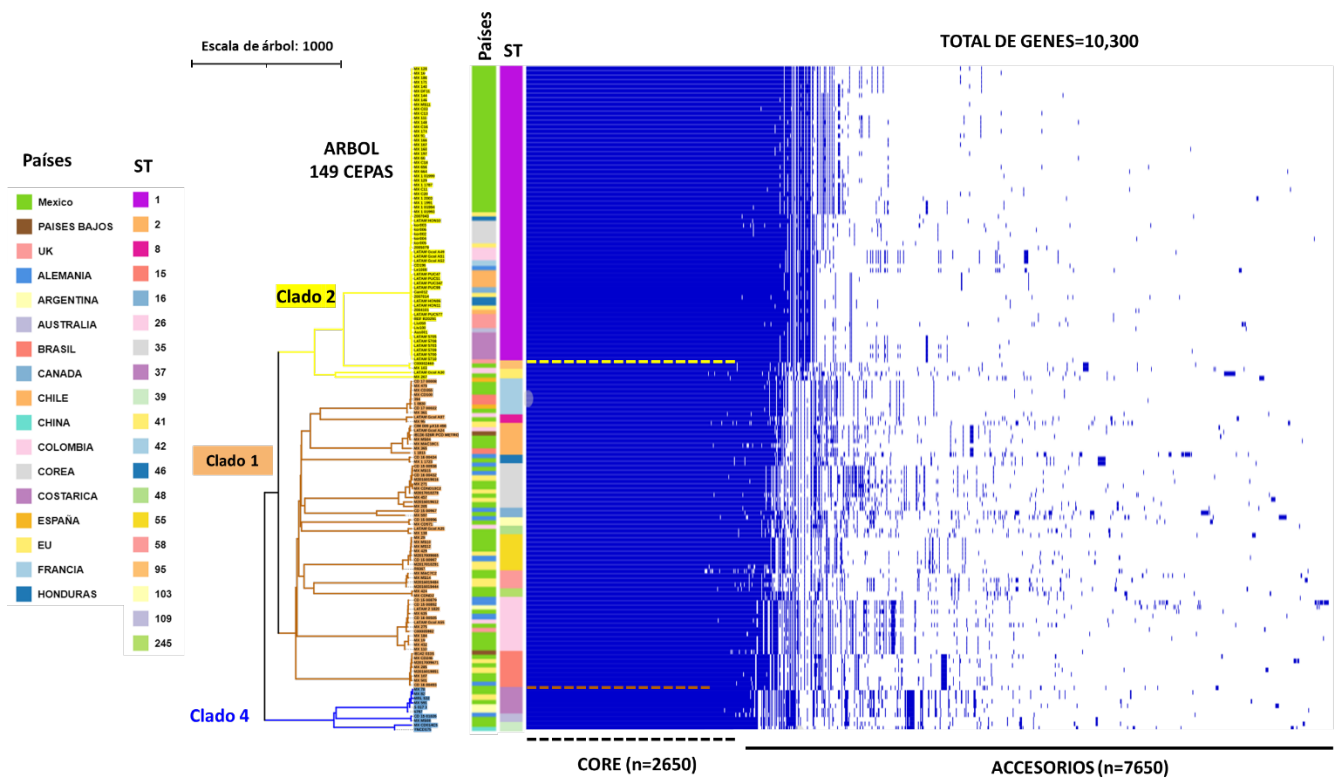


Figura 25. Matriz de presencia/ausencia de genes en el pangenoma de *C. difficile* en las cepas analizadas
 A) Pangenoma de 149 cepas aisladas en México y en otros países. Cada cuadro azul representa un gen en particular, La posición del cuadro a lo largo del eje horizontal indica la ubicación del gen en el genoma, si el mismo gen se encuentra en varios genomas se observará una línea de cuadros azules a lo largo de varias filas, cada una representando un genoma diferente. Las líneas punteadas de colores representan el genoma central asociado a cada clado, y la línea horizontal inferior representa los genes accesorios. Esta matriz fue generada utilizando la herramienta Roary v3.13, y está filogenéticamente relacionada con el árbol filogenético creado mediante cgMLSTfinder, y visualizado en Phandango.

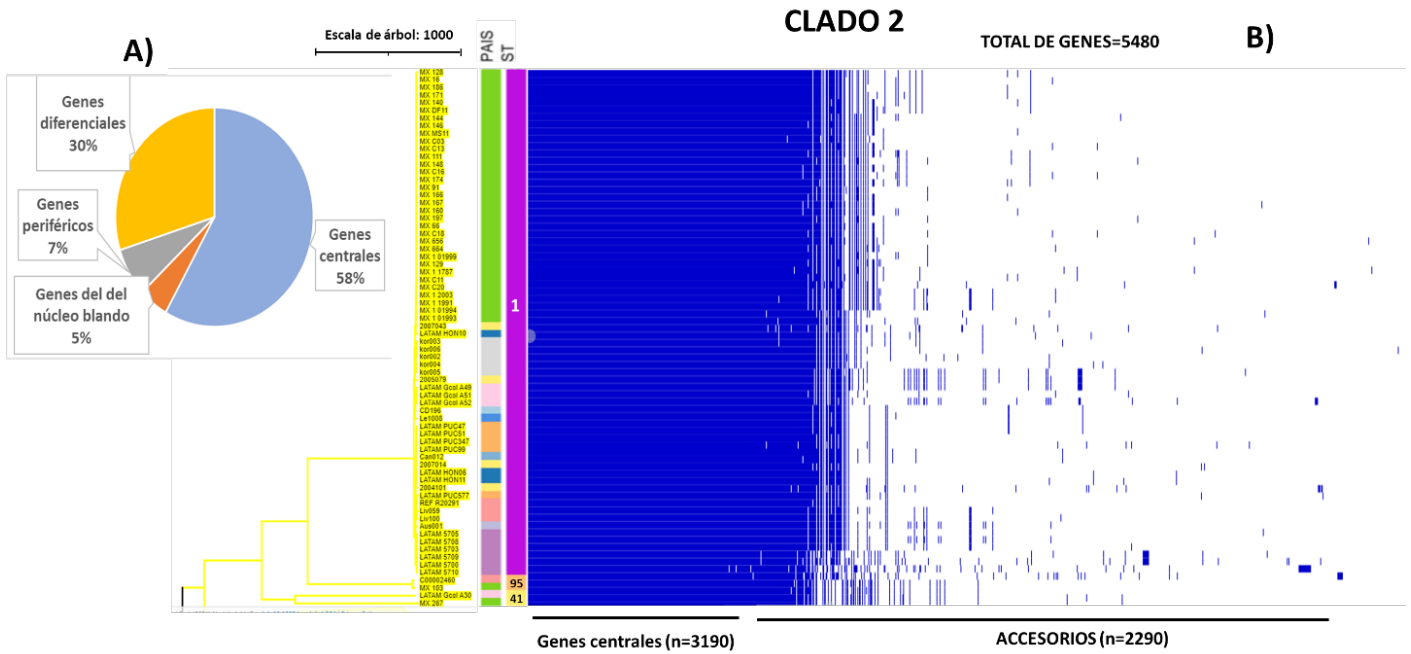


Figura 26. Pangenoma de *C. difficile* en las cepas del clado 2

- A) Gráfico circular que representa el pangenoma de cepas aisladas en México y en otros países. El gráfico muestra la proporción de genes centrales y accesorios presentes en las cepas
- B) Matriz de presencia/ausencia de genes en el Pangenoma de *C. difficile* en las cepas del clado 2

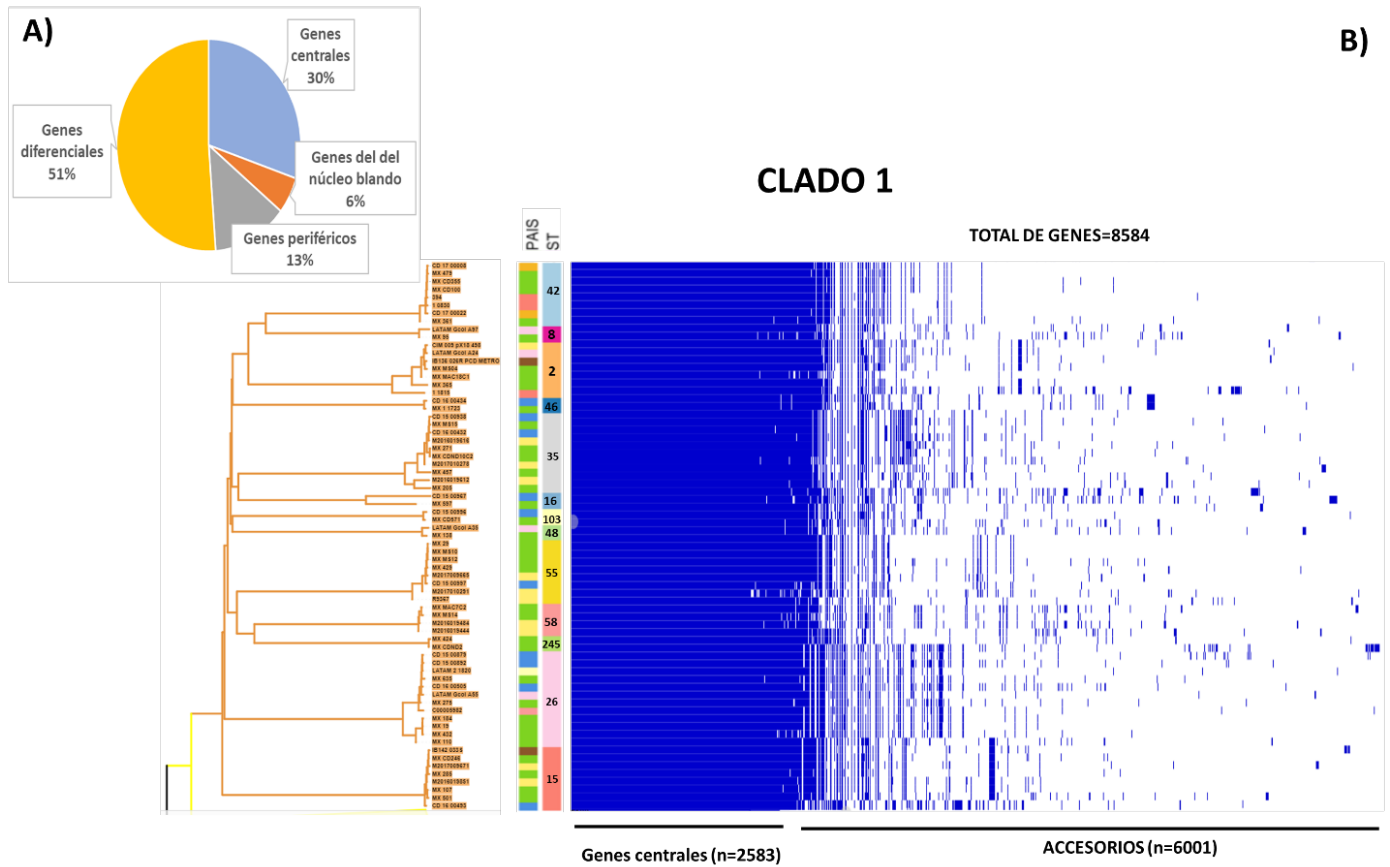


Figura 27. Pangenoma de *C. difficile* en las cepas del clado 1

A) Gráfico circular que representa el pangenoma de cepas aisladas en México y en otros países. El gráfico muestra la proporción de genes centrales y accesorios presentes en las cepas. B) Matriz de presencia/ausencia de genes en el Pangenoma de *C. difficile* en las cepas del clado 1.

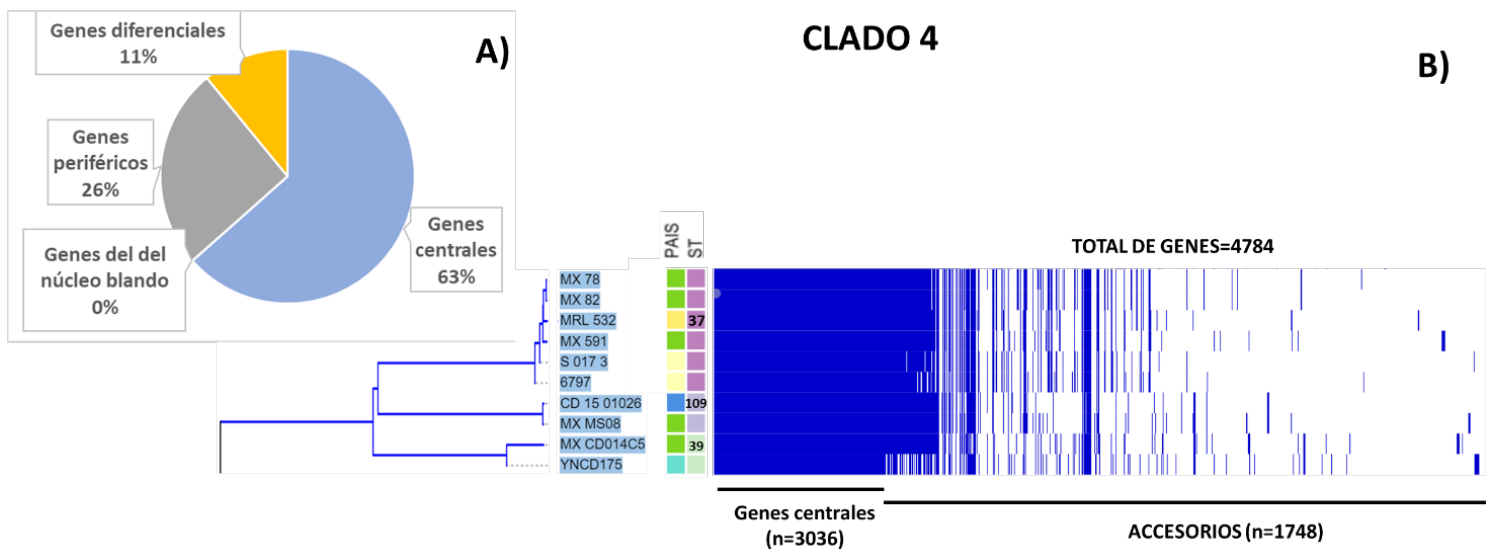


Figura 28. Pangenoma de *C. difficile* en las cepas del clado 4

A) Gráfico circular que representa el pangenoma de cepas aisladas en México y en otros países. El gráfico muestra la proporción de genes centrales y accesorios presentes en las cepas

B) Matriz de presencia/ausencia de genes en el Pangenoma de *C. difficile* en las cepas del clado 4

6.2.5 Análisis de comparación del viruloma entre cepas mexicanas y de otros países

Se generaron gráficos de presencia y ausencia de genes de virulencia, los cuales fueron relacionados filogenéticamente con el árbol basado en cgMLST. Se destacaron notables similitudes en la distribución de genes de virulencia entre las cepas mexicanas y las de otros países. Sin embargo, se evidenciaron marcadas diferencias en la distribución de genes al considerar los diferentes clados y STs. Se identificaron un total de 20 genes de virulencia, incluyendo aquellos que codifican para los genes de toxinas *tcdA*, *tcdB*, *cdtA* y *cdtB*. Se identificaron, además, 14 subtipos de toxinas B.

Adicionalmente, se identificaron genes que codifican para reguladores como *tcdC*, *tcdE*, *tcdR* y *CdtR*. También se hallaron 8 genes relacionados con la adherencia y 4 genes asociados a exoenzimas. Llamativamente, se observó que genes de adherencia como *CD0873*, *CD2831*, *fbpA/fbp68*, *groEL*, y los genes de exoenzimas *cwp84* y *zmp1* estuvieron presentes en el 99% de las cepas analizadas.

Cepas del clado 2:

En el análisis detallado de las cepas ST01 del clado 2 (**Figura 29**), se observó una uniformidad en la presencia de genes de toxinas, *tcdA*, *tcdB*, *cdtA* y *cdtB*. Todas las cepas mostraron el subtipo de toxinas B2, siendo B2.1 el más predominante con el 97% de prevalencia. Los genes reguladores, como *tcdE*, *tcdR* y *cdtR*, estuvieron presentes, mientras que los genes reguladores *tcdC* solo estuvieron presentes en el 3%. Además, los genes de adherencia *cwp66* y los genes de exoenzimas *iap* e *ibp* estuvieron presentes en todas las cepas ST01 del clado 2. Sin embargo, los genes de adherencia *CD3246*, *cbpA* y *slpA* estuvieron mayormente ausentes en este clado.

Cepas del clado 1:

En el análisis detallado del clado 1, como se ilustra en la **Figura 30**, se evidenció una marcada variabilidad en los STs. Un 68% de las cepas pertenecientes al clado 1 codifican los genes de toxinas *tcdA* y *tcdB*, con la presencia de las cepas ST015, 26 y 48. Dentro de las cepas que codificaron la toxina B, el subtipo B1 fue el más prevalente, destacando B1.2 con una prevalencia del 23%. No se detectaron genes que codifiquen para toxinas binarias *cdtA* o *cdtB* en ninguna cepa del clado 1.

Las cepas toxigénicas presentaron del 65% al 68% de los genes reguladores de la presencia de toxinas, como *tcdC*, *tcdE* y *tcdR*. En dos cepas ST55, se observó la presencia de genes de las toxinas *tcdA* y *tcdB* a pesar de la ausencia del gen regulador *tcdR*. Respecto al regulador *cdtR*, se constató su presencia en el 55% de las cepas del clado 1, excluyendo las cepas ST015, 26, 35 y una del ST58, a pesar de la falta de presencia de toxinas binarias.

Los genes de adherencia *CD3246* y *cbpA* estuvieron presentes en todas las cepas del clado 1, marcando una diferencia con las cepas del clado 2 que carecían de estos genes. En contraste, los genes de adherencia *slpA* se encontraron en solo el 4% de las cepas, y los genes de exoenzimas *iap* e *ibp* estuvieron mayoritariamente ausentes.

Cepas del clado 4

Los resultados del análisis de las cepas del clado 4 revelan una marcada heterogeneidad entre los diferentes Tipos de Secuencia (ST) examinados (**Figura 31**). La cepa ST37 exhibió una prevalencia del 60% en la presencia del gen *tcdB* subtipo B3.1, junto con la presencia de reguladores clave (*tcdC*, *tcdE* y *tcdR*) y genes asociados a la adherencia y exoenzimas. En contraste, las cepas ST0109 y ST39 se caracterizaron principalmente por la presencia de genes de adherencia, excluyendo el gen *slpA*, y la ausencia de genes de exoenzimas *iap* e *ibp*

CLADO 2

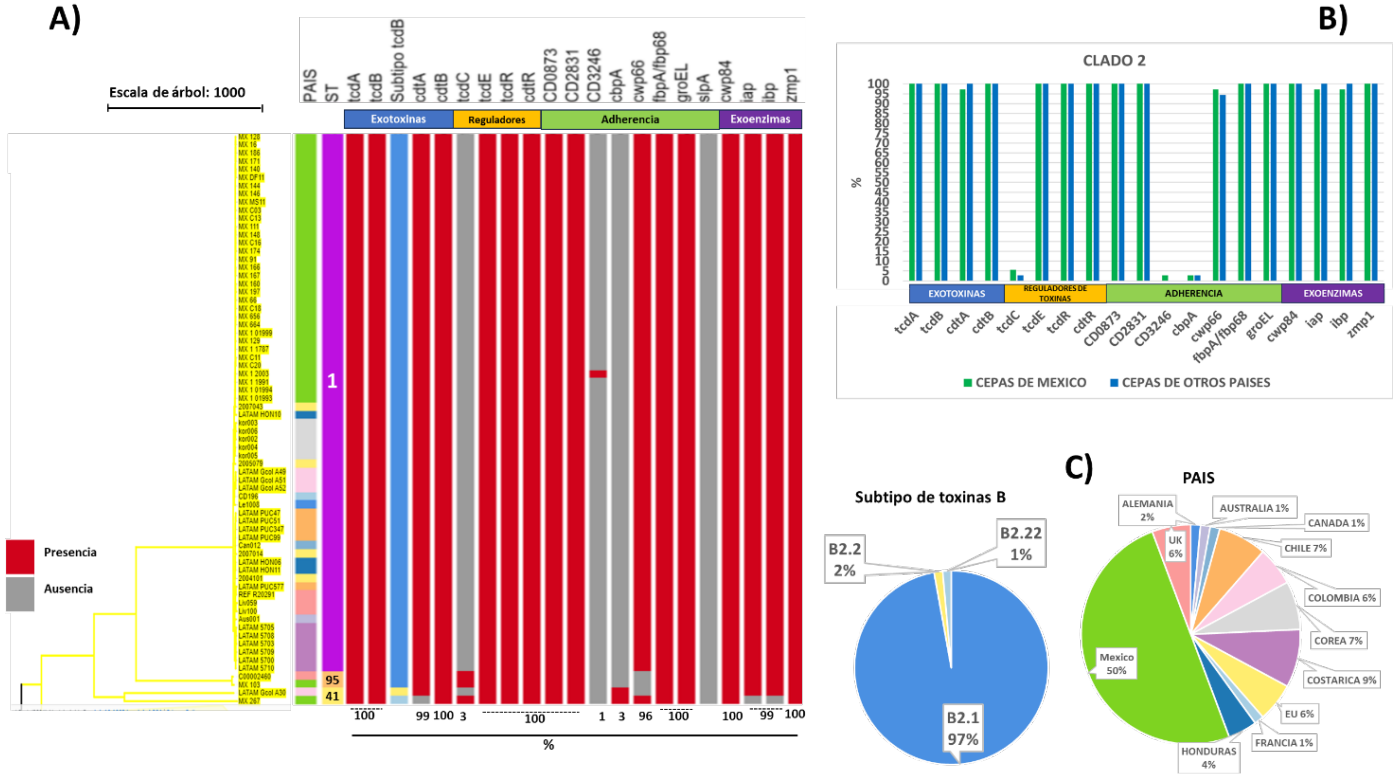


Figura 29. Análisis comparativo de genes de virulencia en cepas del clado 2 entre cepas mexicanas y de otros países

A) Árbol filogenético basado en cgMLST y gráfico de presencia/ausencia de genes de virulencia

B) Gráfico porcentual de distribución de genes de virulencia

C) Gráficos circulares de los porcentajes de distribución de los subtipos de toxinas B presentes en las cepas, y porcentajes de distribución de los países a los que pertenecen las cepas analizadas.

Determinación del viruloma realizado mediante la base de datos VFDB de ABRicate v1.0.1, y AMRFinderPlus v3.10.24. Edición y visualización del gráfico realizado mediante Microreact.

CLADO 1

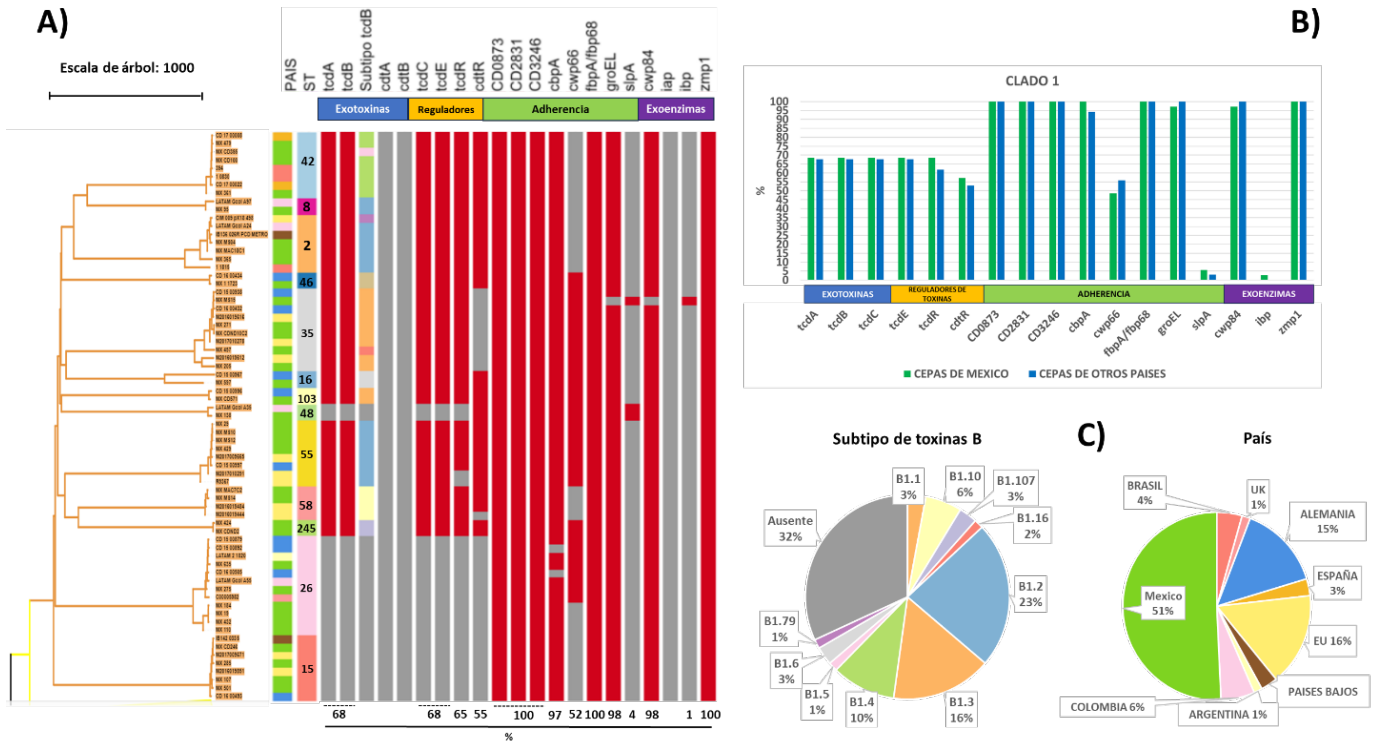


Figura 30. Análisis comparativo de genes de virulencia en cepas del clado 1 entre cepas mexicanas y de otros países
 A) Árbol filogenético basado en cgMLST y gráfico de presencia/ausencia de genes de virulencia
 B) Gráfico porcentual de distribución de genes de virulencia
 C) Gráficos circulares de los porcentajes de distribución de los subtipos de toxinas B presentes en las cepas, y porcentajes de distribución de los países a los que pertenecen las cepas analizadas

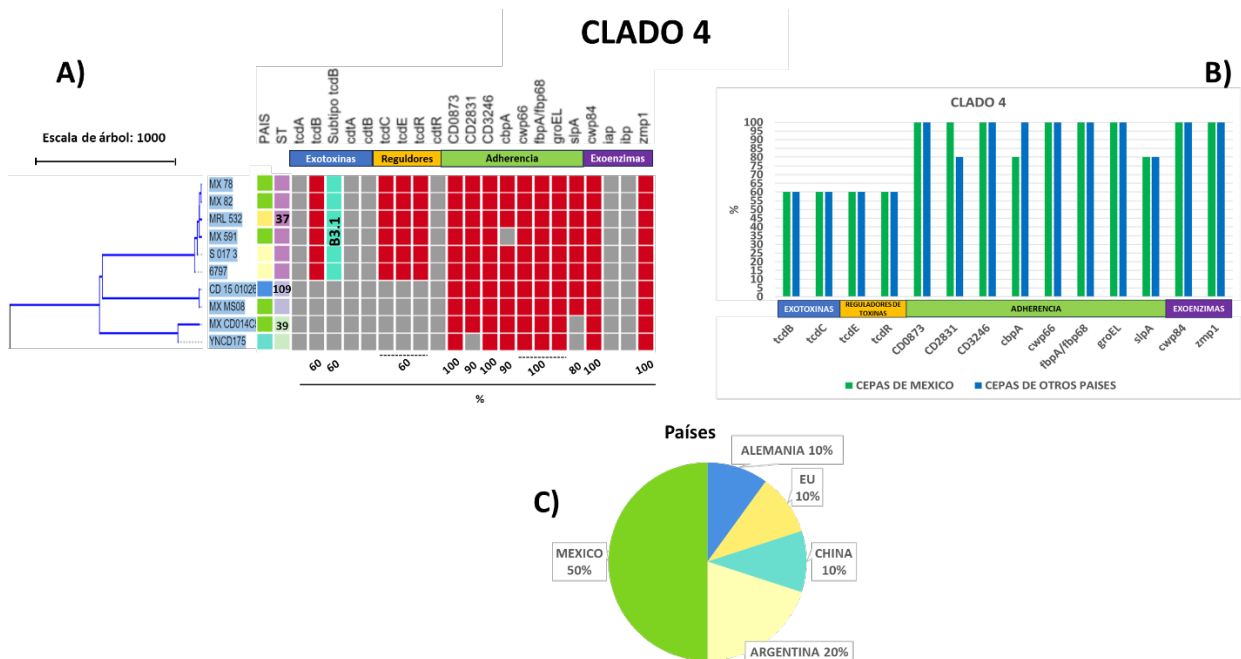


Figura 31. Análisis comparativo de genes de virulencia en cepas del clado 4 entre cepas mexicanas y de otros países
 A) Árbol filogenético basado en cgMLST y gráfico de presencia/ausencia de genes de virulencia
 B) Gráfico porcentual de distribución de genes de virulencia
 C) Gráfico circular de los porcentajes de distribución de los países a los que pertenecen las cepas analizadas

El análisis de los factores de virulencia en las 9 cepas de Puebla, México, secuenciadas en este estudio reveló notables similitudes con cepas del mismo ST (**Figura 32**). De las 8 cepas, 7 pertenecieron al clado 1, mientras que una cepa fue asignada al clado 4. La cepa R20291 del clado 2 se incorporó como genoma de referencia para la identificación de factores de virulencia. Entre las características observadas, 7 cepas exhibieron los genes de toxinas TcdA y TcdB, así como los reguladores *tcdC*, *tcdE* y *tcdR*, mientras que mostraron ausencia de los genes *slpA* y de las exoenzimas *iap* e *ibp*. En contraste, las cepas ST015 del clado 1 y la cepa ST39 del clado 4 no presentaron genes de toxinas ni sus reguladores.

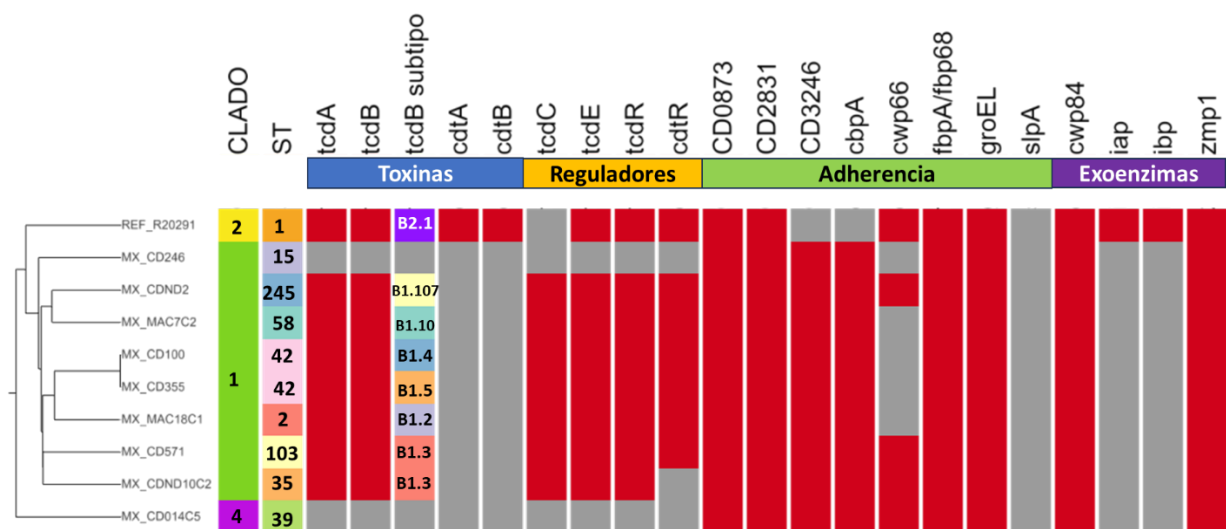


Figura 32. Análisis de los factores de virulencia identificados en las 9 cepas secuenciadas en el presente estudio Árbol filogenético basado en cgMLST relacionado con la presencia y ausencia de genes. 8 cepas pertenecen al clado 1, y una cepa pertenece al clado 4. Se incorporo la cepa de referencia R20291 del clado 2 como control para la identificación de factores de virulencia.

La construcción de tablas de comparación permitió mostrar una gran similitud entre la distribución de genes de virulencia en los STs y clados de cepas mexicanas y de otros países. Los datos simplificados se detallan en las **Tabla 11**

Tabla 12. Distribución de los genes de virulencia en los clados y STs en cepas mexicanas y de otros países

CLADO	MLST	Zhao et al., 2021	Numero de cepas	tcdA	tcdB	Subtipo tcdB	cdtA	cdtB	tcdC	tcdE	tcdR	cdtR	CD3246	cbpA	cwp66	slpA	iap	ibp
ST	RT			Toxinas			Reguladores						Adherencia			Exoenzimas		
2	ST-1	027	66			B2.1												
2	ST-41	244/378	2			B2.22												
2	ST-95	075	2			B2.1												
1	ST-2	014/020	7			B1.2												
1	ST-8	2	2			B1.2												
1	ST-15	10	8															
1	ST-16	29	2			B1.6												
1	ST-26	39	12															
1	ST-35	46	10			B1.3/B1.16												
1	ST-42	106	8			B1.4/B1.5												
1	ST-46	087	2			B1.1												
1	ST-48	104	2															
1	ST-55	057/070	8			B1.2												
1	ST-58	056	4			B1.10												
1	ST-103	043	2			B1.3												
1	ST-245	-	2			B1.107												
4	ST-37	017	6			B3.1												
4	ST-39	085	2															
4	ST-109	073	2															

Ausencia
 Presencia
 Presencia variable

Los STs están organizados en sus respectivos clados, y se asocian con sus correspondientes Ribotipos (RT) según el esquema de tipificación de Zhao *et al.*, 2021. Además, se proporciona información sobre el número de cepas analizadas en las cuales se identificaron los factores de virulencia.

La representación gráfica distingue claramente la presencia, ausencia y presencia variable de los factores de virulencia. La presencia variable se refiere a la condición en la que un factor de virulencia específico en un ST particular se observó tanto en cepas con presencia como en aquellas con ausencia de dicho factor, indicando una variabilidad en su manifestación.

6.2.6 Análisis de comparación del resistoma entre cepas mexicanas y de otros países

El análisis *in silico* para la evaluación de presencia de genes o mutaciones asociados a resistencia reveló notables diferencias entre cepas de origen mexicano y aquellas procedentes de otros países. En total, se identificaron 35 genes de resistencia, 4 plásmidos movilizables y 11 mutaciones puntuales asociados al resistoma de *C. difficile*. Estos elementos estuvieron asociados con 12 clases de antimicrobianos, incluyendo glucopéptidos, nitroimidazoles, aminoglucósidos, beta-lactámicos, fosfomicina, macrólidos-lincosamidas-estreptomicinas (MLS), Fenicoles, Quinolonas, tetraciclinas, trimetoprima y rifampicina. En la **Tabla 12** se describen los determinantes de resistencia antimicrobiana y su función, identificados en las cepas analizadas.

Tabla 13. Resistoma identificado en las cepas analizadas

GEN	TIPO DE ELEMENTO	SUBCLASE DE ANTIMICROBIANO	FUNCIÓN
Glucopéptidos			
<i>vanG</i>	GEN	Vancomicina	D-alanine--D-serine ligase VanG-Cd
<i>vanR-Cd</i>	GEN	Vancomicina	Regulador de respuesta a la resistencia a la vancomicina del factor de transcripción VanR-G-Cd.
<i>vanS-Cd</i>	GEN	Vancomicina	Quinasa de histidina de resistencia a la vancomicina tipo VanG-Cd VanS.
<i>vanT-Cd</i>	GEN	Vancomicina	Serina racemasa de membrana VanT-Cd.
<i>vanZ1</i>	GEN	Teicoplanida	Proteína de resistencia a glicopéptidos VanZ1.
<i>VanR_T115A</i>	MUTACIÓN	Vancomicina	Mutación en el regulador de transcripción VanR.
Nitroimidazoles			
<i>PCD-METRO</i>	PLASMIDO	METRONIDAZOL	Plasmido asociado a resistencia en metronidazol
Aminoglucósidos			
<i>aac(6)-Ie/aph(2'')-Ia</i>	GEN	AGKT	Acetiltransferasa bifuncional de aminoglucósidos AAC(6)-Ie/fosfotransferasa de O de aminoglucósidos APH(2'')-Ia.
<i>aac(6)-Ie/aph(2'')-If2</i>	GEN	AGKT	Acetiltransferasa bifuncional de aminoglucósidos AAC(6)-Ie2/fosfotransferasa de O de aminoglucósidos APH(2'')-If2.
<i>aac(6)-Im</i>	GEN	AGKT	Acetiltransferasa de N-acetilación de aminoglucósidos AAC(6)-Im.
<i>aadA27</i>	GEN	Espectinomina/Estreptomina	Nucleotidiltransferasa de aminoglucósidos de la familia ANT(3'')-II, AadA27.
<i>aadE</i>	GEN	Estreptomina	Adeniltransferasa de aminoglucósidos AadE.
<i>ant(6)-Ia</i>	GEN	Estreptomina	Nucleotidiltransferasa de aminoglucósidos ANT(6)-Ia.
<i>aph(2'')-If</i>	GEN	AGKT	Fosfotransferasa de O de aminoglucósidos APH(2'')-If.
<i>aph(2'')-IIa</i>	GEN	AGKT	Fosfotransferasa de O de aminoglucósidos APH(2'')-IIa.
<i>aph(3'')-IIIa</i>	GEN	Amikacina/Kanamicina	Fosfotransferasa de O de aminoglucósidos APH(3'')-IIIa.
<i>spw</i>	GEN	Aminoglucósidos	Nucleotidiltransferasa de aminoglucósidos de la familia ANT(9), Spw.
<i>sat4</i>	GEN	Estreptomina	Acetiltransferasa de streptotricina Sat4.
<i>rep1_6_repE(pTEF1)</i>	PLASMIDO	AGKT	Contiene el gen AAC(6)-Ie-APH(2'')-Ia.
Beta-lactámicos			
<i>blaCDD</i>	GEN	Beta-lactámicos	Beta-lactamasa de clase D CDD-1.
<i>blaCDD-1</i>	GEN	Beta-lactámicos	Beta-lactamasa de clase D CDD-1.
<i>blaCDD-2</i>	GEN	Beta-lactámicos	Beta-lactamasa de clase D CDD-2.
Fosfomicina			
<i>fosB</i>	GEN	Fosfomicina	Transferasa de baciliteol asociada a la resistencia a la fosfomicina FosB3.
MLS			
<i>cfrr(B)</i>	GEN	MLS	Metiltransferasa de ARNr 23S (adenina(2503)-C(8)) Cfr(B).
<i>cfrr(C)</i>	GEN	MLS	Metiltransferasa de ARNr 23S (adenina(2503)-C(8)) Cfr(C).
<i>cfrr(E)</i>	GEN	MLS	Metiltransferasa de ARNr 23S (adenina(2503)-C(8)) Cfr(E).
Macrólidos			
<i>erm(52)</i>	GEN	Macrólidos	Metiltransferasa de ARNr 23S (adenina(2058)-N(6)) Erm(52).
<i>erm(B)</i>	GEN	Macrólidos	Metiltransferasa de ARNr 23S (adenina(2058)-N(6)) Erm(B).
<i>erm(Q)</i>	GEN	Macrólidos	Metiltransferasa de ARNr 23S (adenina(2058)-N(6)) Erm(Q).
<i>mef(A)</i>	GEN	Eritromicina	Transportador MFS (sistema de facilitación múltiple) para el efuxo de macrólidos Mef(A).
<i>C656T</i>	MUTACIÓN	Eritromicina	ARNr 23S con mutación que confiere resistencia a los antibióticos macrólidos.
Fenicoles			
<i>catP</i>	GEN	Cloranfenicol	Acetiltransferasa O de cloranfenicol tipo A-11 CatP.
Quinolonas			
<i>qnrB19</i>	GEN	Quinolonas	Proteína de repetición de pentapéptido de resistencia a quinolonas QnrB19.
<i>ColIRNAI_1</i>	PLASMIDO	Quinolonas	Gen QnrB10, protección del blanco del antibiótico.
<i>gyrA_T82I</i>	MUTACIÓN	Quinolonas	Subunidad A de la girasa del ADN GyrA.
<i>gyrB_D426N</i>	MUTACIÓN	Quinolonas	Subunidad B de la topoisomerasa del ADN (hidrolizando ATP) GyrB.
<i>gyrB_I139R</i>	MUTACIÓN	Quinolonas	Subunidad B de la topoisomerasa del ADN (hidrolizando ATP) GyrB.
<i>gyrB_S366A</i>	MUTACIÓN	Quinolonas	Subunidad B de la topoisomerasa del ADN (hidrolizando ATP) GyrB.
<i>gyrB_S366V</i>	MUTACIÓN	Quinolonas	Subunidad B de la topoisomerasa del ADN (hidrolizando ATP) GyrB.
<i>gyrB_S416A</i>	MUTACIÓN	Quinolonas	Subunidad B de la topoisomerasa del ADN (hidrolizando ATP) GyrB.
<i>gyrB_V130I</i>	MUTACIÓN	Quinolonas	Subunidad B de la topoisomerasa del ADN (hidrolizando ATP) GyrB.
Tetraciclinas			
<i>tet(M)</i>	GEN	Tetraciclinas	Proteína de protección ribosomal de resistencia a tetraciclina Tet(M).
<i>tet(O)</i>	GEN	Tetraciclinas	Proteína de protección ribosomal de resistencia a tetraciclina Tet(O).
<i>tetA(P)</i>	GEN	Tetraciclinas	Transportador de efuxo de tetraciclina MFS TetA(P).
<i>tetB(P)</i>	GEN	Tetraciclinas	Proteína de protección ribosomal de resistencia a tetraciclina TetB(P).
<i>repUS43_1</i>	PLASMIDO	Tetraciclinas	Genes tet(M), tet(45): bomba de efuxo de antibióticos de la superfamily mayor facilitador superfamily (MFS).
Timetroprim			
<i>dfrF</i>	GEN	Timetroprim	Dihidrofolato reductasa resistente a trimetoprim DfrF.
Rifampicina			
<i>rpoB_H502N</i>	MUTACIÓN	Rifampicina	Subunidad beta de la ARN polimerasa dirigida por ADN RpoB.
<i>rpoB_R505K</i>	MUTACIÓN	Rifampicina	Subunidad beta de la ARN polimerasa dirigida por ADN RpoB.

Se realizaron gráficos de comparación del resistoma de cepas de México y de otros países,

revelando diferencias significativas, especialmente en la distribución de entre los clados y STs. A continuación, se describen las principales diferencias y similitudes.

clado 2:

En el análisis comparativo del resistoma entre cepas mexicanas y de otros países en el clado 2 se identificó la presencia del clúster de *genes vanG* (*vanR*, *vanS*, *vanT*) en el 100% de las cepas, tanto en cepas de origen mexicano como en aquellas provenientes de otros países (**Figura 33**). La mutación en *vanR* T115A exhibió una diferencia significativa, registrándose en el 94% de las cepas mexicanas, mientras que solo se observó en el 23% de las cepas provenientes de otros países.

En cuanto a la presencia de genes de resistencia a aminoglucósidos, se detectó en un rango del 0 al 14%. Los genes *blaCDD*, asociados a la resistencia a betalactámicos, estuvieron presentes en el 100% de ambas categorías de cepas. Por otro lado, los genes *cfrr(E)*, relacionados con la resistencia a MLS, mostraron una presencia significativa del 89% exclusivamente en cepas mexicanas.

En el caso de los genes *erm(B)* de resistencia a macrólidos, se identificó su presencia en el 94% de las cepas mexicanas, en contraste con el 43% en cepas originarias de otros países. La mutación *C656T*, asociada a la resistencia a macrólidos, presentó una mayor frecuencia en cepas de otros países, alcanzando el 54%.

En relación con las mutaciones asociadas a la resistencia en quinolonas, la mutación *gyrA_T82I* estuvo presente en el 94% de las cepas mexicanas, comparado con el 80% en las cepas de otros países. La mutación *rpoB_R505K*, vinculada a la resistencia a rifampicina, se evidenció en el 94% de las cepas mexicanas, en contraste con el 23% en cepas provenientes de otros países.

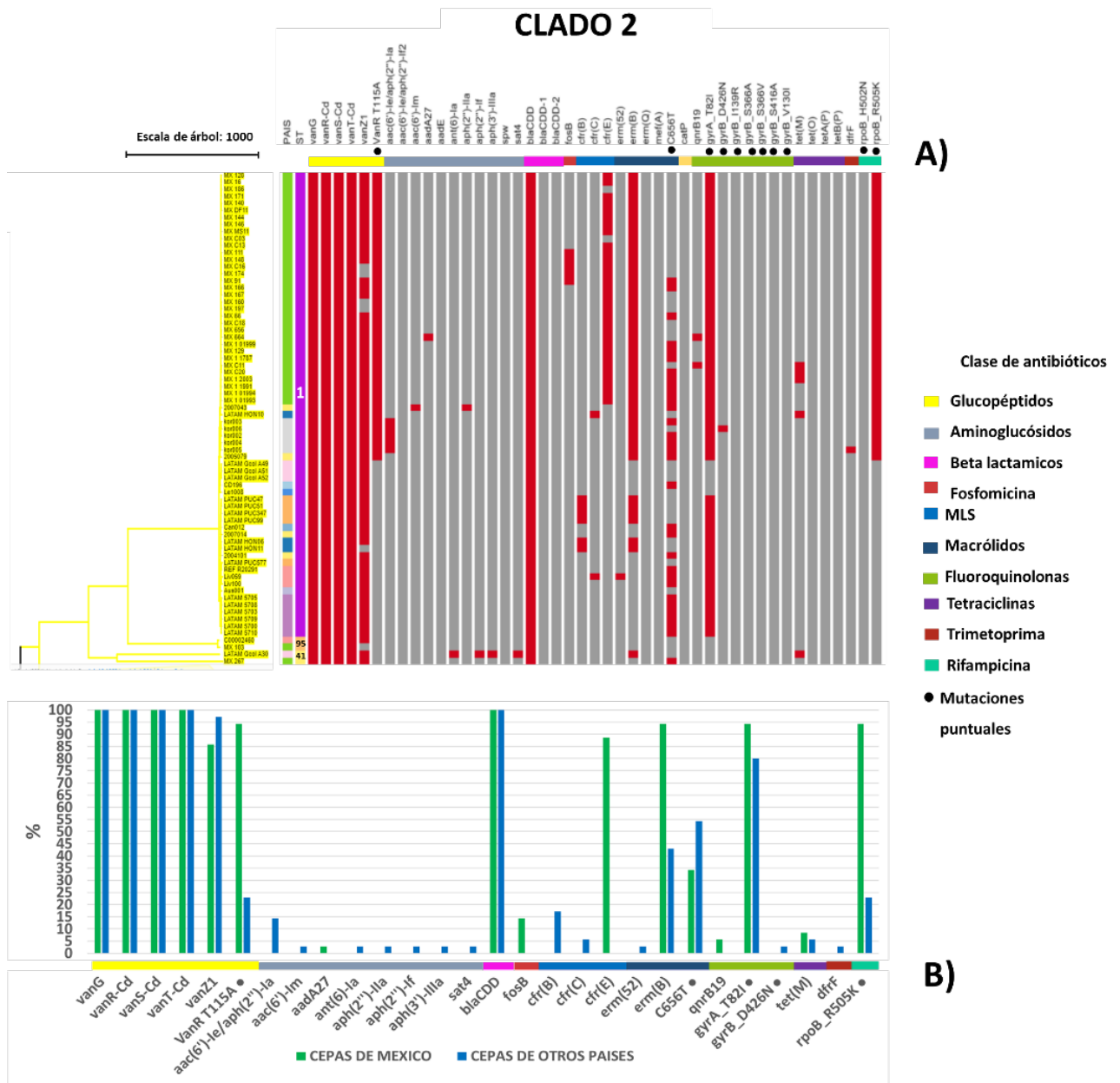


Figura 33. Análisis comparativo del resistoma entre cepas mexicanas y de otros países en el clado 2

A) Árbol filogenético basado en cgMLST correlacionado con la presencia/ausencia de genes de resistencia
 B) Gráfico porcentual de la comparación del resistoma en cepas del clado 2 aisladas de México y de otros países

clado 1:

En el análisis comparativo de entre cepas mexicanas y de otros países en el clado 1 (**Figura 34**), se constató la presencia del clúster de genes *vanG* (*vanR*, *vanS*, *vanT*) en el 100% de las cepas, tanto en las de origen mexicano como en las procedentes de otros países. La

presencia de genes de resistencia a aminoglucósidos varió del 0 al 32%, tanto en las cepas mexicanas como en las de otros países. Los genes *blaCDD* mostraron porcentajes similares, registrando el 86% en cepas mexicanas y el 82% en cepas de otros países. Se observó un mayor porcentaje de la mutación *C656T* en cepas mexicanas. Además, se destacó la ausencia de mutaciones en *rpoB* en cepas mexicanas.

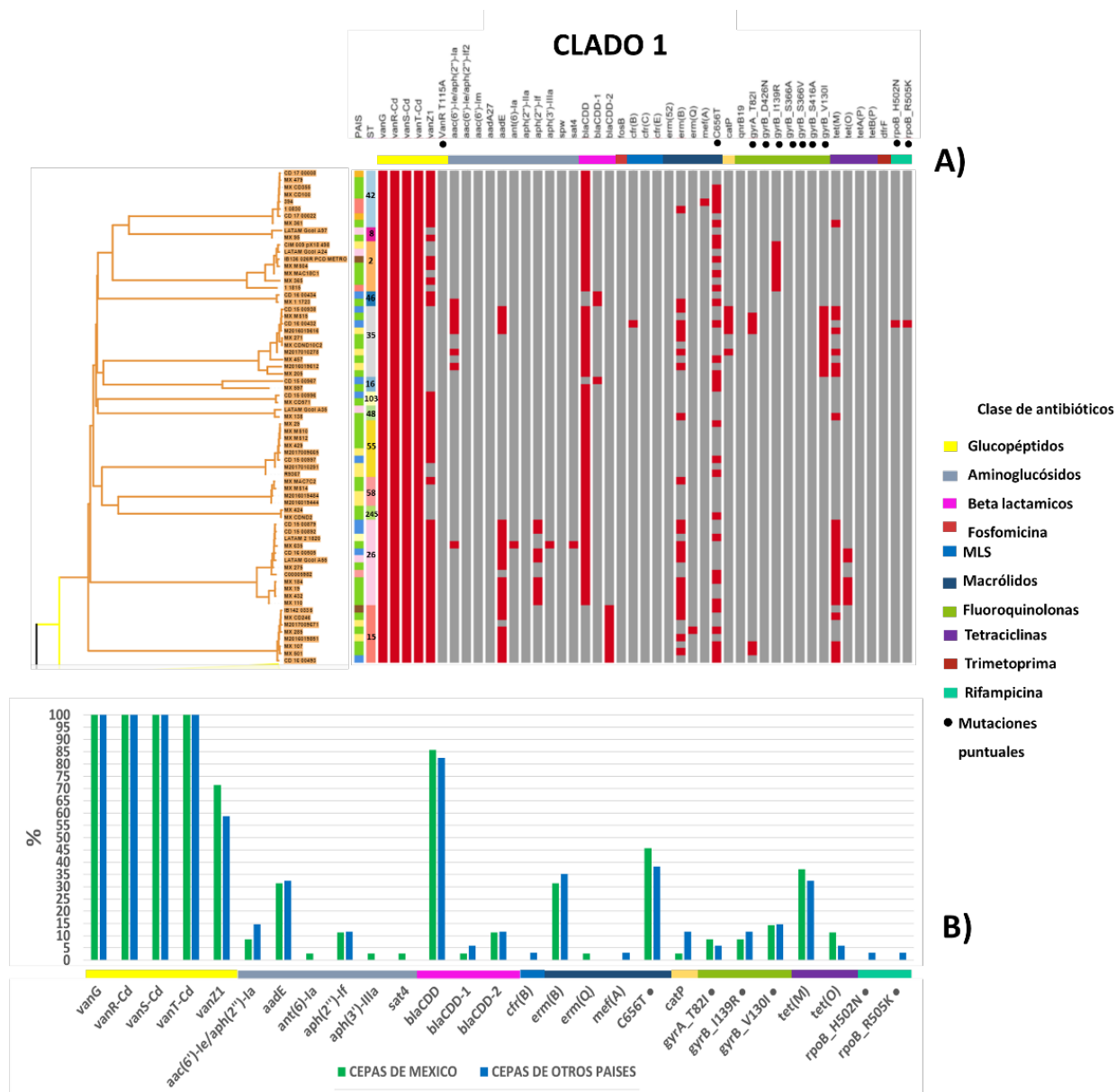


Figura 34. Análisis comparativo del resistoma entre cepas mexicanas y de otros países en el clado 1

A) Árbol filogenético basado en cgMLST correlacionado con la presencia/ausencia de genes de resistencia

B) Gráfico porcentual de la comparación del resistoma en cepas del clado 1 aisladas de México y de otros países

clado 4:

En este clado no se identificaron los genes correspondientes al clúster *vanG*. Así mismo, se identificó la ausencia de mutaciones en *VanR* T115A. Además, se observó una notoria carencia de genes *fosB*, *cfi(B)*, y mutaciones en *rpoB* en las cepas mexicanas (**Figura 35**).

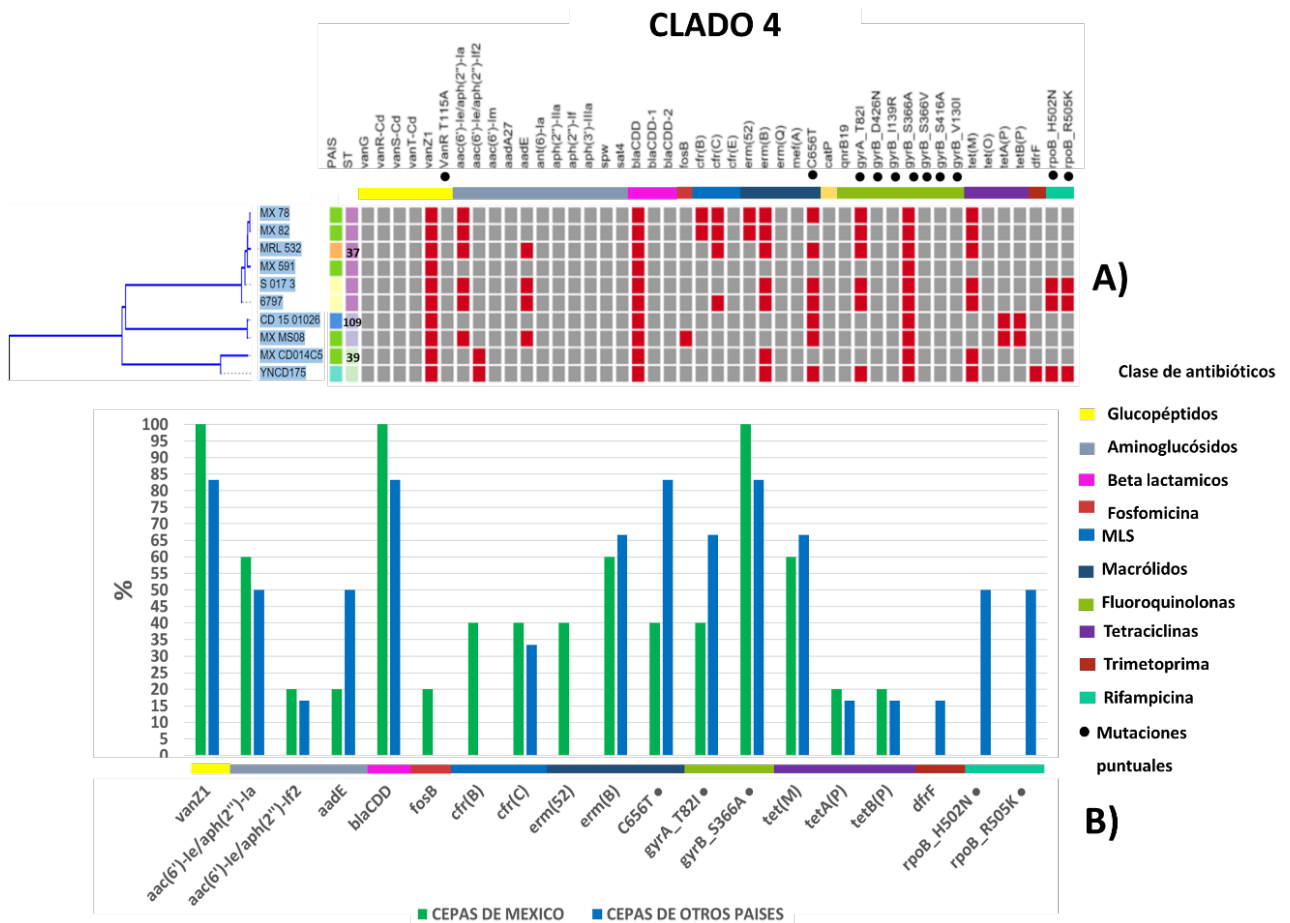


Figura 35. Análisis comparativo del resistoma entre cepas mexicanas y de otros países en el clado 4

A) Árbol filogenético basado en cgMLST correlacionado con la presencia/ausencia de genes de resistencia
 B) Gráfico porcentual de la comparación del resistoma en cepas del clado 4 aisladas de México y de otros países

El análisis detallado de las 9 cepas secuenciadas en el presente estudio mostró gran similitud con respecto a los mismos STs que se evaluaron en todo el conjunto de 110 cepas mexicanas de *C. difficile*. Se correlacionó el análisis bioinformático del resistoma con la resistencia fenotípica evaluada mediante pruebas de susceptibilidad por concentración mínima inhibitoria (CMI). Se observó que todas las cepas demostraron sensibilidad a la

vancomicina, sin identificarse determinantes genotípicos relacionados con la resistencia a este antimicrobiano (**Figura 36**).

Las cepas R20291 y ST 245 exhibieron resistencia aumentada al metronidazol, no se identificaron determinantes genotípicos asociados. La resistencia a cefotaxima fue común en todas las cepas, excepto en la cepa MX_MAC7C2 del ST58, identificándose los genes *blaCDD* y *blaCDD-2* relacionados con la resistencia a betalactámicos.

Las cepas que manifestaron resistencia a la eritromicina exhibieron determinantes genéticos específicos, como la presencia del gen *erm(B)* y la mutación C656T, los cuales están asociados con la resistencia a los macrólidos. En contraste, las cepas MX_MAC7C2 y MX_CD571, pertenecientes a los ST58 y ST103, respectivamente, demostraron sensibilidad fenotípica, y no se detectó la presencia de los genes *erm(B)* ni la mutación C656T en ellas.

La resistencia al cloranfenicol se observó solo en la cepa de referencia R20291, sin embargo, no se identificaron determinantes genéticos vinculados con esta resistencia. Todas las cepas fueron sensibles a tetraciclina, sin embargo, se identificaron genes *tet(M)* en 2 cepas ST015 clado 1 y ST39 clado 4, siendo esta última portadora del plásmido repUS43 que contiene el gen *tet(M)*.

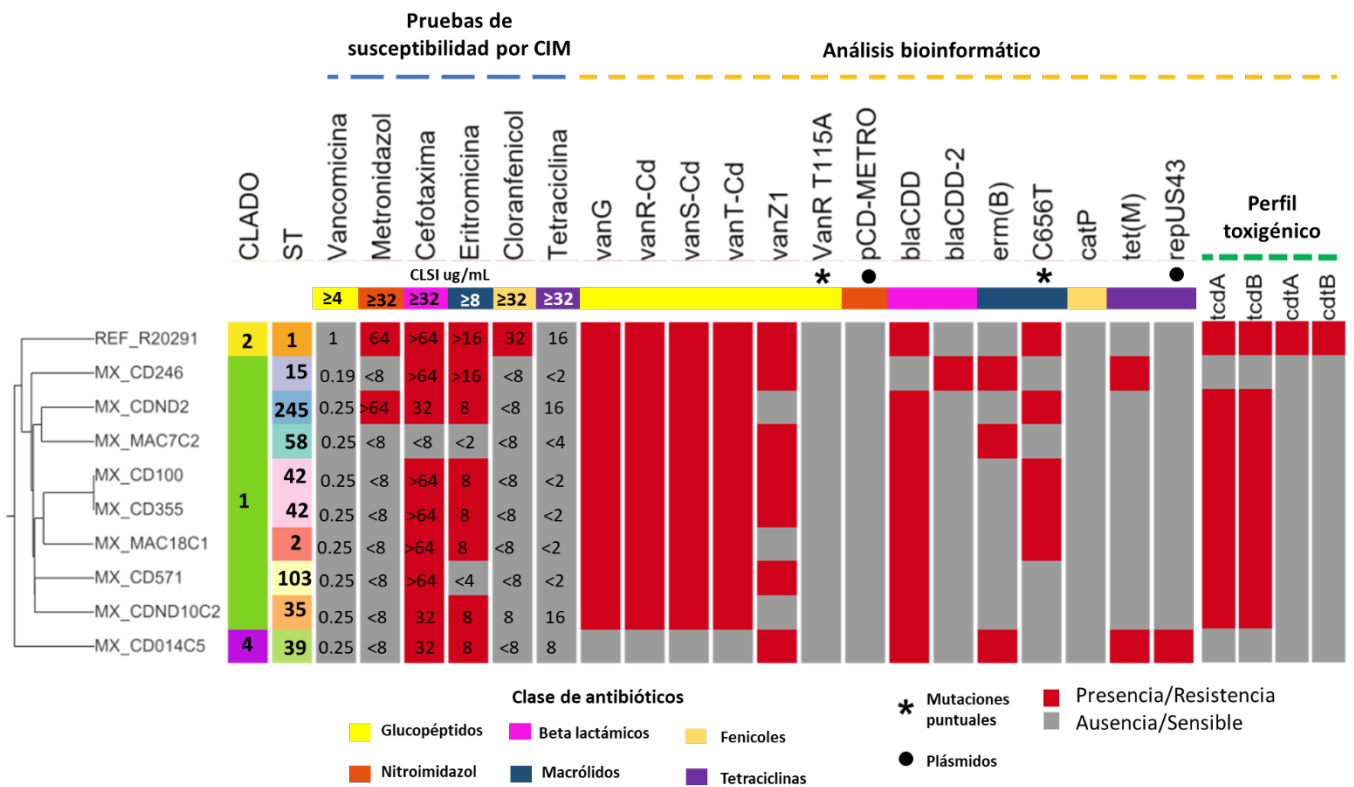


Figura 36. Correlación entre resistoma y su evaluación fenotípica en 9 cepas secuenciadas en el presente estudio
 Se presenta un árbol filogenético basado en cgMLST que incluye las 9 cepas secuenciadas en este estudio, junto con la cepa de referencia R20291 utilizada como control en las pruebas de susceptibilidad. Esta representación se correlaciona con la identificación del resistoma y el perfil toxigénico mediante análisis bioinformático. En el gráfico, se exhiben los valores de las CIM de cada cepa, así como los puntos de corte según los estándares del CLSI M11 para microorganismos anaerobios.

En el análisis de la presencia de plásmidos en las cepas analizadas (**Figura 37**) se observó que en las cepas del clado 2, se detectó la presencia del plásmido pCD-METRO, relacionado con la resistencia a metronidazol, en un 6% de las cepas mexicanas, mientras que en las cepas de otros países de este clado no se observó la presencia de dicho plásmido.

En ninguna las cepas mexicanas, se identificó la presencia del plásmido Ptef1, vinculado a la resistencia a aminoglucósidos. En cepas de otros países, se registró un 3% en el clado 1 y un 15% en el clado 4.

La presencia del plásmido ColRNAI_1, asociado a la resistencia a quinolonas, solo se observó en un 6% de las cepas mexicanas del clado 2, sin embargo, en cepas de otros países no se identificó la presencia del plásmido en ningún clado.

En relación con el plásmido repUS43, asociado con la resistencia a tetraciclinas, se evidenció una distribución porcentual similar entre los clados, tanto en las cepas mexicanas como en las provenientes de otros países. Por ejemplo, en el clado 2, se observó en un 3% tanto en cepas mexicanas como en las de otros países. En el clado 1, se registró en un 31% de cepas mexicanas y en un 32% de cepas de otros países. Por último, en el clado 4, se identificó en un 60% de cepas mexicanas y en un 80% de cepas de otros países.

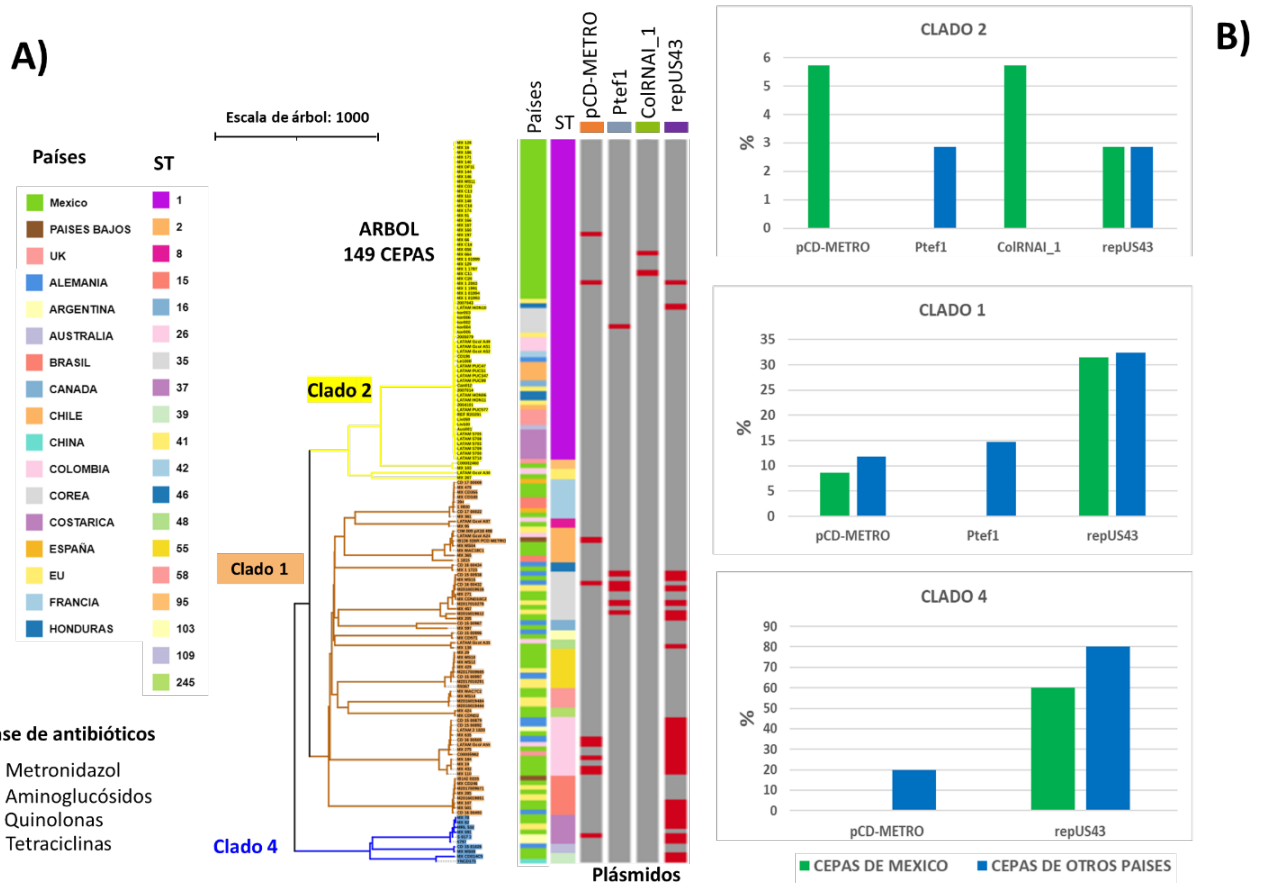


Figura 37. Gráfico Comparativo de Identificación de Plásmidos en 149 cepas Analizadas

A) Representación del árbol filogenético basado en cgMLST, con una correlación destacada respecto a la presencia o ausencia de plásmidos en las cepas examinadas.

B) Gráficos porcentuales segmentados por clados, ilustrando de manera diferenciada la comparación en la presencia de plásmidos entre cepas de origen mexicano y aquellas procedentes de otros países.

7. DISCUSIÓN

La presente investigación ofrece el primer estudio de genómica comparativa entre cepas mexicanas y cepas aisladas en otros países, ofreciendo una visión más detallada de la diversidad genómica, el pangenoma, factores de virulencia, resistencia antimicrobiana y patrones filogenéticos de *C. difficile* en México, estableciendo comparaciones significativas con estudios previos realizados en diversas regiones geográficas.

7.1 Diversidad genómica y filogenia

Los árboles filogenéticos basados en cgMLST han sido fundamentales para revelar la relación genética entre las 9 cepas secuenciadas en este estudio analizadas en conjunto con 66 genomas de cepas mexicanas y 74 genomas de cepas de otros países recuperados de bases de datos públicas. Nuestro estudio, específicamente, identificó cepas pertenecientes a los clados 1, 2 y 4. Sin embargo, investigaciones previas, como la de Aguilar-Zamora *et al.*, 2022, han informado la presencia de otros clados en México, como el clado 5 y un clado críptico, aunque hasta la fecha no se hay estudios que evidencien la presencia del clado 3 en México. De acuerdo con lo reportado por Shaw *et al.*, 2020 el clado 3 es el menos caracterizado y consiste predominantemente en cepas del ribotipo PCR (RT) 023 encontradas en algunos países de Europa y Asia.

En nuestro análisis resalta la prevalencia en el 44% de la cepa hipervirulenta ST01, productora de toxinas A, B y CDT. Esto coincide y amplía los estudios previos reportados por Aguilar-Zamora *et al.*, 2022 y Zhao *et al.*, 2021. Ambos estudios coinciden en la identificación de hasta 20 STs diferentes en México, con cepas predominantemente toxigénicas (87.2%), especialmente del clado 2 y clado 1, siendo ST01 el más predominante.

En el clado 1 los STs más destacados fueron ST26 (8%) relacionado con RT039, una cepa no toxigenica aislada en animales y medio ambiente, hasta el momento no se ha relacionado con ICD de acuerdo con lo reportado por Mengoli *et al.*, 2022. Así mismo, el ST35 (7%) vinculado con RT046, el cual de acuerdo con lo reportado por Mengoli *et al.*, 2022 se ha

observado su incremento en hospitales de Brasil asociándose a ICD.

Es importante destacar que mediante la clasificación cgST se observó que las cepas del clado 2 comparten un mayor número de cgSTs dentro de las cepas de un mismo país, específicamente en México se encontró en el 5% de las cepas (n=7) presentaron cgST 20031 en cepas ST01 del clado 2. Sin embargo, las cepas de los clados 2 y 4, aunque comparten el mismo ST, mostraron variabilidad en las secuencias cgST, lo cual coincide con lo reportado por Elliott *et al.*, 2017, en donde destaca que las cepas de los clados 1, 3,4 y 5 distintos al clado 2 tienen orígenes genéticos más distantes o han estado sujetos a diferentes presiones evolutivas a lo largo del tiempo.

7.2 Pangenoma y variabilidad genética:

En el análisis del pangenoma de *C. difficile*, se evaluaron cepas de México y otros países, revelando un pangenoma “abierto” en ambos grupos, esto coincide con la noción de que el pangenoma de *C. difficile* es dinámico y puede expandirse continuamente con la secuenciación de nuevas cepas, respaldando hallazgos previos de otros estudios como el realizado por Scaria *et al.*, 2010 y Knight *et al.*, 2019, en donde llevó a cabo un análisis del pangenoma de *C. difficile* utilizando 260 ST distribuidas en 5 clados y 3 clados crípticos (CI,CII,CIII), mostrando igualmente un pangenoma abierto.

La matriz de presencia y ausencia de genes en el pangenoma realizado con Roary, permitió visualizar la comparación de tamaños de genoma central y genes accesorios entre diferentes clados de *C. difficile* revelando patrones notables interesantes. El clado 2, dominado por cepas hipervirulentas ST01, exhibe un genoma central amplio y genes accesorios menos dispersos, contrastando con los genes accesorios más dispersos en los clados 1 y 4. Estos resultados coinciden con observaciones realizadas por Knight *et al.* 2019 y Dingle *et al.*, 2014, destacando la observación de un genoma central más pequeño pero una mayor dispersión de genes adicionales en cepas de los clados 1 y 4 sugiere una adaptación genética única en estas cepas, siendo esta capacidad relacionada con su virulencia y singular adaptabilidad.

7.3 Comparación del viruloma identificado en cepas de *C.difficile*

El análisis de los factores de virulencia reveló similitudes notables en la distribución de genes de toxinas entre cepas mexicanas y de otros países. Sin embargo, se identificaron grandes diferencias en la distribución de factores de virulencia entre clados y STs. En general se identificaron 20 genes de virulencia, incluyendo genes de toxinas, reguladores de toxinas, genes que participan en la adherencia y exoenzimas. Además, también se realizó la subtipificación de toxinas TcdB.

Nuestro estudio identificó múltiples subtipos de toxinas B, siendo cuatro los subtipos específicos detectados en las cepas analizadas (B1, B2, B3 y B5) con sus respectivos subtipos en cada uno. En donde se identificó una mayor presencia del subtipo TcdB2.1 presente en cepas ST01 clado 2. Esto concuerda con los hallazgos de Mansfield *et al.*, 2020, quienes identificaron la prevalencia global de TcdB2, en ciertos subtipos de TcdB que pueden estar asociados con cepas más virulentas

En nuestro estudio no se observó que algún subtipo de toxina TcdB se compartiera entre clados, por ejemplo, los subtipos de toxinas TcdB2 solo se identificaron en cepas del clado 2, los subtipos TcdB1 en cepas del clado 1 y los subtipos TcdB3 en cepas del clado 4. Contrario a lo reportado por Shen *et al.* 2020 en donde sugieren la posibilidad de transferencia horizontal y el intercambio de los genes *tcdB* entre diferentes cepas y regiones geográficas. Esta discrepancia podría deberse a diferencias en las cepas analizadas o a la diversidad geográfica considerada en cada estudio.

En nuestro estudio, hemos observado que el 98% de las cepas analizadas conservan genes de adherencia, tales como *CD0873*, *CD2831*, *fbpA/fbp68*, *groEL*, y exoenzimas como *cwp84* y *zmp*. Este hallazgo coincide con resultados previamente reportados por Oleastro *et al.*, 2022, y Maestri *et al.*, 2023, donde se encontró una alta presencia de estos factores de virulencia en cepas de diferentes secuencias tipificadas (ST) aisladas en diversas regiones geográficas. Estos resultados sugieren que estos genes son constitutivos en la especie *C. difficile*.

Contrariamente, hemos observado que en todas las cepas del clado 2 están ausentes ciertos genes de proteínas cruciales para la adhesión y la formación de biofilm, como *CD3246*, *cbpA* y *slpA*. Los genes *CD3246* y *cbpA* solo estuvieron presentes en cepas de los clados 1 y 4. El gen de la proteína *slpA* solo estuvo presente en el 5% de cepas del clado 1, como ST35 en cepas mexicanas, y ST48 en cepas de otros países. En cepas ST37 y ST109 del clado 4, estuvo presente en ambos grupos. Estos patrones coinciden con los resultados previamente informados por Oleastro *et al.*, 2022, donde se analizaron diversas cepas con distintos STs, señalando que la presencia no es uniforme en todas las cepas.

Todas las cepas del ST01 del clado 2 exhibieron la presencia de las toxinas (TcdA, TcdB y CDT) así como los genes reguladores *tcdE*, *tcdR* y *cdtR*. Además, mostraron la ausencia del regulador negativo *tcdC*, característica que se alinea con informado por Matamouros *et al.*, 2007, en donde se sugiere que el gen *tcdC* actúa como regulador negativo en la producción de toxinas en el locus de patogenicidad (PaLoc) de *C. difficile*. Según lo descrito por Matamouros *et al.*, 2007, las deleciones en este gen afectan la función regulatoria, lo que podría explicar la alta presencia de los genes de toxinas en esta cepa.

Existen pocos estudios sobre la participación del gen regulador *tcdC* en clados adicionales de *C. difficile*. Uno de ellos, llevado a cabo por Bakker *et al.*, 2012, sugiere que *tcdC* no desempeña un papel significativo en la regulación de la expresión de toxinas en la cepa *C. difficile* 630 (RT012, ST54 del clado 1). A pesar de la presencia del regulador *tcdC*, esta cepa presentó las toxinas A y B. Otro estudio realizado por Murray *et al.*, 2009, observó que el truncamiento en la región *tcdC* en aislamientos clínicos de *C. difficile* no está asociada con un aumento en la actividad biológica de las Toxinas A o B en cepas no relacionadas con ST01. Sin embargo, en cepas ST01, se observan mutaciones o truncamientos con mayor frecuencia.

En nuestro estudio observamos que en el 100% de las cepas del ST01 del clado 2 se presentaron los genes de las toxinas *tcdA*, *tcdB* así como las toxinas binarias *cdtA*, *cdtB* y el regulador *cdtR*. Esto concuerda con lo reportado por Carter *et al.*, 2007 en donde indica que

cdtR regula positivamente la producción de toxinas CDT principalmente en cepas hipervirulentas como ST01.

Por otro lado, entre las cepas del clado 1 que presentaron toxinas *tcdA* y *tcdB*, ninguna presentó genes para toxinas binarias, pero el 98% sí presentó el gen regulador *cdtR*, excepto ST35 del clado 1, que presentó las toxinas *tcdA* y *tcdB* pero sin *cdtR*. La cepa ST48 del clado 1 no presentó ninguna toxina, pero sí presentó reguladores *tcdC*, *tcdE*, *tcdR* y *cdtR*, estos resultados concuerdan con lo reportado por Lyon *et al.*, 2016, que indicó que el gen regulador *cdtR* sorprendentemente también influye en la regulación de las toxinas TcdA y TcdB, aunque el locus *CdtLoc* no esté genéticamente vinculado a *PaLoc*. Lyon *et al.* sugieren que la regulación ocurre a nivel transcripcional, probablemente como resultado de la regulación indirecta del regulador positivo de la expresión génica en *PaLoc*, TcdR.

Es fundamental destacar que la función de *cdtR* puede ser específica del tipo de cepa, ya que Lyon *et al.*, 2016 no observan la regulación de TcdA y TcdB por *cdtR* en todas las cepas analizadas, especialmente en algunas del RT078 (aislamiento animal) y en algunas cepas del clado 1, como la cepa 630 del RT012, ST54. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que, en otras cepas, especialmente del clado 1, CdtR podría estar participando en la producción de toxinas *tcdA* y *tcdB*. Esto sugiere la posibilidad de variantes de CdtR que afectan su función específica en la regulación de las toxinas.

7.4 Comparación del resistoma identificado en cepas de *C.difficile*

El análisis del resistoma reveló diferencias significativas entre cepas mexicanas y de otros países. La presencia de genes, mutaciones puntuales y plásmidos movilizables asociados a la resistencia antimicrobiana mostró variabilidad en relación con los clados y STs.

En primer lugar, se observó la presencia del clúster de genes *vanG* (*vanR*, *vanS*, *vanT*) en el 100% de las cepas de los clados 2 y 1, tanto en cepas mexicanas como en cepas de otros países. Sin embargo, en el clado 4, no se detectó la presencia de dicho clúster. Estos resultados concuerdan con investigaciones previas, como la de Ammam *et al.* en 2012, que

señala una distribución amplia de este clúster en la especie *C. difficile*, destacando que la mera presencia del clúster *vanG* no es suficiente para conferir resistencia a la vancomicina. Al evaluar la resistencia fenotípica en nueve cepas que poseían este clúster, observamos que el 100% fueron sensibles a vancomicina, confirmando que este clúster por sí solo no es suficiente para conferir resistencia.

Resultados adicionales respaldados por Zhao *et al.*, 2021, donde también incluimos sus cepas mexicanas ST01 en nuestro estudio, indicaron que, aunque todas las cepas ST01 eran susceptibles a vancomicina y metronidazol, presentaron concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) más altas que las cepas no ST01 sin esa mutación. Esta observación coincide con los informes de Wickramage *et al.*, 2023, que asocian la mutación VanR T115A con una elevada CIM de vancomicina en aislados clínicos de *Clostridioides*. Sin embargo, Gargis *et al.*, 2023, presentan un matiz al señalar que la presencia de VanR T115A no siempre se asocia con CIM de vancomicina elevadas, ya que el 87.7% de los aislamientos con la mutación T115A tenían un CIM ≤ 2 $\mu\text{g/mL}$, sugiriendo que esta mutación podría representar una variante común en la población RT027, así como se observó en nuestros resultados ya que se observó la presencia de esta mutación en el 94% de las cepas mexicanas solo del clado 2, y en un 23% de cepas de otros países en este mismo clado.

La resistencia a la eritromicina se observó en el 80% de las cepas a las que se les evaluó la susceptibilidad, identificándose genes como *erm(B)* y mutaciones en *C656T* como determinantes genéticos, esto de acuerdo con lo reportado por Dingle *et al.*, 2014 es común principalmente en cepas hipervirulentas como ST01, en las que se ha observado que metilación del ARN ribosómico 23S (*ermB*) proporcionan resistencia a macrólidos lincosamidas y estreptograminas B.

Identificamos la presencia de genes de resistencia al cloranfenicol exclusivamente en las cepas del clado 1, detectándose en el 3% de las cepas provenientes de México y en el 12% de cepas de otros países. Este hallazgo concuerda con lo reportado por Peng *et al.* en 2017, donde se señala que la resistencia al cloranfenicol es poco común en *C. difficile*. Esta baja

frecuencia puede atribuirse a una menor presión selectiva ejercida por el cloranfenicol en comparación con otros agentes antimicrobianos de uso más extendido. Esta observación se respalda al evaluar la susceptibilidad al cloranfenicol en nuestras cepas, evidenciando sensibilidad en el 80% de las cepas analizadas.

Cabe resaltar que nosotros observamos resistencia a cloranfenicol en la cepa de referencia R20291, aunque no pudimos localizar genes o mutaciones específicas asociadas a dicha resistencia. No obstante, resulta imperativo indagar sobre otros determinantes de resistencia, como la presencia de transposones, ya que investigaciones anteriores, como el estudio realizado por Stabler *et al.* en 2009, han evidenciado la existencia de un transposón conjugativo denominado CTn-027 en la cepa de referencia R20291. Este transposón alberga el gen de resistencia al cloranfenicol CDR20291_3461, demostrando un fenotipo de resistencia intermedia con una concentración inhibitoria mínima (MIC) de 16 mg/l.

Nuestro análisis bioinformático resalta la presencia del plásmido pCD-METRO en un 6% de las cepas mexicanas del clado 2 y en un 9% de cepas del clado 1, así como en un 12% de cepas de otros países pertenecientes al clado 1. Según Boekhoud *et al.*, 2020, este plásmido ha sido vinculado a una susceptibilidad reducida al metronidazol en cepas de *C. difficile* estudiadas en países bajos. Hasta la fecha, no disponemos de estudios detallados sobre la epidemiología global de este plásmido. Aunque el mecanismo exacto de resistencia aún no está completamente esclarecido según Boekhoud, se sugiere que este plásmido alberga genes relacionados con la resistencia al metronidazol, incluyendo un pequeño pseudogen NimBCD con similitud proteica a NimB de *Bacteroides fragilis*. Este gen está involucrado en la conversión de los nitroimidazoles a productos no tóxicos, contribuyendo así a la resistencia bacteriana contra estos compuestos. Sin embargo, en nuestro estudio, no pudimos identificar genes asociados al metronidazol, incluso en las cepas que presentaban el plásmido. Por lo tanto, sería necesario realizar un análisis más amplio para determinar la prevalencia y distribución global de este plásmido y comprender mejor su prevalencia.

8. CONCLUSIONES

1. La presente investigación revela el primer estudio de genómica comparativa de *C. difficile* entre cepas de México y otras partes del mundo, identificando cepas de los clados 1, 2 y 4, con ausencia del clado 3. Evidenciando la necesidad de explorar más a fondo para considerar otros clados previamente reportados en México, como los clados 5 y crípticos.
2. El análisis del pangenoma de *C. difficile* reveló una diversidad genética dinámica, respaldando la noción de un pangenoma "abierto" que se expande continuamente con nuevas secuenciaciones.
3. Se identifican 20 genes de virulencia, y el análisis de subtipos de toxinas B revela patrones específicos, como la prevalencia del subtipo TcdB2.1 en cepas ST01 del clado 2. Estos datos proporcionan una comprensión más detallada de la virulencia y la diversidad toxigénica de las cepas estudiadas.
4. Se observó que en el 100% de las cepas del ST01 del clado 2 se presentaron los genes de las toxinas *tcdA*, *tcdB* así como las toxinas binarias *cdtA*, *cdtB* y el regulador positivo *cdtR*. Esto destaca la consistencia en la expresión de estos factores de virulencia en estas cepas específicas.
5. La evaluación de la regulación de toxinas reveló de manera significativa la ausencia total del regulador negativo *tcdC* en cepas ST01 del clado 2, tanto en cepas mexicanas como en las de otros países. Paralelamente, se observó la presencia del regulador *tcdC* en el 80% de las cepas del clado 1, incluso en ausencia de la expresión de genes de toxinas CDT.
6. La detección del clúster de genes *vanG* en el 100% de los clados 1 y 2, contrastado con su ausencia en el clado 4, fue un hallazgo notable en nuestro estudio. Sin embargo, al evaluar la resistencia fenotípica en nueve cepas que albergaban este clúster, se confirmó que el 100% de ellas mostraron sensibilidad a la vancomicina. Este resultado indica que, aunque presente, el clúster *vanG* por sí solo no es suficiente para conferir resistencia a este antimicrobiano.
7. La mutación en el regulador VanR T115A, asociada con resistencia a vancomicina en *C. difficile*, se encontró solamente en cepas ST01 del clado 2 en el 94% de las cepas mexicanas, y en un 23% de cepas de otros países en el mismo clado.

8. Nuestro análisis bioinformático resalta la presencia del plásmido pCD-METRO en un 6% de las cepas mexicanas del clado 2 y en un 9% de cepas del clado 1, así como en un 12% de cepas de otros países pertenecientes al clado 1

9. PERSPECTIVAS

1. Se recomienda realizar la evaluación de toxicidad celular de las cepas toxigénicas mediante cultivos celulares, con el objetivo de comprender mejor sus efectos a nivel celular y proporcionar datos relevantes para la investigación.
2. Secuenciación completa del genoma de las cepas restantes del Laboratorio de Biología Molecular de Enteropatógenos (LBME), con el propósito de obtener una comprensión detallada de la información genética contenida en estas cepas.
3. Identificación de otros elementos Genéticos Móviles como transposones e integrones, que sean determinantes genéticos de resistencia antimicrobiana. Este enfoque puede permitir identificar factores adicionales que contribuyen a la resistencia y comprender su movilidad genética.
4. Se propone realizar la exploración de Bacteriófagos con un enfoque específico en la terapia con fagos. Este enfoque emergente en el tratamiento de infecciones bacterianas, incluidas aquellas causadas por *C. difficile*, ofrece nuevas perspectivas para la gestión de estas infecciones.
5. Se recomienda realizar estudio de Asociación Pangenómica (pan-GWAS) para identificar variantes genéticas en todo el pangenoma, abarcando desde las variantes comunes hasta las raras presentes en las cepas. Este enfoque puede permitir identificar asociaciones que podrían pasar desapercibidas en estudios de asociación convencionales centrados únicamente en variantes genéticas comunes.
6. Identificar variantes de *cdtR* que afectan su función específica en la regulación positiva de las toxinas *tcdA*, *tcdB*.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acuña-Amador, L., Quesada-Gómez, C., & Rodríguez, C. (2022). *Clostridioides difficile* in Latin America: A comprehensive review of literature (1984–2021). *Anaerobe*, 74(102547), 102547. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2022.102547>
- Aguilar-Zamora, E., Weimer, B. C., Torres, R. C., Gómez-Delgado, A., Ortiz-Olvera, N., Aparicio-Ozores, G., Barbero-Becerra, V. J., Torres, J., & Camorlinga-Ponce, M. (2022). Molecular epidemiology and antimicrobial resistance of *Clostridioides difficile* in hospitalized patients from Mexico. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.787451>
- Ammam, F., Marvaud, J.-C., & Lambert, T. (2012). Distribution of the vanG-like gene cluster in *Clostridium difficile* clinical isolates. *Canadian Journal of Microbiology*, 58(4), 547–551. <https://doi.org/10.1139/w2012-002>
- Ammam, F., Meziane-cherif, D., Mengin-Lecreux, D., Blanot, D., Patin, D., Boneca, I. G., Courvalin, P., Lambert, T., & Candela, T. (2013). The functional vanGCd cluster of *Clostridium difficile* does not confer vancomycin resistance. *Molecular Microbiology*, 89(4), 612–625. <https://doi.org/10.1111/mmi.12299>
- Bakker, D., Smits, W. K., Kuijper, E. J., & Corver, J. (2012). TcdC does not significantly repress toxin expression in *Clostridium difficile* 630ΔErm. *PloS One*, 7(8), e43247. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043247>
- Boekhoud, I. M., Hornung, B. V. H., Sevilla, E., Harmanus, C., Bos-Sanders, I. M. J. G., Terveer, E. M., Bolea, R., Corver, J., Kuijper, E. J., & Smits, W. K. (2020). Plasmid-mediated metronidazole resistance in *Clostridioides difficile*. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14382-1>
- Buddle, J. E., & Fagan, R. P. (2023). Pathogenicity and virulence of *Clostridioides difficile*. *Virulence*, 14(1). <https://doi.org/10.1080/21505594.2022.2150452>

Bush, L. M., & Vazquez-Pertejo, M. T. (2021). Diarrea inducida por *Clostridioides* (antes, *Clostridium*) *difficile*. Manual MSD versión para profesionales. <https://www.msdmanuals.com/es-mx/professional/enfermedades-infecciosas/bacterias-anaerobias/diarrea-inducida-por-Clostridioides-antes,-Clostridium-difficile>

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. *Journal of Bacteriology*, 189(20), 7290–7301. <https://doi.org/10.1128/jb.00731-07>

Chordia Golchha, N., Nighojkar, A., & Nighojkar, S. (2022). [Final accepted version, edited] Redefining genomic view of *Clostridioides difficile* through pangenome analysis and identification of drug targets from its core genome. *Drug Target Insights*, 16(1). <https://doi.org/10.33393/dti.2022.2469>

Depardieu, F., Mejean, V., & Courvalin, P. (2015). Competition between VanUG repressor and VanRG activator leads to rheostatic control of vanG vancomycin resistance operon expression. *PLoS Genetics*, 11(4), e1005170. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005170>

Dingle, K. E., Elliott, B., Robinson, E., Griffiths, D., Eyre, D. W., Stoesser, N., Vaughan, A., Golubchik, T., Fawley, W. N., Wilcox, M. H., Peto, T. E., Walker, A. S., Riley, T. V., Crook, D. W., & Didelot, X. (2014). Evolutionary History of the *Clostridium difficile* Pathogenicity Locus. *Genome Biology and Evolution*, 6(1), 36–52. <https://doi.org/10.1093/gbe/evt204>

Donnelly, M. L., Shrestha, S., Ribis, J. W., Kuhn, P., Krasilnikov, M., Alves Feliciano, C., & Shen, A. (2022). Development of a dual-fluorescent-reporter system in *Clostridioides difficile* reveals a division of labor between virulence and transmission gene expression. *mSphere*, 7(3). <https://doi.org/10.1128/msphere.00132-22>

Dureja, C., Olaitan, A. O., & Hurdle, J. G. (2022). Mechanisms and impact of antimicrobial resistance in *Clostridioides difficile*. *Current Opinion in Microbiology*, 66, 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2022.01.004>

Elliott, B., Androga, G. O., Knight, D. R., & Riley, T. V. (2017). *Clostridium difficile* infection: Evolution, phylogeny and molecular epidemiology. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 49, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.12.018>

ETEST®. (n.d.). bioMérieux Mexico. Retrieved October 16, 2023, from <https://www.biomerieux.com.mx/microbiologia-industrial/etestr>

Eubank, T. A., Gonzales-Luna, A. J., Hurdle, J. G., & Garey, K. W. (2022). Genetic mechanisms of vancomycin resistance in *Clostridioides difficile*: A systematic review. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 11(2), 258. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11020258>

Fatoba, D. O., Amoako, D. G., Akebe, A. L. K., Ismail, A., & Essack, S. Y. (2022). Genomic analysis of antibiotic-resistant *Enterococcus* spp. reveals novel enterococci strains and the spread of plasmid-borne Tet(M), Tet(L) and Erm(B) genes from chicken litter to agricultural soil in South Africa. *Journal of Environmental Management*, 302(114101), 114101. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.114101>

Gargis, A. S., Karlsson, M., Paulick, A. L., Anderson, K. F., Adamczyk, M., Vlachos, N., Kent, A. G., McAllister, G., McKay, S. L., Halpin, A. L., Albrecht, V., Campbell, D., Korhonen, L. C., Elkins, C. A., Rasheed, J. K., Guh, A. Y., McDonald, L. C., Lutgring, J. D., Dumyati, G., ... the Emerging Infections Program *C. difficile* Infection Working Group. (2023). Reference susceptibility testing and genomic surveillance of *Clostridioides difficile*, United States, 2012–17. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 76(5), 890–896. <https://doi.org/10.1093/cid/ciac817>

Gómez-Rivera, N. (2019). Determinación de *Clostridioides difficile* de muestras diarreicas de pacientes hospitalizados [Benemerita Universidad Autónoma de Puebla]. <https://repositorioinstitucional.buap.mx/items/ea90fb61-a998-4d1d-a77a-92442e22f977>

Gunasekara, A. W. A. C. W. R., Rajapaksha, L. G. T. G., & Tung, T. L. (2022). Whole-genome sequence analysis through online web interfaces: a review. *Genomics & Informatics*, 20(1), e3.

<https://doi.org/10.5808/gi.20038>

Hardison, R. C. (2003). Comparative genomics. *PLoS Biology*, 1(2), e58. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0000058>

Hartley-Tassell, L. E., Awad, M. M., Seib, K. L., Scarselli, M., Savino, S., Tiralongo, J., Lyras, D., Day, C. J., & Jennings, M. P. (2019). Lectin Activity of the TcdA and TcdB Toxins of *Clostridium difficile*. *Infection and Immunity*, 87(3). <https://doi.org/10.1128/iai.00676-18>

Hensbergen, P. J., Klychnikov, O. I., Bakker, D., Dragan, I., Kelly, M. L., Minton, N. P., Corver, J., Kuijper, E. J., Drijfhout, J. W., & van Leeuwen, H. C. (2015). *Clostridium difficile* secreted Pro-Pro endopeptidase PPEP-1 (ZMP1/CD2830) modulates adhesion through cleavage of the collagen binding protein CD2831. *FEBS Letters*, 589(24PartB), 3952–3958. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.10.027>

Hernández, M., Quijada, N. M., Rodríguez-Lázaro, D., & Eiros, J. M. (2020). Aplicación de la secuenciación masiva y la bioinformática al diagnóstico microbiológico clínico. *Revista Argentina de microbiología*, 52(2), 150–161. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.06.003>

Hernández-Rocha, C., Naour, S., Álvarez-Lobos, M., & Paredes-Sabja, D. (2012). Infecciones causadas por *Clostridium difficile*: una visión actualizada. *Revista Chilena de Infectología: Organó Oficial de La Sociedad Chilena de Infectología*, 29(4), 434–445. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182012000400011>

Illumina DNA sequencing. (2022, December 17). SeqCenter, LLC; SeqCenter. <https://www.seqcenter.com/illumina-dna-sequencing/>

Janezic, S., & Rupnik, M. (2019). Development and implementation of whole genome sequencing-based typing schemes for *Clostridioides difficile*. *Frontiers in Public Health*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00309>

Jarocki, V. M., Reid, C. J., Chapman, T. A., & Djordjevic, S. P. (2020). *Escherichia coli* ST302:

Genomic analysis of virulence potential and antimicrobial resistance mediated by mobile genetic elements. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03098>

Jensen, L. B., Garcia-Migura, L., Valenzuela, A. J. S., Løhr, M., Hasman, H., & Aarestrup, F. M. (2010). A classification system for plasmids from enterococci and other Gram-positive bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 80(1), 25–43. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.10.012>

Johnson, S., Lavergne, V., Skinner, A. M., Gonzales-Luna, A. J., Garey, K. W., Kelly, C. P., & Wilcox, M. H. (2021). Clinical practice guideline by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA): 2021 focused update guidelines on management of *Clostridioides difficile* infection in adults. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 73(5), e1029–e1044. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab549>

Jolley, K. A., Bray, J. E., & Maiden, M. C. J. (2018). Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the Pubmlst.org website and their applications. *Wellcome Open Research*, 3, 124. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14826.1>

Knight, D. R., Elliott, B., Chang, B. J., Perkins, T. T., & Riley, T. V. (2015). Diversity and evolution in the genome of *Clostridium difficile*. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), 721–741. <https://doi.org/10.1128/cmr.00127-14>

Knight, D. R., Imwattana, K., Kullin, B., Guerrero-Araya, E., Paredes-Sabja, D., Didelot, X., Dingle, K. E., Eyre, D. W., Rodríguez, C., & Riley, T. V. (2020). The *Clostridioides difficile* species problem: global phylogenomic analysis uncovers three ancient, toxigenic, genomospecies. In *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.09.21.307223>

Knight, D. R., Kullin, B., Androga, G. O., Barbut, F., Eckert, C., Johnson, S., Spigaglia, P., Tateda, K., Tsai, P.-J., & Riley, T. V. (2019). Evolutionary and genomic insights into *Clostridioides difficile* sequence type 11: A diverse zoonotic and antimicrobial-resistant lineage of global One Health

importance. *mBio*, 10(2). <https://doi.org/10.1128/mbio.00446-19>

Kobras, C. M., Fenton, A. K., & Sheppard, S. K. (2021). Next-generation microbiology: from comparative genomics to gene function. *Genome Biology*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s13059-021-02344-9>

Lemée, L., & Pons, J.-L. (2010). Multilocus Sequence Typing for *Clostridium difficile*. In *Methods in Molecular Biology* (pp. 77–90). Humana Press.

Lim, S.-C., Knight, D. R., Moono, P., Foster, N. F., & Riley, T. V. (2020). *Clostridium difficile* in soil conditioners, mulches and garden mixes with evidence of a clonal relationship with historical food and clinical isolates. *Environmental Microbiology Reports*, 12(6), 672–680. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12889>

Lital Meyer, S., Ricardo Espinoza, A., & Rodrigo Quera, P. (2014). Infección por *Clostridium difficile*: epidemiología, diagnóstico y estrategias terapéuticas. *Revista médica Clínica Las Condes*, 25(3), 473–484. [https://doi.org/10.1016/s0716-8640\(14\)70064-1](https://doi.org/10.1016/s0716-8640(14)70064-1)

Lv, T., Zheng, L., Wu, T., Shen, P., & Chen, Y. (2022). Molecular characterization and antibiotic resistance of *Clostridioides difficile* in patients with inflammatory bowel disease from two hospitals in China. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 30, 252–258. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2022.06.017>

Lyon, S. A., Hutton, M. L., Rood, J. I., Cheung, J. K., & Lyras, D. (2016). CdtR Regulates TcdA and TcdB Production in *Clostridium difficile*. *PLoS Pathogens*, 12(7), e1005758. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005758>

Maestri, A. C., Mesa, D., Vasconcelos, T. M., Krul, D., Ricieri, M. C., Motta, F. A., Dalla-Costa, L. M., Raboni, S. M., & Nogueira, K. S. (2023). Analysis of *Clostridioides difficile* infection in children with diarrhea in two hospitals in southern Brazil. *Current Microbiology*, 80(12). <https://doi.org/10.1007/s00284-023-03499-3>

Mansfield, M. J., Tremblay, B. J.-M., Zeng, J., Wei, X., Hodgins, H., Worley, J., Bry, L., Dong, M., & Doxey, A. C. (2020). Phylogenomics of 8,839 *Clostridioides difficile* genomes reveals recombination-driven evolution and diversification of toxin A and B. *PLoS Pathogens*, 16(12), e1009181. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009181>

Marcos, P., Whyte, P., Burgess, C., Ekhlās, D., & Bolton, D. (2022). Detection and Genomic Characterisation of *Clostridioides difficile* from Spinach Fields. *Pathogens*, 11(11), 1310. <https://doi.org/10.3390/pathogens11111310>

Martínez-Meléndez, A., Cruz-López, F., Morfin-Otero, R., Maldonado-Garza, H. J., & Garza-González, E. (2022). An Update on *Clostridioides difficile* Binary Toxin. *Toxins*, 14(5), 305. <https://doi.org/10.3390/toxins14050305>

Matamouros, S., England, P., & Dupuy, B. (2007). *Clostridium difficile* toxin expression is inhibited by the novel regulator TcdC. *Molecular Microbiology*, 64(5), 1274–1288. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05739.x>

Mengoli, M., Barone, M., Fabbri, M., D'Amico, F., Brigidi, P., & Turrone, S. (2022). Make It Less *difficile*: Understanding Genetic Evolution and Global Spread of *Clostridioides difficile*. *Genes*, 13(12), 2200. <https://doi.org/10.3390/genes13122200>

Murray, R., Boyd, D., Levett, P. N., Mulvey, M. R., & Alfa, M. J. (2009). Truncation in the *tcdC* region of the *Clostridium difficile* PathLoc of clinical isolates does not predict increased biological activity of Toxin B or Toxin A. *BMC Infectious Diseases*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2334-9-103>

Mutai, W. C., Mureithi, M. W., Anzala, O., Revathi, G., Kullin, B., Burugu, M., Kyany'a, C., Odoyo, E., Otieno, P., & Musila, L. (2021). High prevalence of multidrug-resistant *Clostridioides difficile* following extensive use of antimicrobials in hospitalized patients in Kenya. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.604986>

Norsigian, C. J., Danhof, H. A., Brand, C. K., Midani, F. S., Broddrick, J. T., Savidge, T. C.,

Britton, R. A., Palsson, B. O., Spinler, J. K., & Monk, J. M. (2022). Systems biology approach to functionally assess the *Clostridioides difficile* pangenome reveals genetic diversity with discriminatory power. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(18). <https://doi.org/10.1073/pnas.2119396119>

O'Grady, K., Knight, D. R., & Riley, T. V. (2021). Antimicrobial resistance in *Clostridioides difficile*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 40(12), 2459–2478. <https://doi.org/10.1007/s10096-021-04311-5>

Olaitan, A. O., Dureja, C., Youngblom, M. A., Topf, M. A., Shen, W.-J., Gonzales-Luna, A. J., Deshpande, A., Hevener, K. E., Freeman, J., Wilcox, M. H., Palmer, K. L., Garey, K. W., Pepperell, C. S., & Hurdle, J. G. (2023). Decoding a cryptic mechanism of metronidazole resistance among globally disseminated fluoroquinolone-resistant *Clostridioides difficile*. *Nature Communications*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-023-39429-x>

Oleastro, M., Persson, S., Seyboldt, C., Dost, I., Abdel-Gliil, M., Maurischat, S., Schlotzek, A., Cabal Rosel, A., Tenson, T., Mazuet, C., Alves, F., & Castro, R. (2022). Deliverable D-JRP15–FED-AMR-WP3.2: Overview of genetic overlap between human and non-human *Clostridioides difficile* isolates. Zenodo. <https://doi.org/10.5281/ZENODO.7472663>

Page, A. J., Cummins, C. A., Hunt, M., Wong, V. K., Reuter, S., Holden, M. T. G., Fookes, M., Falush, D., Keane, J. A., & Parkhill, J. (2015). Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics* (Oxford, England), 31(22), 3691–3693. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv421>

Pan, Z., Zhang, Y., Luo, J., Li, D., Zhou, Y., He, L., Yang, Q., Dong, M., & Tao, L. (2021). Functional analyses of epidemic *Clostridioides difficile* toxin B variants reveal their divergence in utilizing receptors and inducing pathology. *PLoS Pathogens*, 17(1), e1009197. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009197>

Paredes-Sabja, D., Shen, A., & Sorg, J. A. (2014). *Clostridium difficile* spore biology: sporulation,

germination, and spore structural proteins. *Trends in Microbiology*, 22(7), 406–416. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.04.003>

Peng, Z., Jin, D., Kim, H. B., Stratton, C. W., Wu, B., Tang, Y.-W., & Sun, X. (2017). Update on antimicrobial resistance in *Clostridium difficile*: Resistance mechanisms and antimicrobial susceptibility testing. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(7), 1998–2008. <https://doi.org/10.1128/jcm.02250-16>

Picazo, J. J., Cantón, R., Elías, J., Sánchez, G., Luisa, M., Luis, G.-L., Martínez, M., Rodríguez-Avial, C., & Vila, J. (n.d.). *Procedimientos en Microbiología Clínica*. Seimc.org. Retrieved October 16, 2023, from <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia11.pdf>

Pu, M., Cho, J. M., Cunningham, S. A., Behera, G. K., Becker, S., Amjad, T., Greenwood-Quaintance, K. E., Mendes-Soares, H., Jones-Hall, Y., Jeraldo, P. R., Chen, J., Dunny, G., Patel, R., & Kashyap, P. C. (2021). Plasmid Acquisition Alters Vancomycin Susceptibility in *Clostridioides difficile*. *Gastroenterology*, 160(3), 941-945.e8. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.10.046>

Quainoo, S., Coolen, J. P. M., van Hijum, S. A. F. T., Huynen, M. A., Melchers, W. J. G., van Schaik, W., & Wertheim, H. F. L. (2017). Whole-genome sequencing of bacterial pathogens: The future of nosocomial outbreak analysis. *Clinical Microbiology Reviews*, 30(4), 1015–1063. <https://doi.org/10.1128/cmr.00016-17>

Ramírez-Vargas, G., Quesada-Gómez, C., Acuña-Amador, L., López-Ureña, D., Murillo, T., del Mar Gamboa-Coronado, M., Chaves-Olarte, E., Thomson, N., Rodríguez-Cavallini, E., & Rodríguez, C. (2017). A *Clostridium difficile* lineage endemic to Costa Rican hospitals is multidrug resistant by acquisition of chromosomal mutations and novel mobile genetic elements. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(4). <https://doi.org/10.1128/aac.02054-16>

Romero-Rodríguez, A., Martínez de la Peña, C., Troncoso-Cotal, S., Guzmán, C., & Sánchez,

S. (2022). Emerging alternatives against *Clostridioides difficile* infection. *Anaerobe*, 78(102638), 102638. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2022.102638>

Rubino, J. T., Martinelli, M., Cantini, F., Castagnetti, A., Leuzzi, R., Banci, L., & Scarselli, M. (2016). Structural characterization of zinc-bound Zmp1, a zinc-dependent metalloprotease secreted by *Clostridium difficile*. *Journal of Biological Inorganic Chemistry: JBIC: A Publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry*, 21(2), 185–196. <https://doi.org/10.1007/s00775-015-1319-6>

Shaw, H. A., Preston, M. D., Vendrik, K. E. W., Cairns, M. D., Browne, H. P., Stabler, R. A., Crobach, M. J. T., Corver, J., Pituch, H., Ingebretsen, A., Pirmohamed, M., Faulds-Pain, A., Valiente, E., Lawley, T. D., Fairweather, N. F., Kuijper, E. J., & Wren, B. W. (2020). The recent emergence of a highly related virulent *Clostridium difficile* clade with unique characteristics. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 26(4), 492–498. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.09.004>

Shen, E., Zhu, K., Li, D., Pan, Z., Luo, Y., Bian, Q., He, L., Song, X., Zhen, Y., Jin, D., & Tao, L. (2020). Subtyping analysis reveals new variants and accelerated evolution of *Clostridioides difficile* toxin B. *Communications Biology*, 3(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-020-1078-y>

Shen, W.-J., Deshpande, A., Hevener, K. E., Endres, B. T., Garey, K. W., Palmer, K. L., & Hurdle, J. G. (2020). Constitutive expression of the cryptic vanGCd operon promotes vancomycin resistance in *Clostridioides difficile* clinical isolates. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(4), 859–867. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz513>

Shields, K., Araujo-Castillo, R. V., Theethira, T. G., Alonso, C. D., & Kelly, C. P. (2015). Recurrent *Clostridium difficile* infection: From colonization to cure. *Anaerobe*, 34, 59–73. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.04.012>

Smits, W. K., Harmanus, C., Sanders, I. M. J. G., Bry, L., Blackwell, G. A., Ducarmon, Q. R., de Oliveira Ferreira, E., & Kuijper, E. J. (2022). Sequence-Based Identification of Metronidazole-Resistant *Clostridioides difficile* Isolates. *Emerging Infectious Diseases*, 28(11), 2308–2311.

<https://doi.org/10.3201/eid2811.220615>

Smits, W. K., Roseboom, A. M., & Corver, J. (2022). Plasmids of *Clostridioides difficile*. *Current Opinion in Microbiology*, 65, 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2021.10.016>

Spigaglia, P., Barbanti, F., Mastrantonio, P., Ackermann, G., Balmelli, C., Barbut, F., Bouza, E., Brazier, J., Delmee, M., Drudy, D., Kuijper, E., Ladas, H., Mastrantonio, P., Nagy, E., Pituch, H., Poxton, I., Rupnik, M., Wullt, M., Yucesoy, M., & on behalf of the European Study Group on *Clostridium difficile* (ESGCD). (2011). Multidrug resistance in European *Clostridium difficile* clinical isolates. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(10), 2227–2234. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr292>

Stabler, R. A., He, M., Dawson, L., Martin, M., Valiente, E., Corton, C., Lawley, T. D., Sebaihia, M., Quail, M. A., Rose, G., Gerding, D. N., Gibert, M., Popoff, M. R., Parkhill, J., Dougan, G., & Wren, B. W. (2009). Comparative genome and phenotypic analysis of *Clostridium difficile* 027 strains provides insight into the evolution of a hypervirulent bacterium. *Genome Biology*, 10(9), R102. <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-9-r102>

Sueke, H., Kaye, S. B., Neal, T., Hall, A., Tuft, S., & Parry, C. M. (2010). An in vitro investigation of synergy or antagonism between antimicrobial combinations against isolates from bacterial keratitis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 51(8), 4151. <https://doi.org/10.1167/iovs.09-4839>

Valiente, E., Dawson, L. F., Cairns, M. D., Stabler, R. A., & Wren, B. W. (2012). Emergence of new PCR ribotypes from the hypervirulent *Clostridium difficile* 027 lineage. *Journal of Medical Microbiology*, 61(1), 49–56. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.036194-0>.

Velázquez-Romero, M. U. (2021). Detección de *Clostridium difficile* en portadores asintomáticos [Benemerita Universidad Autónoma de Puebla]. <https://repositorioinstitucional.buap.mx/items/ed593883-f9a6-4fe3-af50-3bfe3539a6e2>

Wendt, S., Ranft, D., Rodloff, A. C., Lippmann, N., & Lübbert, C. (2020). Switching From

Ceftriaxone to Cefotaxime Significantly Contributes to Reducing the Burden of *Clostridioides difficile* infections. *Open Forum Infectious Diseases*, 7(9). <https://doi.org/10.1093/ofid/ofaa312>

Wickramage, I., Peng, Z., Chakraborty, S., Harmanus, C., Kuijper, E. J., Alrabaa, S., Smits, W. K., & Sun, X. (2023). The vanR Cd mutation 343A>G, resulting in a Thr115Ala substitution, is associated with an elevated minimum inhibitory concentration (MIC) of vancomycin in *Clostridioides difficile* clinical isolates from Florida. *Microbiology Spectrum*, 11(3). <https://doi.org/10.1128/spectrum.03777-22>

Woods, E. C., Wetzel, D., Mukerjee, M., & McBride, S. M. (2018). Examination of the *Clostridioides (Clostridium) difficile* VanZ ortholog, CD1240. *Anaerobe*, 53, 108–115. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.06.013>

Zhao, H., Nickle, D. C., Zeng, Z., Law, P. Y. T., Wilcox, M. H., Chen, L., Peng, Y., Meng, J., Deng, Z., Albright, A., Zhong, H., Xu, X., Zhu, S., Shen, J., Blanchard, R. L., Dorr, M. B., Shaw, P. M., & Li, J. (2021). Global landscape of *Clostridioides difficile* phylogeography, antibiotic susceptibility, and toxin polymorphisms by post-hoc whole-genome sequencing from the MODIFY I/II studies. *Infectious Diseases and Therapy*, 10(2), 853–870. <https://doi.org/10.1007/s40121-021-00426-6>.

11. ANEXOS

11.1 ANEXO A. Solicitud de autorización para la recolección y utilización de muestras biológicas

SAN ANDRÉS CHOLULA, PUE. A 02 DE MAYO DEL 2022

ASUNTO: SOLICITUD DE RECOLECCIÓN DE MUESTRAS PARA PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

DR. FRANCISCO ESPAÑA MEJIA
DIRECTOR MEDICO HOSPITAL MAC PUEBLA

DR. JORGE OLIVER VALDES PINEDA
JEFE DE ENSEÑANZA DE HOSPITAL MAC PUEBLA

PRESENTE

QC. Charlen Guzman Ortiz Flores, estudiante de la maestría en ciencias microbiológicas con numero de matrícula 221470355 de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Por medio del presente escrito me dirijo a usted para solicitar apoyo con la siguiente petición personal.

En base a la **norma oficial mexicana nom-004-ssa3-2012, del expediente clínico** y al **reglamento de la ley general de salud en materia de investigación para la salud** que especula en los siguientes artículos:

*Que la ley general de salud ha establecido los lineamientos y principios generales a los cuales deberá someterse la investigación científica y tecnológica destinada a la salud, correspondiendo a la secretaría de salud orientar su desarrollo; **ARTICULO 1°, 3° Y 4°.***

*Que la investigación para la salud es un factor determinante para mejorar las acciones encaminadas a proteger, promover y restaurar la salud del individuo y de la sociedad en general, conforme a las bases establecidas en dicha ley; **ARTICULO 5° Y 6°.***

*Que la realización de la investigación para la salud debe atender a aspectos éticos que garanticen la dignidad y el bienestar de la persona sujeta a investigación; **ARTICULO 13° Y 16°.***

Es por ello que a través de este medio escrito solicito tenga a bien permitirme la autorización para la recolección de muestras fecales de pacientes que sean referidos al área de laboratorio clínico del hospital MAC Puebla, con el objetivo de la realización del proyecto de investigación para tesis de maestría que lleva por nombre **"Análisis de genómica comparativa entre cepas de Clostridioides difficile aisladas en México y de otras partes del mundo"**. El propósito de la investigación es evidenciar si alguno de los pacientes que son referidos al laboratorio del hospital MAC Puebla ha cursado con algún proceso infeccioso causado por *Clostridioides difficile*, el cual es un patógeno potencial en pacientes con síndrome diarreico.

Este proyecto será financiado por la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado (VIEP) de la BUAP en el laboratorio de biología molecular de enteropatógenos (LBME) del Centro de investigaciones en ciencias microbiológicas (CICM) perteneciente al Instituto de ciencias BUAP (ICUAP). El presente proyecto de tesis es coordinado por la **D.C. Claudia Fabiola Martínez de la Peña** Profesor investigador CICM-ICUAP BUAP.

Las muestras fecales serán recuperadas y resguardadas a partir de la misma muestra que sea entregada en el laboratorio clínico del hospital MAC, y posteriora la terminación de los estudios correspondientes requeridos la solicitud de cada paciente. Las muestras obtenidas serán transportadas al LBME, donde serán procesadas para cultivo, aislamiento y determinación por PCR de genes específicos para *C.difficile*. Se pretende realizar la recolección de muestras en el hospital durante un año aproximadamente.

Los datos requeridos de los pacientes utilizados para la investigación serán el sexo, edad, diagnostico probable y consumo de antibióticos dentro de los últimos 3 meses, obteniendo esta información para su análisis, con fines educativos y con el cumplimiento de información de investigación requerida.

Es importante destacar que se pretende realizar una publicación como artículo científico de los resultados obtenidos en el presente proyecto, comprometiéndome a nombrar a hospitales MAC como colaborador en el artículo de publicación. Así mismo me comprometo a nombrar a hospitales MAC en los agradecimientos del proyecto, y una vez culminado me comprometo a entregar un ejemplar de la tesis en el área de enseñanza, y presentar un seminario de los resultados obtenidos frente al personal que labora en el hospital.

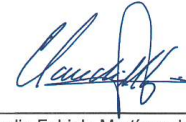
Comprometiéndome a no ventilar la información obtenida de los pacientes, siguiendo los principios éticos de los artículos 13° y 16°, del reglamento de la ley general de salud de materia de investigación para la salud.

Sin más por el momento, quedo atento a la respuesta a mi solicitud y también, por cualquier duda que pudiera existir de la presente. Me despido agradeciéndole su atención. Reciba un cordial saludo.

ATENTAMENTE



QC. Charlen Guzman Ortiz Flores
Estudiante de maestría en ciencias
microbiológicas ICUAP-BUAP
charlen_ortizf@hotmail.com



D.C. Claudia Fabiola Martínez de la Peña
Profesor investigador
CICM-ICUAP BUAP
Director de tesis



DR. Francisco España Mejía
Director médico hospital MAC Puebla



DR. Jorge Oliver Valdés Pineda
Jefe de enseñanza de hospital MAC puebla

CC.P. M.C. Javier Ximello Reyes (Jefatura de laboratorio Hospital MAC Puebla)
CC. Julieta Jacquez Martinez (Jefatura de calidad de Hospital MAC Puebla)

11.2 ANEXO B. Bitácora de recolección de muestras en el Hospital MAC

CODIGO	SEXO	EDAD	DIAGNOSTICO	SERVICIO	Aspecto de la muestra	Prueba de Toxinas A,B,GDH	CRECIMIENTO EN CCFA	CLONAS	TPI	TcdA	TcdB	CdtA	CdtB	CEPA EN GLICEROL
MAC-1	M	51	Amebiasis	Externo	Dura pastosa		No							
MAC-2	M	7	-	Externo	Dura pastosa	No	No							
MAC-3	M	83	-	Externo	Dura pastosa	No	SI	3	No					
MAC-4	F	2	Abseso hepatico	Externo	Blanda	No	No							
MAC-5	F	17	-	Externo	Blanda	No	SI	C2	SI	No	SI	No	No	SI
MAC-6	M	65	-	UCI	Liquida	No	No							
MAC-7	F	14	-	Externo	Blanda	No	SI	C2	SI	SI	SI	No	No	SI
MAC-8	F	10	-	Externo	Pastosa dura	No	SI	C1	NO					SI
MAC-9	M	42	-	Externo	Pastosa dura	No	No							
MAC-10	F	57	-	Externo	Pastosa dura	No	No							
MAC-11	F	70	Amebiasis	Externo	Pastosa dura	No	SI	C2	No					SI
MAC-12	F	71	-	Externo	Blanda	No	SI	C1	SI	No	No	No	No	SI
			-			No	SI	C2	SI	No	No	No	No	SI
			-			No	SI	C3	SI	No	No	No	No	SI
MAC-13	F	84	Amebiasis	Externo	Blanda	No	SI	C1	SI	No	No	No	No	SI
MAC-14	M	68	-	Externo	Blanda	No	SI	C3	SI	No	SI	No	No	SI
MAC-15	M	73	-	Externo		No	No							
MAC-16	F	82	Artritis	Externo	Bkanda	No	SI	C1	SI	No	No	No	No	SI
			-			No	SI	C2	SI	No	No	No	No	SI
			-			No	SI	C3	SI	No	No	No	No	SI
MAC-17	M	27	ICD	UCI	Liquida	A+, B+, GDH+	No							
MAC-18	F	72	-	Externo	Pastosa dura	No	SI	C1	SI	SI	SI	No	No	SI
MAC-19	F	23	ICD	UCI	Liquida	A-, B+, GDH+	No							
MAC-20	M	35	ICD	UCI	Liquida	A+, B+, GDH+	SI	C1	SI	No	SI	No	No	SI
			-			No	SI	C2	SI	No	SI	SI	SI	SI
			-			No	SI	C3	SI	No	SI	No	No	SI
MAC-21	M	72	-	Externo	Pastosa dura	No	No							
MAC-22	M	40	-	Externo	Blanda	No	SI	C5	SI	No	No	No	No	SI
MAC-23	F	51	-	Externo	Blanda	No	SI	C2	SI	No	No	SI	SI	SI
MAC-24	F	18	-	Hospitalizacion	Blanda	No	SI		No					SI
MAC-25	M	35	-	Externo	Pastosa dura	No	NO							
MAC-26	F	53	-	Externo	Pastosa dura	No	NO							
MAC-27	F	24	ICD	UCI	Liquidoa	A-, B-, GDH-	NO							
MAC-28	M	52	-	Externo	Pastosa dura	No	SI		No					SI
MAC-29	M	33	-	Externo	Pastosa dura	No	SI		No					SI
MAC-30	F	37	-	Laboratorio	Pastosa dura	No	SI		No					SI

CODIGO	SEXO	EDAD	DIAGNOSTICO	SERVICIO	Aspecto de la muestra	Prueba de Toxinas A,B,GDH	CRECIMIENTO EN CCFA	CLONAS	TPI	TcdA	TcdB	CdtA	CdtB	CEPA EN GLICEROL
MAC-31	F	1	-	Laboratorio	Pastosa dura	No	SI		No					SI
MAC-32	M	6	-	Externo	Blanda	No	SI	C3	SI	No	Si	No	No	SI
MAC-33	M	91	-	Externo	Blanda	No	SI	C2	SI	No	No	No	No	SI
MAC-34	F	12	-	Externo	Pastosa dura	No	No							
MAC-35	F	44	-	Externo	Pastosa dura	No	No							
MAC-36	F	35	-	Externo	Pastosa dura	No	No							
MAC-37	M	80	-	Externo	Pastosa dura	No	No							
MAC-38	M	15	-	Externo	Pastosa dura	No	No							
MAC-39	F	51	-	Externo	Pastosa dura	No	No							
MAC-40	F	17	-	Externo	Pastosa dura	No	No							
MAC-41	M	26	-	Laboratorio	Pastosa dura	No	No							
MAC-42	M	1	-	Hospitalizacion	Pastosa dura	No	No							
MAC-43	F	30	-	Laboratorio	Pastosa dura	No	No							
MAC-44	F	53	-	Externo	Pastosa dura	No	No							
MAC-45	M	39	-	Laboratorio	Pastosa dura	No	No							
MAC-46	F	7	-	Externo	Blanda	No	No							
MAC-47	M	28	-	Laboratorio	Blanda	No	No							
MAC-48	M	36	-	Laboratorio	Blanda	No	No							
MAC-49	M	29	-	Laboratorio	Dura pastosa	No	No							
MAC-50	M	64	-	Externo	Dura pastosa	No	No							
MAC-51	M	41	-	Laboratorio	Blanda	No	No							
MAC-52	M	9	-	Externo	Blanda	No	No							
MAC-53	M	43	-	Laboratorio	Blanda	No	SI	C3	SI	No	No	No	No	SI
MAC-54	M	37	-	Laboratorio	Dura pastosa	No	No							
MAC-55	M	49	-	Laboratorio	Blanda	No	No							
MAC-56	F	66	-	Externo	Blanda	No	No							
MAC-57	M	44	-	Hospitalizacion	Blanda	No	No							
MAC-58	F	76	-	Externo	Blanda diarreica	No	No							
MAC-59	M	66	-	Externo	Liquida	No	No							
MAC-60	F	82	ICD	UCI	Diarreica	A+,B+, GDH+	SI	C1	SI	No	Si	No	No	SI

CODIGO	SEXO	EDAD	DIAGNOSTICO	SERVICIO	Aspecto de la muestra	Prueba de Toxinas A,B,GDH	CRECIMIENTO EN CCFA	CLONAS	TPI	TcdA	TcdB	CdtA	CdtB	CEPA EN GLICEROL
MAC-61	F	61	ICD	Hospitalizacion	Liquida	A+,B+, GDH+	No							
MAC-62	M	40	-	Laboratorio	Pastosa	No	No							
MAC-63	M	39	-	Laboratorio	Diarreica	No	Si	C1	Si	No	Si	No	No	Si
MAC-64	M	39	-	Laboratorio	Pastosa	No	No							
MAC-65	M	54	-	Hospitalizacion	Liquida	No	No							
MAC-66	M	32	-	Laboratorio	Pastosa	No	No							
MAC-67	M	47	-	Laboratorio	Pastosa dura	No	No							
MAC-68	F	74	-	Externo	Pastosa dura	No	No							
MAC-69	M	32	-	Laboratorio	Liquida	No	No							
MAC-70	M	42	-	Laboratorio	Pastosa dura	No	No							
MAC-71	M	32	-	Externo	Pastosa dura	No	No							
MAC-72	M	48	-	Laboratorio	Pastosa dura	No	Si	C1	Si	No	Si	No	No	Si
MAC-73	M	38	-	Laboratorio	Liquida	No	No							
MAC-74	M	64	-	Externo	Blanda	No	No							
MAC-75	F	15	-	Externo	Pastosa dura	No	No							
MAC-76	M	32	-	Laboratorio	Pastosa dura	No	No							
MAC-77	M	29	ICD	UCI	Liquida	A+,B+, GDH+	No							
MAC-78	F	71	-	Externo	Blanda	No	No							
MAC-79	F	71	-	Externo	Blanda	No	No							
MAC-80	F	70	-	Externo	Blanda	No	No							
MAC-81	F	83	-	Externo	Blanda	No	No							
MAC-82	M	10	-	Laboratorio	Pastosa dura	No	No							
MAC-83	F	2	-	Laboratorio	Blanda	No	No							
MAC-84	F	76	-	Externo	Blanda	No	No							
MAC-85	M	65	ICD	Hospitalizacion	Blanda	A+,B+, GDH+	No							
MAC-86	M	69	ICD	Hospitalizacion	Liquida	A+,B+, GDH+	No							
MAC-87	F	2	-	Laboratorio	Pastosa dura	No	No							
MAC-88	F	72	-	Laboratorio	Pastosa dura	No	No							
MAC-89	M	65	-	Externo	Pastosa dura	No	No							
MAC-90	F	79	-	Externo	Blanda	No	No							
MAC-91	M	88	-	Externo	Pastosa dura	No	No							
MAC-92	M	1	-	Laboratorio	Pastosa dura	No	No							
MAC-93	F	2	-	Laboratorio	Blanda	No	No							

11.3 ANEXO C. Protocolo de cultivo y aislamiento

PROTOCOLO DE CULTIVO Y AISLAMIENTO DE *C. DIFFICILE* A PARTIR DE MUESTRAS FECALES

1. Pesar 0.01g a 0.5g materia fecal tubos eppendorf (tubos de microcentrífuga)
2. Añadir un volumen 1:1 de muestra fecal y etanol absoluto, por ejemplo 0.5g de material fecal con 500ul de etanol absoluto y mezclar perfectamente en vortex hasta disolver, posteriormente dejar reposar por 40 min a temperatura ambiente.
3. Pasado el tiempo de reposo, volver a mezclar por vortex y tomar aproximadamente 100 µl de la mezcla con una punta estéril de micropipeta con el extremo de la punta cortada para facilitar la toma completa de la muestra.
4. Sembrar en placas de medio de cultivo específico para *C. difficile* CCFA-TC (Agar cicloserina-cefoxitina-fructosa y taurocolato), distribuir en toda la superficie del agar con la ayuda de una espátula de plástico o vidrio estéril, posteriormente dejar secar por 5 min
5. Cultivar 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).
6. Observar la morfología colonial después de las 48 horas de incubación, y realizar tinción gram.
7. A partir del crecimiento bacteriano de cada placa, seleccionar de 1 a 3 colonias diferentes cuya morfología y tinción Gram sea similar a *C. difficile*. Sembrar por estría en placas de Agar BHI (infusión cerebro corazón) adicionado con extracto de levadura, nuevamente cultivar en condiciones de anaerobiosis a 37°C durante 48hrs.
8. A partir del crecimiento de estas placas resembrar en tubos con medio liquido de BHI (5mL) y cultivar en las mismas condiciones
9. Tomar 1 ml de caldo y transferir a un tubo Eppendorff, obtener el paquete celular por centrifugación a 12 000 rpm por 5 min para hacer lisados de las clonas, también del mismo caldo tomar 500µL y mezclar con 500µL de glicerol para guardarse a -80°C.

Referencias

1. Edwards, A. N., Suárez, J. M., & McBride, S. M. (2013). Culturing and maintaining *Clostridium difficile* in an anaerobic environment. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 79, e50787. <https://doi.org/10.3791/50787>
2. European Centre for Disease Prevention and Control, (2018). Laboratory procedures for diagnosis and typing of human *Clostridium difficile* infection,

11.4 ANEXO D. Protocolo de extracción y PCR

Protocolo de extracción de DNA (G+)

El protocolo de extracción de ADN utilizado en esta investigación se realizó mediante fenol-cloroformo, basado en la metodología descrita por Andreou en 2013 con algunas modificaciones:

En campana (esterilidad)

1.- Tomar el tubo con el cultivo overnight y centrifugar por 5 min a 8000 rpm. Quitar el sobrenadante.

2.- Resuspender el pellet en 250 uL de buffer TES. (75 mM NaCl, 25 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl).

3.- Agregar 50 uL de lisozima 10 mg/mL y resuspender suavemente.

*La lisozima se prepara el día que se va a usar, se prepara el stock de 10 mg/mL (0,01 g) en H₂O MiliQ.

4.- Incubar a 37 °C por 30 min.

5.- Adicionar 60 uL de SDS 10 % y 5 uL de proteinasa K (20 mg/mL).

*La proteinasa K se prepara el día que se va a usar, se prepara el stock 20 mg/mL (0,02 g) en H₂O MiliQ.

6.- Incubar por 20 min a 55 °C

* Dos opciones: 1º En agua a 55 °C

2° En termobloque a 55 °C

En mesa (no esterilidad)

7.- Agregar 250 uL de fenol:cloroformo y agitar vigorosamente por 3 min.

8.- Centrifugar por 5 min a 14000 rpm.

9.- Pasar la fase acuosa a un tubo nuevo (eppendorf de DNA con cloroformo).

*Por lo general se pueden tomar máximo 300 uL, sacar la fase acuosa con una p200 e ir tomando volúmenes de 100 uL, así se va a tener una idea del volumen que se va a sacar.

10.- Agregar 1:1 volumen de cloroformo.

*Ejemplo: Si se tomaron 300 uL en el punto 9, se agregan 300 uL de cloroformo

11.- Realizar un pequeño vortex y centrifugar por 5 min a 14000 rpm.

12.- Pasar la fase acuosa en un tubo nuevo (eppendorf de DNA).

*Por lo general se pueden tomar máximo 300 uL, sacar la fase acuosa con una p200 e ir tomando volúmenes de 100 uL, así se va a tener una idea del volumen que se va a sacar.

13.- Agregar 1/10 volumen de 5 M NaCl y 2.5 volúmenes de Etanol abs frio. Agitar por inversión suavemente.

* Ejemplo: Si se tomaron 200 uL en el punto 12, se agregan 20 uL de NaCl y 450 uL de ETOH abs

14.- Incubar a -20 °C por 15 min.

*En este punto puede dejar más tiempo de incubación, por si tiene que hacer otra cosa.

- 15.- Centrifugar por 10 min a 14000 rpm.
- 16.- Descartar el sobrenadante, tener cuidado con el pellet. *No siempre se ve.
- 17.- Agregar 500 uL de etanol al 70 %.
- 18.- Realizar un pequeño vortex y centrifugar por 10 min a 14000 rpm.
- 19.- Descartar el sobrenadante, tener cuidado con el pellet. *No siempre se ve.

En campana (esterilidad)

- 20.- Dejar secando a temperatura ambiente y luego agregar 30 uL de H₂O con RNAasa al 4 % (2 uL de RNAasa en 50 uL de H₂O milli Q)
- 21.- Guardar a 4 °C.

NOTAS

*El tubo de DNA debe quedar rotulado y con fecha de extracción.

*Se deberá correr un gel de agarosa para confirmar que funcionó la extracción y ver la integridad del DNA. Gel de agarosa 0.8 % o 1.2% (Ver protocolo electroforesis).

Detección de genes específicos (*tpi*, *tcdA*, *tcdB*, *cdtA*, *cdtB*) mediante PCR

Con el fin de lograr una identificación precisa de *C. difficile*, se llevó a cabo la detección de varios genes específicos de importancia mediante PCR, incluyendo el gen *tpi*, ampliamente utilizado como marcador de mantenimiento en estudios de identificación. El gen *tpi* codifica la enzima triosa fosfato isomerasa y presenta una longitud de 230 pares de bases (pb) durante la amplificación por PCR, según lo reportado previamente (Lemee *et al.*, 2004)

La amplificación del fragmento del gen *tpi* se realizó utilizando la técnica de PCR en punto final, siguiendo los procedimientos y condiciones previamente establecidos por

Lemee y Dhalluin *et al.* en 2004, los cuales se encuentran detallados en la **Tabla 4**.

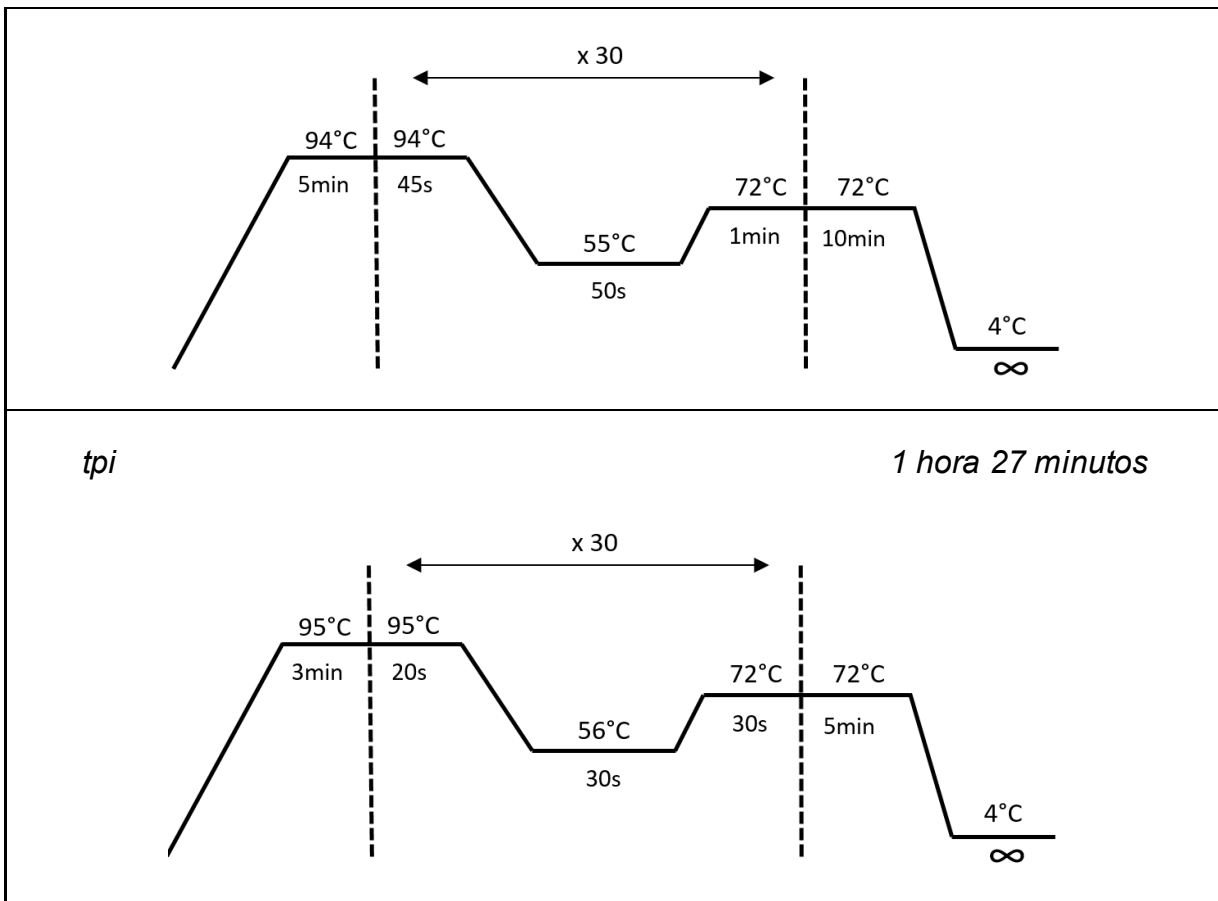
Para todas las reacciones de PCR, se prepararon mezclas maestras de acuerdo con las fórmulas especificadas en la **Tabla 5**. Estas mezclas se distribuyeron cuidadosamente en tubos Eppendorf destinados para PCR, garantizando la precisión y uniformidad en la preparación de las reacciones.

La detección de los genes de toxinas *tcdA*, *tcdB*, *cdtA* y *cdtB* se llevó a cabo mediante cuatro reacciones de PCR separadas, cada una empleando sus respectivos oligonucleótidos, pero manteniendo las mismas condiciones de amplificación. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Thermo 2720 de Applied Biosystems, utilizando los parámetros de amplificación correspondientes a la detección de genes de toxinas, tal como se detalla en la **Tabla 5**. Es importante señalar que se incluyó la cepa ATCC R20291 de *C. difficile* (A+B+CDT+, RT 027) como control positivo en estas reacciones para garantizar la fiabilidad de los resultados.

Tabla 14. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo				
Gen	Primer	Secuencia (5'-3')	Tamaño del amplicón (pb)	Referencia
16S rRNA	<i>CD16F</i>	GGAGGCAGCAGTGGGGAATA	1062	Pearson, <i>et al.</i> , 2008
	<i>CD16R</i>	TGACGGGCGGTGTGTACAAG		
<i>tpi</i>	<i>tpi F</i>	AAAGAAGCTACTAAGGGTACAAA	230	Lemee, <i>et al.</i> , 2004
	<i>tpi R</i>	CATAATATTGGGTCTATTCTCTAC		
<i>tcdA</i>	<i>tcdA F</i>	GCATGATAAGGCAACTTCAGTGGTA	629	Pearson, <i>et al.</i> , 2008
	<i>tcdA R</i>	AGTTCCTCCTGCTCCATCAAATG		
<i>tcdB</i>	<i>tcdB F</i>	CCAAARTGGAGTGTACAAACAGGTG	410	Pearson, <i>et al.</i> , 2008
	<i>tcdB R</i>	GCATTTCTCCGTTTTACAGCAAAGTA		
<i>cdtA</i>	<i>cdtA F</i>	GGGAAGCACTATATTAAGCAGAAGC	221	Pearson, <i>et al.</i> , 2008
	<i>cdtA R</i>	CTGGGTTAGGATTATTTACTGGACCA		
<i>cdtB</i>	<i>cdtB F</i>	TTGACCCAAAGTTGATGTCTGATTG	262	Pearson, <i>et al.</i> , 2008
	<i>cdtB R</i>	CGGATCTCTTGCTTCAGTC TTTA TAG		

En la tabla se muestra la secuencia y el tamaño del amplicón esperado.

Tabla 15. Condiciones para la obtención de productos de PCR	
<i>tcdA</i> , <i>tcdB</i> , <i>cdtA</i> , <i>cdtB</i> y <i>16s rRNA</i>	2 horas 13 minutos



Cabe destacar que la interpretación de los resultados de estas PCR se basó en la presencia o ausencia de bandas específicas. Para el gen *tpi*, un aislamiento de *C. difficile* se consideró *tpi*-positivo si se detectaban bandas correspondientes al pb del gen usado como control. Por otro lado, en la detección de la toxina binaria, algunos aislamientos podrían presentar una banda *cdtA* débil o ausente en la reacción de PCR dúplex de toxina binaria. En tales casos, cuando solo estaba presente la banda *cdtB*, se realizó una PCR adicional con mezclas monoplex separadas para *cdtA* y *cdtB*. Se consideró que un aislamiento de *C. difficile* era CDT+ únicamente si era positivo para ambos *cdtA* y *cdtB*.

En el caso de aislamientos de *C. difficile* que resultaron positivos en PCR para la detección del gen *tpi* pero negativos para los genes de toxinas clostridiales grandes (A-B-, *cdtA*-, *cdtB*-), se consideraron cepas no toxigénicas, lo que fue relevante para la

clasificación de las cepas.

11.5 ANEXO E. Protocolos de pruebas de susceptibilidad

11.5.1 Preparación de soluciones Stock de antibióticos para realizar las pruebas de susceptibilidad por dilución en agar para *C. difficile*.

Se deben preparar soluciones madre de por lo menos una concentración 10 veces mayor que la más alta del rango establecido (por Ej.: para un rango establecido de 8 a 32 µg/ml para metronidazol se podrían evaluar concentraciones hasta de 64 ug/mL, se podría preparar una solución madre de 640 µg/ml), y conservarse en alícuotas a -60°C por 6 meses o más. A continuación, se describen las fórmulas y procedimientos de preparación de cada uno de los stocks de antibióticos utilizados para las pruebas de dilución en agar.

Preparación de solución stock de eritromicina

Para determinar la cantidad de polvo antimicrobiano (ATB) o solventes necesarios para preparar una solución estándar (SE) se puede utilizar la siguiente fórmula:

Fórmula 1

$$\text{Pesada de ATB (mg)} = \frac{\text{Volumen de SE (ml)} \times \text{Concentración de SE (}\mu\text{g/ml)}}{\text{Potencia de ATB (}\mu\text{g/mg)}}$$

Para preparar 5ml de solución Stock de Eritromicina a una concentración de 10 000ug/mL, si la potencia del antibiótico es de 930 µg/mg (lo que significa que hay 930 microgramos de eritromicina por cada miligramo del antibiótico).

$$\text{Pesada de ATB (mg)} = \frac{\text{Volumen de SE (5 ml)} \times \text{Concentración de SE (10 000}\mu\text{g/ml)}}{\text{Potencia de ATB (930 } \mu\text{g/mg)}}$$

Pesada de ATB (mg): **53.76 mg = 0.05376 g de polvo** de eritromicina en 5ml de Etanol 90% como solvente

Concentraciones a probar para la prueba de dilución en agar de acuerdo a los valores de corte de CLSI:

8, 4, 2 y 1 ug/ml

Para preparar 4 ml de una solución de eritromicina con una concentración de **80 ug/ml** a partir de un stock de 10,000 ug/ml

$$V1 = (80 \text{ ug/ml} \times 4 \text{ ml}) / 10,000 \text{ ug/ml}$$

V1 = 0.32 ml de stock con 360 ul de agua

Posteriormente realizar 4 diluciones seriadas 1:2 a partir de la solución de 80 µg/ml (80, 40,20, y 10 µg/ml)

Posterior mente se tomara 1mL de cada dilución para diluirlo en placa Petri con 9ml de agar Mueller-Hinton sangre (Dilución 1:10) por ejemplo para la primera concentración 80 µg/ml / 10= 8 µg/ml.

Preparación de solución Stock de Tetraciclina

Para preparar 5ml de solución Stock de Tetraciclina a una concentración de 10 000ug/mL, si la potencia del antibiótico es de 900 µg/mg (lo que significa que hay 900 microgramos de Tetraciclina por cada miligramo del antibiótico).

$$\text{Pesada de ATB (mg)} = \frac{\text{Volumen de SE (5 ml)} \times \text{Concentración de SE (10 000}\mu\text{g/ml)}}{\text{Potencia de ATB (900 }\mu\text{g/mg)}}$$

$$\text{Potencia de ATB (900 }\mu\text{g/mg)}$$

Pesada de ATB (mg): **55.5 mg = 0.055 g de polvo de Tetraciclina** en 5ml agua como solvente

Concentraciones a probar para la prueba de dilución en agar de acuerdo a los valores de corte de CLSI:

16, 8, 4 y 2 ug/ml

Para preparar 4 ml de una solución de tetraciclina con una concentración de 160 ug/ml a partir de un stock de 10,000 ug/ml

$$V1 = (160 \text{ ug/ml} \times 4 \text{ ml}) / 10,000 \text{ ug/ml}$$

V1 = 0.064 ml de stock con 3936 ul de agua

Posteriormente realizar 4 diluciones seriadas 1:2 a partir de la solución de 160 µg/ml (160, 80,40,

y 20 µg/ml)

Posterior mente se tomara 1mL de cada dilución para diluirlo en placa Petri con 9ml de agar Mueller-Hinton sangre (Dilución 1:10) por ejemplo para la primera concentración 160 µg/ml / 10= 16 µg/ml.

Preparación de solución Stock de Cloranfenicol

Para preparar 5ml de solución Stock de Cloranfenicol a una concentración de 10 000ug/mL, si la potencia del antibiótico es de 980 µg/mg (lo que significa que hay 980 microgramos de cloranfenicol por cada miligramo del antibiótico).

$$\text{Pesada de ATB (mg)} = \frac{\text{Volumen de SE (5 ml)} \times \text{Concentración de SE (10 000}\mu\text{g/ml)}}{\text{Potencia de ATB (980 }\mu\text{g/mg)}}$$

$$\text{Potencia de ATB (980 }\mu\text{g/mg)}$$

Pesada de ATB (mg): 51.02 mg = **0.051 g** de polvo de cloranfenicol en 5ml de etanol 90% como solvente

Concentraciones a probar para la prueba de dilución en agar de acuerdo a los valores de corte de CLSI:

$$32, 16, 8, \text{ y } 5 \text{ }\mu\text{g/ml}$$

Para preparar 4 ml de una solución de cloranfenicol con una concentración de 320 ug/ml a partir de un stock de 10,000 ug/ml.

$$V1 = (320 \text{ ug/ml} \times 4 \text{ ml}) / 10,000 \text{ ug/ml}$$

V1 = 0.128 ml de stock con 3872 ul de agua

Posteriormente realizar 4 diluciones seriadas 1:2 a partir de la solución de 320 µg/ml (320, 160,80, y 40 µg/ml)

Posterior mente se tomara 1mL de cada dilución para diluirlo en placa Petri con 9ml de agar Mueller-Hinton sangre (Dilución 1:10) por ejemplo para la primera concentración 320 µg/ml / 10= 32 µg/ml.

Preparación de solución Stock de Cefotaxima

Para preparar 5ml de solución Stock de Cefotaxima a una concentración de 10 000ug/mL, si la potencia del antibiótico es de 964 µg/mg (lo que significa que hay 964 microgramos de cloranfenicol por cada miligramo del antibiótico).

Pesada de ATB (mg) = Volumen de SE (5 ml) x Concentración de SE (10 000µg/ml)
Potencia de ATB (964 µg/mg)

Pesada de ATB (mg): **51.86 mg = 0.0518 g de polvo de cefotaxima en 5ml de agua como solvente**

Concentraciones a probar para la prueba de dilución en agar de acuerdo a los valores de corte de CLSI:

32, 16, 8, y 5 µg/ml

Para preparar 4 ml de una solución de cefotaxima con una concentración de 320 ug/ml a partir de un stock de 10,000 ug/ml.

$V_1 = (320 \text{ ug/ml} \times 4 \text{ ml}) / 10,000 \text{ ug/ml}$

V1 = 0.128 ml de stock con 3872 ul de agua

Posteriormente realizar 4 diluciones seriadas 1:2 a partir de la solución de 320 µg/ml (320, 160,80, y 40 µg/ml)

Posterior mente se tomara 1mL de cada dilución para diluirlo en placa Petri con 9ml de agar Mueller-Hinton sangre (Dilución 1:10) por ejemplo para la primera concentración 320 µg/ml / 10= 32 µg/ml.

Preparación de solución stock para Vancomicina

La solución inyectable de Vancomycin cp se encuentra a 500mg por cada 10 ml de solución (50 mg/ml)= 50,000 ug/ml (Stock)

Concentraciones a probar para la prueba de dilución en agar de acuerdo a los valores de corte de CLSI:

4, 2,1 y 0.5 ug/ml

Para preparar 2ml de vancomicina con una concentración de 40ug/ml

$$V1 = (C2V2) / C1$$

$$V1 = (40\text{ug/ml} \times 2 \text{ ml}) / 50,000 \text{ ug/ml}$$

V1 = 0.0016 ml=1.6ul de stock con 1998.4 de agua

Posteriormente realizar 4 diluciones seriadas 1:2 a partir de la solución de 40 µg/ml (40, 20,10, y 5 µg/ml)

Posterior mente se tomara 1mL de cada dilución para diluirlo en placa Petri con 9ml de agar Mueller-Hinton sangre (Dilución 1:10) por ejemplo para la primera concentración 40 µg/ml / 10= 4 µg/ml.

Preparación de solución para Metronidazol

La solución de flagyl se encuentra a una concentración de Metronidazol 5mg/mL=500 ug/mL (Stock)

Concentraciones a probar para la prueba de dilución en agar de acuerdo a los valores de corte de CLSI:

32, 16,8 y 4 ug/ml

Para preparar 2ml de Metronidazol con una concentración de 320ug/ml

$$V1 = (C2V2) / C1$$

$$V1 = (320 \text{ ug/ml} \times 2 \text{ ml}) / 5000 \text{ ug/ml}$$

V1 = 0.128 ml= 128ul de stock con 1872ul de agua

Posteriormente realizar 4 diluciones seriadas 1:2 a partir de la solución de 320 µg/ml (320, 160,80, y 40 µg/ml)

Posterior mente se tomará 1mL de cada dilución para diluirlo en placa Petri con 9ml de agar Mueller-Hinton sangre (Dilución 1:10) por ejemplo para la primera concentración 320 µg/ml / 10= 32 µg/ml.

11.5.2 Método de determinación de CMI por dilución en agar para *C. difficile* (método de referencia para bacterias anaerobias CLSI M11-A8 2012

La dilución en agar es un método bien establecido para la determinación de la

sensibilidad a los antimicrobianos. El agente antimicrobiano se incorpora dentro del medio con agar, de manera tal que cada placa contenga una concentración de antibiótico diferente. Para lograr el rango de dilución deseado se deben preparar varias placas de medio, cada una con una determinada concentración de antimicrobiano, normalmente en escala aritmética decreciente en base 2 (CLSI M07-A9 2012). El documento M11-A8 2012 del CLSI describe los estándares específicos para analizar anaerobios utilizando ya sea procedimientos de CIM de dilución en agar o microdilución en caldo.

1. Preparación del medio

Normalmente el medio de cultivo empleado es base de agar MH, pero en función del microorganismo a testar podría resultar necesario emplear un medio diferente y la adición de nutrientes específicos al medio. Para bacterias anaerobias se utilizará Agar Brucella o agar Mueller Hinton suplementado con vitamina K1 (1 µg/ml) y 5% de sangre de carnero laca. (La sangre se laca congelándola y descongelándola alternativamente) (CLSI M11-A8 2012).

Una vez esterilizado el medio de cultivo, habitualmente mediante 15 minutos a 121°C en autoclave, debe dejarse enfriar hasta unos 40-50°C antes de añadir las soluciones con antimicrobiano y la sangre. Después se vierte en placas Petri estériles, evitando la formación de burbujas. Una vez solidificadas, las placas se usarán inmediatamente o se almacenarán refrigeradas y selladas para evitar su desecación (idealmente serán usadas el mismo día de su preparación).

2. Preparación de las diluciones en el agar

Se utilizarán los puntos de corte recomendados por el CLSI para metronidazol. (CLSI 2012)

Sensible= ≤ 8 ug/mL Resistente= ≥ 32 ug/mL

Se probaran 4 concentraciones de 8, 16, 32 y 64 ug/mL

Se Prepararan soluciones intermedias del antibiótico, partiendo de la solución Stock (10x 640ug/mL) haciendo diluciones sucesivas 1:2, 1:4, y 1:8 usando el método descrito en CLSI M100 (Figura 1).

1. Adicionar una parte de la solución de antimicrobiano 10X en nueve partes de agar fundido (Ej. 18 ml de agar con 2 ml de dilución de antibiótico)
2. Agregue la solución de antibiótico apropiada para cada dilución, en el agar fundido y enfriado a 45 - 50°C en baño de agua.
3. Agite la mezcla agar-antibiótico y colóquela en la placa de petri hasta alcanzar una profundidad de 3-4 mm.
4. La mezcla agar-antibiótico debe ser colocada rápidamente en las placas para evitar la solidificación total o parcial de la misma dentro del recipiente de mezclado, evitando la formación de burbujas.
5. Las placas se dejan solidificar a temperatura ambiente y si no se usan de inmediato se pueden guardar en bolsas plásticas selladas a 2 - 8°C por 5 días para ensayos de referencia o por mayor tiempo para uso de rutina.

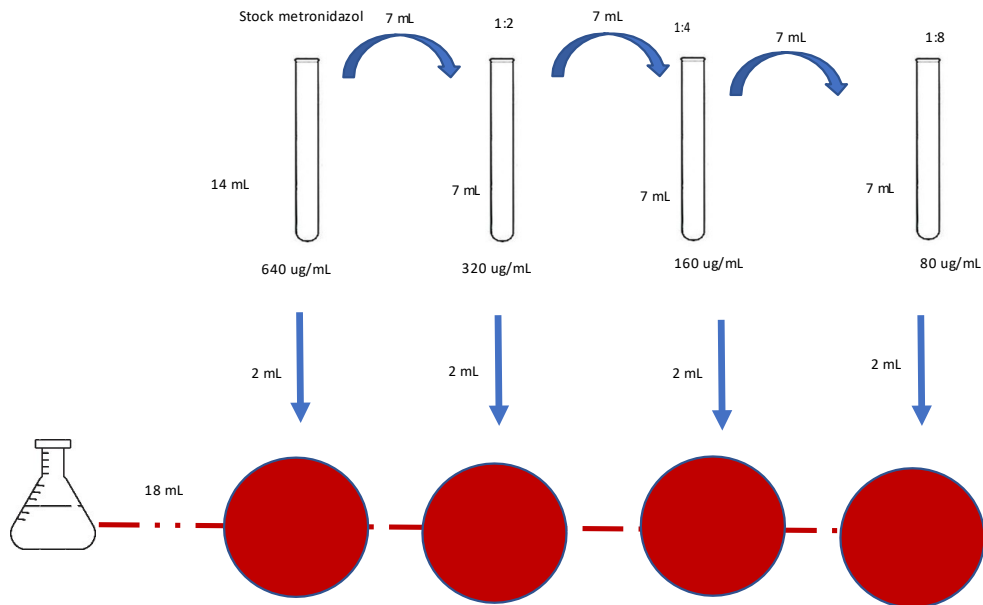


Figura 38. Preparación de las placas de agar con las diluciones de antibiótico. Basado en CLSI M11-A8 2012.

3. Preparación del inóculo para las pruebas de dilución

Realizar una suspensión de la cepa en tubos con caldo BHI, hasta alcanzar un 0.5 McFarland de turbidez. La densidad final del inóculo, en ambos casos, será de 1×10^4 en cada gota sobre la placa.

4. Inoculación de las placas de agar

1. Los tubos que contienen la suspensión bacteriana ajustada y diluida (10^7 UFC/ml) se deben colocar en orden en una gradilla. Luego se debe distribuir una alícuota de cada tubo, bien homogeneizado (Figura 2).
2. Se debe marcar cada placa de agar para conocer la ubicación de los inóculos en la misma.
3. Aplicar una alícuota de 1 a 2 µl de cada inóculo sobre la superficie del agar, por medio del replicador, ansa calibrada o pipeta. Debe realizarse la dilución adecuada del inóculo de tal forma de obtener una concentración de 10^4 UFC/ inóculo.

4. Para comenzar se debe inocular una placa control de agar sin antibiótico (control de viabilidad) y luego se inoculan las que contienen las distintas concentraciones del antibiótico comenzando por la de menor concentración. Se debe inocular una segunda placa control de viabilidad al finalizar la serie, para confirmar que no hubo contaminación o un significativo efecto "carry over" de antibiótico durante el procedimiento.

5. Se debe realizar una muestra de cada inóculo sobre una placa de medio de cultivo sólido, e incubar "overnight" para detectar mezcla de cultivos y para contar, al día siguiente, con un cultivo fresco en caso de que la prueba se deba repetir.

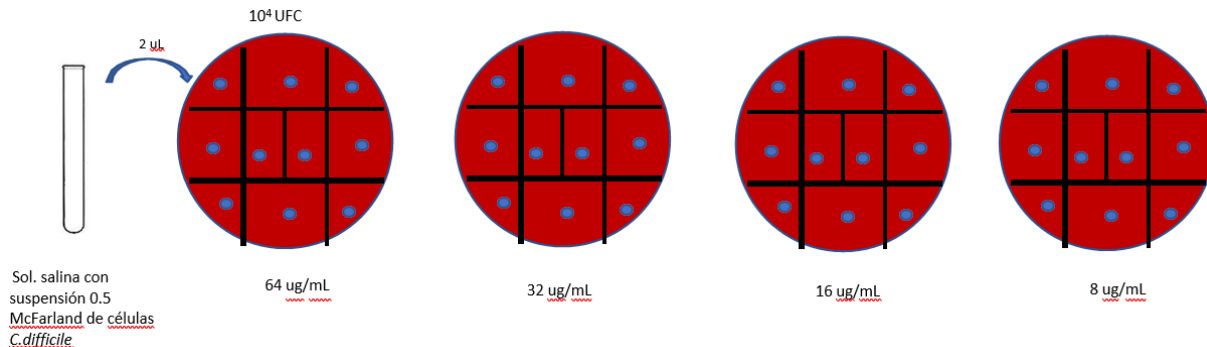


Figura 39. Inoculación en las placas de agar con el antibiótico respectivo.

Cada círculo azul representa una cepa diferente de *C. difficile*. En cada placa se inocularán 10 cepas diferentes. Basado en CLSI M11-A8 2012.

5. Incubación de las placas

Las placas inoculadas se deben mantener a temperatura ambiente hasta que el agar absorba el líquido que acompaña al inóculo, pero no más de 30 minutos. Luego se deben incubar invertidas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 horas en anaerobiosis

6. Determinación del punto final

1. Para determinar el punto final, las placas se deben colocar sobre una superficie oscura y opaca. La CIM se registrará como el valor de la menor dilución que inhibe completamente el desarrollo bacteriano, no se debe considerar el desarrollo de una

simple colonia o una tenue película causada por el depósito del inóculo. El punto final en estos casos corresponderá a la concentración en la que haya más del 80 % de reducción del crecimiento comparando con el control.

2. Si persisten 2 o más colonias en concentraciones superiores al aparente punto final, o si se encuentra desarrollo a altas concentraciones y no a bajas, se debe controlar la pureza del cultivo y probablemente deba repetirse la prueba

11.5.3 Protocolo prueba susceptibilidad E-TEST

BIOMÉRIEUX

REF 424000

059212 - 01 - 2022-06



E-TEST® Vancomicina (VAN) (0.016-256 µg/mL)



Uso previsto

E-TEST® es una técnica cuantitativa manual para la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de las bacterias aerobias grampositivas y gramnegativas no exigentes y bacterias exigentes. El sistema comprende un gradiente de antibiótico predefinido que se utiliza para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI, en µg/mL) de diferentes agentes antimicrobianos frente a microorganismos sembrados en medio de agar tras una noche de incubación.

Indicaciones de uso

E-TEST® VAN se puede emplear para determinar la CMI de la ceftarolina frente a los siguientes microorganismos:

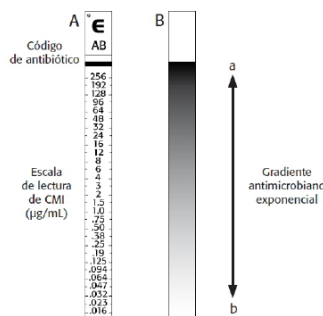
- Aerobios:
 - Aerobios grampositivos: *Staphylococcus aureus*
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Streptococcus agalactiae*
- *Haemophilus influenzae*

Principio

E-TEST® es una delgada tira de plástico no poroso e inerte con la escala de lectura de CMI en µg/mL por un lado (A) y un gradiente de antibiótico predefinido por el otro lado (B).

Cuando la tira se aplica a una superficie de agar inoculado, el gradiente de antibiótico preformado se transfiere inmediatamente a la matriz de agar para formar un gradiente estable, continuo y exponencial de concentraciones de antibiótico directamente bajo la tira. El crecimiento bacteriano se hace visible durante la incubación y aparece una elipse de inhibición simétrica centrada a lo largo de la tira. El valor de CMI se lee en la escala, en términos de µg/mL, en la zona de inhibición completa del crecimiento bacteriano, donde el extremo en punta de la elipse corta la tira.

Aunque se procesa de la misma manera que la prueba de difusión con disco (preparación del inóculo, elección del medio de cultivo y condiciones de incubación similares), E-TEST® no es un método de difusión y su concepto es totalmente diferente al de los métodos en disco convencionales. El gradiente de concentración antimicrobiana de E-TEST® está preformado, predefinido, es estable y no depende de la difusión.



Ejemplo de una tira E-TEST®
(hay disponibles diferentes escalas en función del fármaco)

Contenido del kit

IF-2023-60275302-APN-INPM#ANMAT

REF	424000	Envase unitario: 30 tiras de análisis	Cada tira contiene: <ul style="list-style-type: none"> Intervalo de CMI de Vancomicina*: 0.016-256 µg/mL *Origen: microbiano semisintético.
1 ficha técnica disponible para descargar en www.biomerieux.com			

Material necesario pero no suministrado

Materiales

- Equipamiento general de un laboratorio de microbiología.
- Torundas (estériles, no tóxicas y con un hilado no demasiado apretado) y tubos de ensayo.
- Aplicador manual [por ejemplo, el Mini Grip-It (Ref. 411200), el lápiz de vacío NEMA C88™ (Ref. 559804), pinzas o dispositivo similar].
- McFarland Standard (Ref. 70900) o equivalente.
- Incubador (+35 °C ± 2 °C).
- Microorganismos de control de calidad.
- Inoculador RETRO C80™ (opcional) (Ref. 559803).
- Aplicador SIMPLEX C76™ (opcional) (Ref. 559802).

Medios de cultivo recomendados

Utilice un medio bien definido y de alta calidad para pruebas de sensibilidad antimicrobiana (AST) que favorezca el crecimiento (consulte la **Tabla 1** al final del apartado de Modo operativo de esta ficha técnica). La marca elegida debería tener buena reproducibilidad entre lotes para garantizar que se obtienen valores de CMI precisos y fiables.

Para verificar la calidad de los medios, analice cepas de control de calidad apropiadas. Consulte la ficha técnica proporcionada por el fabricante de los medios.

Asegúrese de que la placa de agar tiene una profundidad de 4,0 ± 0,5 mm y un pH de 7,3 ± 0,1.

Precauciones de utilización

- Únicamente para diagnóstico *in vitro*.
- Exclusivamente para uso profesional. Está previsto que esta prueba la utilicen exclusivamente profesionales de laboratorio formados.
- Siga procedimientos asépticos en todo momento cuando manipule muestras bacterianas. Observe estrictamente las precauciones establecidas frente a los riesgos microbiológicos.
- La tira es para un solo uso y no se debe reutilizar.

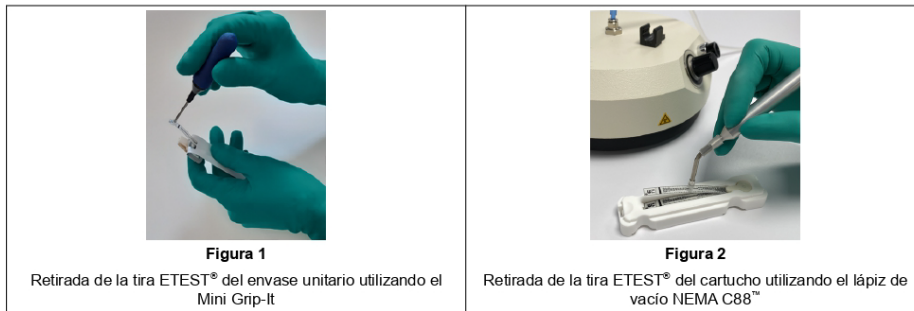
Almacenamiento y estabilidad

- Almacénelo según la temperatura especificada en el envase.
- No utilice los reactivos después de la fecha de caducidad indicada en el envase.
- Proteja en todo momento las tiras de ETEST® de la humedad, el calor y la exposición directa a una luz intensa.
- No guarde las tiras ETEST® de envases unitarios que se hayan abierto.

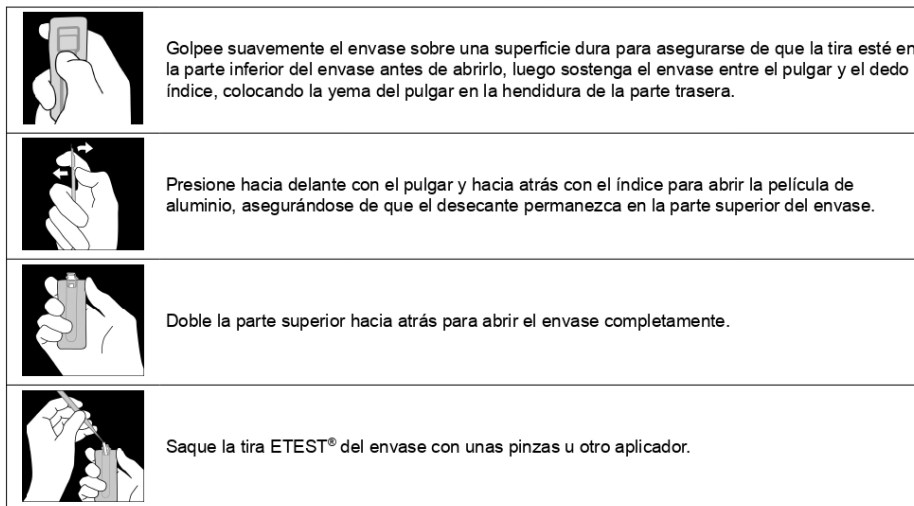
Utilización

- Antes de utilizar las tiras ETEST® de un envase cerrado, inspeccione visualmente el envase para asegurarse de que esté intacto. No las utilice si el envase presenta daños.
- Cuando se retira del refrigerador/congelador, deje que el envase unitario alcance la temperatura ambiente antes de abrirlo (aproximadamente 15 minutos si se almacena a +4 °C o aproximadamente 30 minutos si se almacena a -20 °C) y retire la tira del envase justo antes de usarla. Antes de abrir el envase, deje que se evapore completamente la humedad condensada en la superficie exterior.
- No toque la superficie de la tira que contiene el gradiente (el lado opuesto a la escala de CMI). Se recomienda utilizar un aplicador manual [por ejemplo, Mini Grip-It (**figura 1**), el lápiz de vacío NEMA C88™ (**figura 2**), pinzas o dispositivo similar] para recoger las tiras ETEST®. Cuando manipule las tiras ETEST® con las manos, pinzas o dispositivos similares, toque solamente el asa de la tira (la zona donde se encuentra el código de 2 o 3 letras).

IF-2023-60275302-APN-INPM#ANMAT



• Instrucciones para envases unitarios:



Instrucciones de uso

Preparación del inóculo e inoculación

1. Ponga el medio y las tiras ETEST® a temperatura ambiente.
2. Consulte la **tabla 1** al final de este apartado.
3. Prepare el inóculo: emulsione las colonias bien aisladas de una placa de agar incubada durante la noche. Para los microorganismos exigentes como neumococos, estreptococos, gonococos, anaerobios y *Haemophilus* spp., utilice la suspensión preparada en caldo durante 15 minutos. Asegúrese de que la suspensión del inóculo tenga el número correcto de UFC/mL (unidades formadoras de colonias) para que coincida con el patrón de McFarland apropiado; especialmente importante para los microorganismos exigentes y mucoides. Si el inóculo es correcto, se obtendrá un crecimiento confluyente o casi confluyente después de la incubación.
4. Los patrones de turbidez de McFarland no garantizan el número correcto de células viables en la suspensión. Haga un recuento de las colonias con regularidad para verificar si el procedimiento proporciona el número correcto de células viables en UFC/mL. Consulte el apartado **CONTROL DE CALIDAD**.
5. Inoculación: sumerja una torunda estéril, no tóxica y con un hilado no demasiado apretado en la suspensión del inóculo y elimine el exceso de líquido presionando la torunda contra la pared interna del tubo de ensayo. Retire más líquido al sembrar una placa de 90 mm y menos para una placa de 150 mm. Pase la torunda por la superficie completa del agar tres veces, girando la placa aproximadamente 60 grados cada vez, para asegurar una distribución

IF-2023-60275302-APN-INPM#ANMAT

11.6 ANEXO F. Calidad de las secuencias genómicas

	REF_R20291_fasta	MX_MAC18C1_fasta	MX_MAC7C2_fasta	MX_CDND10C2_fasta	MX_CDND2_fasta	MX_CD571_fasta	MX_CD355_fasta	MX_CD246_fasta	MX_CD100_fasta	MX_CD014C5_fasta
<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="width: 100px; height: 10px; background: linear-gradient(to right, red, white, blue);"></div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; width: 100px;"> Mala calidad Mediana calidad Buena calidad </div> </div>										
Estadísticas genómicas										
Fracción del genoma (%)	100	87.947	89.179	90.372	90.911	91.393	91.116	90.166	91.13	89.487
Ratio de duplicación	1	1.001	1.004	1.001	1.003	1.024	1.001	1.001	1.001	1.001
Alineación más grande	4 191 339	123 060	123 302	123 203	131 934	137 584	143 152	137 082	143 152	178 665
Longitud total alineada	4 191 339	3 672 728	3 691 786	3 740 920	3 765 667	3 780 825	3 772 732	3 734 829	3 772 169	3 691 424
NGA50	4 191 339	43 615	42 971	54 682	62 403	60 715	51 184	64 926	57 214	54 405
LGA50	1	31	30	28	23	23	24	23	24	25
Montajes erróneos										
# misassemblies	0	55	64	82	73	92	80	76	80	86
Longitud de los contigs mal ensamblados	0	2 889 165	2 998 105	3 766 891	3 664 282	3 856 649	3 768 302	3 645 641	3 814 121	3 941 600
Desajustes										
# discrepancias por 100 kbp	0	763.57	786.18	778.63	786.1	832.44	786.83	758.72	792.3	1603.18
# indeles por 100 kbp	0	34.2	33.72	34.32	34.68	37.53	35.76	31.78	35.97	56.29
# N's por 100 kbp	4.77	0	0	0	0	1.6	0	0	0	0
Estadísticas sin referencia										
# contigs	1	85	195	83	56	49	46	54	43	39
Contig más grande	4 191 339	259 229	272 196	577 257	745 358	734 790	561 177	738 909	561 177	722 205
Longitud total	4 191 339	3 820 265	3 912 795	4 195 220	4 061 152	4 052 964	4 055 537	4 145 106	4 056 073	4 151 960
Longitud total (>=1000 bp)	4 191 339	3 819 687	3 858 804	4 177 991	4 056 851	4 044 994	4 052 884	4 139 056	4 053 419	4 150 391

Figura 40. Imagen representativa de los parámetros de calidad de ensamblaje en 9 cepas de *C. difficile* secuenciadas en el presente proyecto

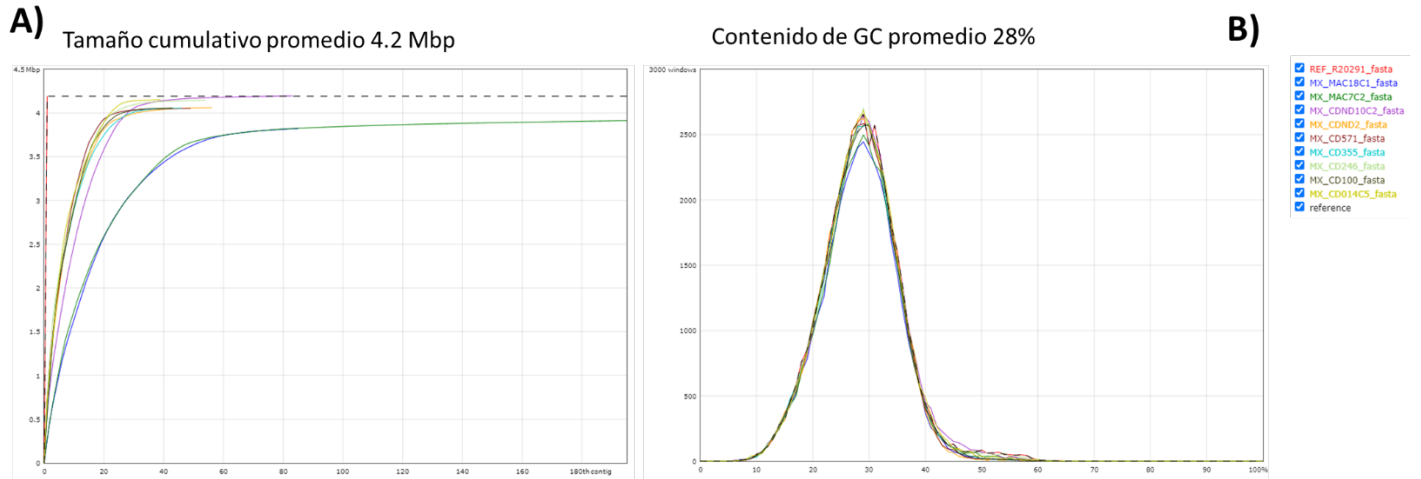


Figura 41. Gráficas estadísticas de calidad de ensamblaje en 9 cepas de *C. difficile* secuenciadas en el presente proyecto

Grafica de tamaño promedio de los genomas. B) Grafica de contenido promedio de Guanina-Citocina