



# BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

---

---



CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS

POSGRADO DE MICROBIOLOGÍA

**Determinación de *Clostridioides difficile* de muestras  
diarreicas de pacientes hospitalizados**

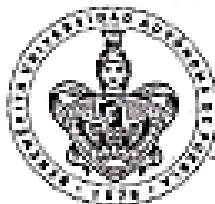
**TESIS**

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

PRESENTA:  
Q.F.B. NANCY GÓMEZ RIVERA

DIRECTOR DE TESIS:  
D.C. CLAUDIA FABIOLA MARTÍNEZ DE LA PEÑA

PUEBLA, PUE. DICIEMBRE 2019



**BUAP**

Puebla, Pue. a 2 de diciembre 2019.

**A LA ACADEMIA DEL POSGRADO  
EN MICROBIOLOGÍA  
CICM-ICUAP  
PRESENTE.**

Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de Tesis de Maestría de la alumna Nancy Gómez Rivera, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

**"Determinación de Clostridioides difficile de muestras diarréicas de pacientes hospitalizados."**

A nuestro juicio, la alumna Nancy Gómez Rivera 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. María Celia Cedillo Ramírez

  
D.C. Mercedes Ma. de la Paz Arenas Hdez.

  
D.C. Rosa-del-Carmen Rocha Gracia

  
M.C. Alejandra Espinosa Texis

# **Agradecimientos**

## **Agradecimientos Institucionales**

En primer lugar quiero agradecer a las instituciones por los apoyos otorgados para la realización de este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada en el Programa de Maestría del Posgrado en Ciencias (Microbiología) con número (CVU/Becario): 758427/628703

A la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado (VIEP) y al Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas (CICM) por el apoyo otorgado para presentación de este trabajo en el VI Congreso de Bioquímica y Biología Molecular de Bacterias y XLI Congreso Nacional de Microbiología.

Nuevamente agradezco a la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado (VIEP) por el apoyo otorgado para para la conclusión de esta tesis dentro del programa IV. Investigación y Posgrado. Apoyar a los programas de posgrado para lograr su incorporación al Padrón Nacional de Calidad. Indicador establecido en el Plan de Desarrollo Institucional 2017-2021.

Al Dr. Juan Xicohténcatl del Hospital Infantil de México “Federico Gómez” por las 2 muestras diarreicas y la 10 cepas que nos proporcionó para la realización de este trabajo.

A la Dra. Lilia Cedillo Ramírez directora del Centro de Detección Biomolecular de la BUAP por las 12 muestras diarreicas que nos proporcionó para la continuación de este trabajo.

## **Agradecimientos Personales**

Gracias a Dios por permitirme la vida y a todas las personas que me apoyaron y creyeron en la realización de este proyecto.

Gracias a mis padres por ser los principales impulsores de mis sueños, gracias a ellos por creer en mí y siempre desear lo mejor para mi vida, gracias por cada consejo y por estar en este nuevo triunfo.

A la Dra. Claudia por aceptarme y darme la oportunidad para desarrollar este proyecto.

A mi comité revisor, la Dra. Margarita, la Dra. Rosy, la Dra. Lillia y a la Maestra Alejandra, por tomarse el tiempo para revisar mi tesis y apoyarme en cualquier duda que tuviera

A todos mis compañeros de laboratorio, sin embargo, quiero agradecer de manera particular a:

A Montse por las innumerables charlas y risas en el laboratorio, por las múltiples colaboraciones arcanas.

A Elsy por sus consejos y por la paciencia a mi sin fin de dudas a las que con gusto, quiero creer, así respondía y por su compañía en el trascurso del laboratorio a mi casa.

A Meche por su apoyo en el trabajo de este proyecto, porque siempre fue un apoyo mutuo el que tuvimos cuando no entrabamos un resultado certero.

Por ultimo quiero agradecer a una persona especial para mí cuyo nombre no puedo mencionar, pero que durante momentos difíciles y de estrés, siempre me escucho, dándome su apoyo y deseándome todo lo mejor, gracias, en donde quiera que te encuentres.-

# Índice

---

<b>Abreviaturas</b> .....	7
<b>Lista de figuras</b> .....	8
<b>Lista de tablas</b> .....	10
<b>Resumen</b> .....	11
<b>1. Introducción</b> .....	12
<b>1.1 Características generales</b> .....	12
<b>1.2 Factores de virulencia principales</b> .....	13
1.2.1. Toxina A y Toxina B .....	13
1.2.2 Estructura de las toxinas .....	14
1.2.3 Mecanismo de acción de TcdA y TcdB .....	15
1.2.4. Toxina binaria .....	17
1.2.5 Mecanismo de acción de la toxina binaria de <i>C. difficile</i> (CDT) .....	17
<b>1.3 Otros factores de virulencia</b> .....	19
1.3.1 Fimbrias y pili .....	19
1.3.2 Flagelos .....	21
1.3.3 Proteínas de unión a Fibronectina .....	21
1.3.4 Proteína de choque térmico GroEL .....	21
1.3.5 Enzima glutamato deshidrogenasa (GDH) de <i>C. difficile</i> .....	22
1.3.6 Enzima Triosa Fosfato Isomerasa (TPI) de <i>C. difficile</i> .....	22
<b>1.4 Enfermedad</b> .....	23
1.4.1 Factores de riesgo de una CDAD .....	23
1.4.3 Manifestaciones clínicas .....	24
<b>1.5 Patogénesis</b> .....	24
<b>1.6 Diagnóstico clínico</b> .....	26
1.6.1 Características de las muestras .....	26
1.6.2 Criterios clínicos y de laboratorio para definir una CDAD .....	26
1.6.3 Procedimiento diagnóstico de la infección por <i>C. difficile</i> .....	27
1.6.4 Cultivo de <i>C. difficile</i> .....	29
1.6.5 Limitaciones del medio CCFA-TC .....	29
1.6.6 Sistemas anaerobios GasPak .....	30
<b>1.7 Tratamiento</b> .....	30
<b>2. Antecedentes Generales</b> .....	32
<b>2.1 Antecedentes Específicos</b> .....	34
<b>3. Planteamiento del problema</b> .....	35
<b>4. Justificación</b> .....	36
<b>5. Objetivos</b> .....	37
<b>6. Material y métodos</b> .....	38
<b>6.1 Muestras</b> .....	38
<b>6.2 Muestras sembradas en el medio CCFA-TC</b> .....	38
<b>6.3 Procesamiento de las muestras</b> .....	38

6.5 Extracción de DNA .....	40
6.5.1 Lisado en thermoblock.....	40
6.5.2 DNA Genómico .....	40
6.6 Identificación de genes específicos de <i>C. difficile</i> .....	41
7. Esquema general de trabajo .....	43
8. Resultados.....	44
8.1 Aislamiento de <i>C. difficile</i> en el medio CCFA-TC sin tratamiento con etanol .....	46
8.1.1 Hospital Ángeles Puebla .....	46
8.1.2 IMSS La Margarita Puebla .....	47
8.1.3 Determinación de Gram.....	47
8.1.4 Estandarización de los genes <i>16s rRNA, tcdA, tcdB, cdtA, cdtB</i> y <i>tpi</i> .....	49
8.1.5 Determinación de los genes <i>16s rRNA, tcdA, tcdB, cdtA</i> y <i>cdtB</i> del HA y del IMSS ...	49
8.2 Aislamiento de <i>C. difficile</i> de muestras tratadas con etanol.....	50
8.1.2 Hospital Ángeles Puebla .....	50
8.2.3 IMSS La Margarita Puebla .....	51
8.2.4 Determinación de Gram.....	52
8.3 Hospital Infantil de México (Federico Gómez) .....	54
8.3.1 Determinación de Gram.....	54
8.4 Aislamiento de <i>C. difficile</i> en el medio CCFA-TC .....	55
8.5 Determinación de gen <i>tpi</i> .....	57
8.6 Determinación de los genes de las toxinas de <i>C. difficile</i> .....	58
9. Discusión .....	66
10. Conclusiones .....	72
11. Perspectivas.....	73
12. Bibliografía.....	74
13. Anexos .....	85
13.1 CCFA-TC .....	85
13.2 Stock Cefoxitina.....	85
13.3 GES (Guanidine-EDTA-Sarkosyl) .....	85
13.4 BHI suplementado .....	86
13.5 Caldo BHI.....	86
13.6 Tinción de Gram.....	86
13.7 Preparación de Oligos a 10 $\mu$ M .....	87
13.8 Reactivos de PCR.....	87
13.8 Condiciones de PCR.....	88
13.9 BLAST de las secuencias de <i>16S rRNA</i> .....	89

## Abreviaturas

Símbolo	Definición
CDI	Infección por <i>C. difficile</i> por sus siglas en ingles
CDAD	Enfermedad asociada a <i>C. difficile</i> por sus siglas en ingles
TcdA	Toxina A
TcdB	Toxina B
PaLoc	Locus de patogenicidad
CDT	Toxina binaria de <i>C. difficile</i>
CDTa	Componente enzimático
CDTb	Componente de unión
CdtLoc	Locus de CDT
GTD	Dominio Glucosiltransferasa
LSR	Receptor de lipoproteína estimulada por lipolisis
gp96	Glicoproteína 96
CSPG4	Proteoglicano de sulfato de condroitina 4
NECTIN3	Molécula de adhesión celular de nectina 3
PVRL3	Poliovirus relacionado con el receptor 3
REA	Análisis de fragmentos de restricción
ROS	Especies reactivas de oxígeno
NOX	Complejo NADPH
EIA	Inmunoensayo enzimático
CCFA-TC	Agar Fructosa Cicloserina-Cefoxitina y Taurocolato
CCEY	Cicloserina-Cefoxitina y Yema de Huevo
GDH	Glutamato deshidrogenasa
TC	Cultivo toxigénico
NAAT	Pruebas de amplificación de ácido nucleicos
HA	Hospital Ángeles Puebla
FMT	Trasplante de materia fecal
NTCD	<i>C. difficile</i> no toxigénica

## Lista de figuras

**Figura 1.** Locus de patogenicidad de *C. difficile*.

**Figura 2.** Dominios de las toxinas A y B. A color rosa (GTD); B color amarillo (CROPs); C color verde (APD); D color azul (Dominio de translocación).

**Figura 3. A.** Mecanismo de acción de las Toxinas A y B de *C. difficile*. color rosa (GTD); color amarillo (CROPs); color verde (APD); color azul (Dominio de translocación). **B.** Efecto citotóxico de TcdB independiente de la glucosilación.

**Figura 4.** Locus Cdt o CdtLoc de *C. difficile*.

**Figura 5.** Mecanismo de acción de la Toxina binaria de *C. difficile* (CDT). **A.** unión de CDT a la célula huésped y modificación de la actina. **B.** formación de protuberancias basadas en microtúbulos como consecuencia de la despolimerización de la actina.

**Figura 6.** Resumen de los factores de riesgo que participan en el desarrollo de la enfermedad asociada a *C. difficile*.

**Figura 7.** Patogénesis de *C. difficile*.

**Figura 8.** Colonización de *C. difficile*.

**Figura 9.** Algoritmo diagnóstico para la confirmación de la infección por *C. difficile*.

**Figura 10.** Morfología colonial y fluorescencia de *C. difficile* en el medio CCFA-TC.

**Figura 11.** Sistemas de anaerobios GasPak.

**Figura 12.** Muestras recolectadas.

**Figura 13.** Determinación de Toxina A y B de *C. difficile* por inmunoensayo enzimático.

**Figura 14.** Muestras positivas y negativas de Toxina A y B por inmunoensayo enzimático en los hospitales.

**Figura 15.** Cultivo microbiológico en CCFA-TC de muestras de heces (método por dilución). Hospital Ángeles Puebla.

**Figura 16:** Cultivo microbiológico en CCFA-TC de muestras de heces (método por dilución). Instituto Mexicano del Seguro Social (“La Margarita” Puebla).

**Figura 17.** Tinción de Gram de las muestras de heces sin tratamiento con etanol. Hospital Ángeles Puebla y del IMSS.

**Figura 18.** Estandarización de los genes *16s rRNA*, *tcdA*, *tcdB*, *cdtA*, *cdtB* y *tpi*. **Figura**

**19.** Géneros identificados por secuenciación de 16S rRNA.



**Figura 20:** Cultivo microbiológico en CCFA-TC de muestra de heces tratadas con etanol. Hospital Ángeles Puebla.

**Figura 21:** Cultivo microbiológico en CCFA-TC de muestras tratadas con etanol. Instituto Mexicano del Seguro Social (“La Margarita” Puebla).

**Figura 22.** Tinción de Gram de las muestras de heces tratadas con etanol. Hospital Ángeles Puebla.

**Figura 23:** Ejemplo de cultivo microbiológico de las muestras positivas a *C. difficile* del Hospital Infantil de México (“Federico Gómez”).

**Figura 24.** Tinción de Gram de las cepas del Hospital Infantil de México (“Federico Gómez”).

**Figura 25.** Crecimiento en CCFA-TC de muestras de heces tratadas con etanol.

**Figura 26:** Gel representativo para la determinación del gen *tpi*:

**Figura 27:** Gel representativo de la determinación de los genes de las toxinas de *C. difficile* de la muestra Cd018-E

**Figura 28.** Tipo de producción de toxinas de *Clostridioides difficile* identificado en los tres Hospitales.

**Figura 29.** Comparación del Cultivo toxigénico vs Ensayo inmunoenzimático.

## Lista de tablas

**Tabla 1.** Componentes y cantidades del medio CCFA-TC utilizado en este trabajo.

**Tabla 2.** Oligonucleótidos utilizados en este trabajo

**Tabla 3.** Crecimiento en CCFA-TC.

**Tabla 4.** Resultado de la amplificación de los genes *tpi*, *tcdA*, *tcdB*, *cdtA* y *cdtB* de las cepas aisladas de las muestras del Hospital Ángeles Puebla.

**Tabla 5.** Resultado de la amplificación de los genes *tpi*, *tcdA*, *tcdB*, *cdtA* y *cdtB* de las cepas aisladas de las muestras del IMSS “La Margarita”.

**Tabla 6.** Resultado de la amplificación de los genes *tpi*, *tcdA*, *tcdB*, *cdtA* y *cdtB* de las cepas aisladas de las muestras del Hospital Infantil de México “Federico Gómez”.

**Tabla 7.** Datos de las muestras del Hospital Ángeles Puebla sin tratamiento con etanol.

**Tabla 8.** Datos de las muestras del Instituto Mexicano del Seguro Social “La Margarita” sin tratamiento con etanol.

**Tabla 9.** Datos de las muestras del Hospital Ángeles Puebla tratadas con etanol.

**Tabla 10.** Datos de las muestras del Instituto Mexicano del Seguro Social “La Margarita” tratadas con etanol.

**Tabla 11.** Datos de las muestras Hospital Infantil de México “Federico Gómez”.

## Resumen

*Clostridium difficile* también denominado como *Clostridioides difficile* es la primera causa de diarrea hospitalaria en los países desarrollados. Cuenta con múltiples factores de virulencia que contribuyen a su colonización intestinal. Los principales factores de virulencia producidos por *C. difficile* son la Toxina A (enterotoxina) y la Toxina B (citotoxina). Se han descrito cepas de *C. difficile* que producen una toxina binaria (CDT). Además, existen cepas que no producen ninguna toxina. El diagnóstico de la enfermedad asociada a *C. difficile* se basa en la combinación de un cuadro clínico compatible más un estudio de heces positivo para *C. difficile*. Existen diversos exámenes para su detección, entre los principales está el cultivo de heces como el estándar de oro, pero debido a que es una técnica lenta, laboriosa y que requiere personal calificado, solo se recomienda en casos especiales y para evaluar nuevas técnicas utilizadas en el laboratorio clínico. Mientras que en otras partes del mundo la situación emergente de infección por *C. difficile* es clara, en México, se desconoce la prevalencia y el comportamiento real de esta enfermedad, excepto en algunos hospitales académicos de alta especialidad. Por lo tanto, el propósito de este trabajo fue determinar la presencia y caracterización molecular de *C. difficile* para conocer su importancia en los entornos hospitalarios mexicanos. En el presente trabajo se estudiaron 44 muestras fecales provenientes de tres diferentes hospitales, dos de ellos de la ciudad de Puebla y uno de México. El aislamiento de *C. difficile* se hizo de las muestras fecales en el medio CCFA-TC en condiciones de anaerobiosis. Las muestras se trataron con etanol absoluto para reducir la contaminación de las otras bacterias presentes en la muestra y recuperar las esporas de *C. difficile*. Se llevo a cabo la tinción de Gram y se realizó la búsqueda de los principales factores de virulencia como son: la Toxina A (*tcdA*), la Toxina B (*tcdB*) y la toxina binaria (*cdtA* y *cdtB*); también se determino el gen *tpi* para confirmar la especie de la bacteria. Se encontró que de las 44 muestras fecales analizadas en el medio CCFA-TC solo 23 muestras crecieron en este medio, a las cuales se les analizó el gen *tpi*, detectándose en 19 muestras. El análisis de las toxinas de estas 19 muestras mostro las toxinas A<sup>+</sup>B<sup>+</sup> en 10 muestras, 2 muestras tenían las tres toxinas A<sup>+</sup>B<sup>+</sup>CDT<sup>+</sup> y en las 7 muestras restantes no se encontró ningún gen de las toxinas. Se logró demostrar la presencia de *C. difficile* en muestras de heces de pacientes provenientes de tres hospitales mexicanos.

## 1. Introducción

*Clostridium difficile* se describió por primera vez en 1935 por Ivan C. Hall y Elizabeth O'Toole en heces de recién nacidos sanos. Se le denominó entonces como *Bacillus difficilis* por sus características de morfología bacilar, requerimiento de condiciones anaerobias, formación de esporas y la dificultad de aislamiento (Hall y O'Toole, 1935). No fue sino hasta 2016 que *Clostridium difficile* fue reclasificado a *Clostridioides difficile* por un estudio basado en el gen 16S rRNA, donde se propuso inicialmente un cambio de *Clostridium difficile* a *Peptoclostridium difficile*, ya que el análisis filogenético reveló que *C. difficile* se encuentra dentro de la familia de *Peptostreptococcus*. Sin embargo, debido a costos en la industria de la atención médica por la pérdida de los términos “*C. diff*”, CDI y CDAD el cambio a *Clostridioides difficile* permitiría que dichas abreviaturas sigan siendo aplicables (Lawson, *et al.*, 2016).

### 1.1 Características generales

*C. difficile* es un bacilo Gram positivo, anaerobio estricto que mide entre 0.5 x 3 a 6 µm, algunas cepas son móviles por la presencia de flagelos peritricos (Flores y Duery, 2017). Otra característica importante es la formación de esporas, una estructura que le da resistencia ante condiciones ambientales adversas, como la deshidratación, el calor y el oxígeno, permitiéndole sobrevivir hasta meses en la superficie de objetos (el único desinfectante capaz de eliminar las esporas es el hipoclorito de sodio) (Barra, *et al.*, 2014). Otra característica peculiar es el olor que desprende debido a sustancias volátiles que sintetiza (ejemplo p-cresol), un olor característico que recuerda a las heces de los caballos (olor a establo de caballos) (Limbago, *et al.*, 2012).

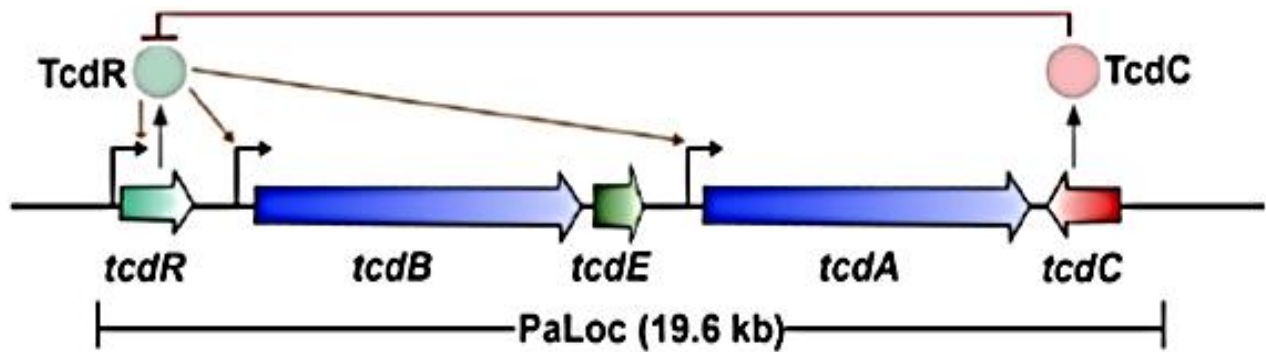
Después de 48 horas de incubación las colonias de *C. difficile* llegan a medir de 2 a 5 mm de diámetro, son circulares con un borde levemente filamentoso, poco ondulado a plano, aspecto de vidrio esmerilado y de color amarillo, presentan fluorescencia verdosa bajo luz ultravioleta de onda larga (365 nm), esta desaparece después de una hora de exposición al oxígeno (Salazar, *et al.*, 2013). Cuando las colonias se exponen al oxígeno pueden cambiar el color de amarillo a rosa y disminuir su viabilidad.

*C. difficile* ha sido aislado del medio ambiente (suelo, arena, heno) en animales de granja, animales salvajes y animales domésticos (perros y gatos) (Flores y Duery, 2017). En condiciones normales *C. difficile* no afecta a niños y adultos sanos ya que forma parte de la microbiota intestinal; sin embargo, algunos antibióticos pueden interferir en este equilibrio de manera que *C. difficile* puede empezar a multiplicarse y producir toxinas. En el ser humano, *C. difficile* está presente en un 50% de los recién nacidos y lactantes durante el primer año de vida, en un 3 a 5% en la población adulta como parte de la microbiota intestinal y hasta en un 25% en pacientes hospitalizados por tratamiento prolongado con antibióticos de amplio espectro, en pacientes inmunosuprimidos, y en pacientes con enfermedades crónicas o adultos mayores de 65 años (más susceptibles a la infección) (Zea, *et al.*, 2012).

## **1. 2 Factores de virulencia principales**

### **1.2.1. Toxina A y Toxina B**

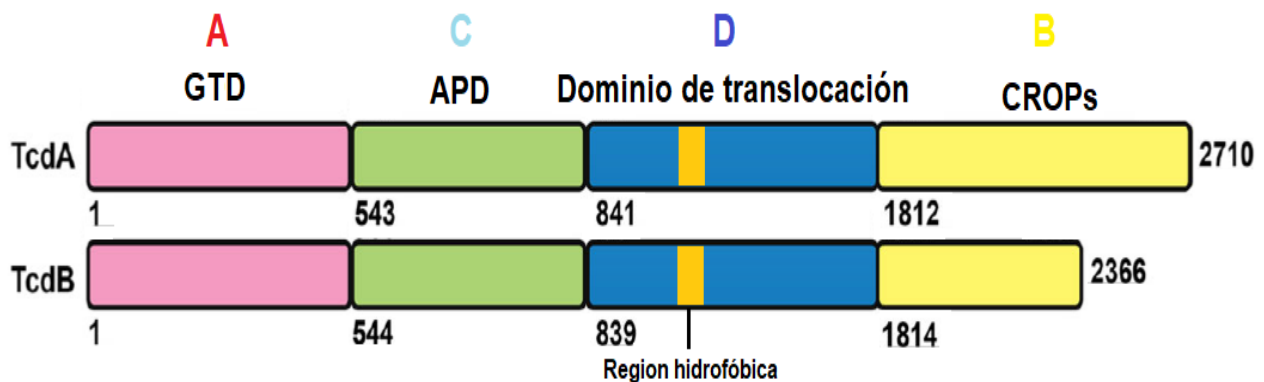
La toxina A y la toxina B son los principales factores de virulencia de *C. difficile*. La toxina A es una enterotoxina de 308 kDa y la toxina B es una citotoxina de 270 kDa (Aktories, *et al.*, 2017). La toxina A y la toxina B son dos proteínas de cadena única con actividad glucosiltransferasa que inactivan las Rho GTPasas (Rho, Rac, Cdc42) de las células dianas. Estas toxinas están codificadas por los genes *tcdA* y *tcdB* respectivamente. Los genes *tcdA* y *tcdB* se encuentran ubicados en una región del cromosoma llamada locus de patogenicidad (PaLoc de ≈19.6 kb), el cual contiene también 3 genes adicionales, *tcdR* codifica un factor sigma de ARN polimerasa que regula positivamente la expresión de las toxinas, *tcdC* parece codificar un represor de la expresión de las toxinas y *tcdE* que se cree tiene la función de facilitar la liberación de las toxinas al codificar un holina que forma un poro en la pared de *C. difficile* (Chandrasekaran y Lacy, 2017) (Figura 1). En cepas no toxigénicas (ni *tcdA* ni *tcdB*) el PaLoc se reemplaza por una secuencia no codificante de 75pb o 115pb o 7.5kb de función aún desconocida (Braun, *et al.*, 1996; Elliott, *et al.*, 2009; Dingle, *et al.*, 2011; Monot, *et al.*, 2015); sin embargo, estas cepas pueden adquirir el PaLoc de cepas toxigénicas por transferencia horizontal (Brouwer, *et al.*, 2013).



**Figura 1.** Locus de patogenicidad de *C. difficile*. Imagen tomada de (Chandrasekaran y Lacy, 2017).

### 1.2.2 Estructura de las toxinas

La toxina A y la toxina B tienen 2710 y 2366 aminoácidos respectivamente y consisten de al menos cuatro dominios según el modelo ABCD (Jank y Aktories, 2008). El dominio A biológicamente activo en el extremo N-terminal alberga la actividad glucosiltransferasa que modifica las proteínas Rho (GTD). Se sugiere que la parte C-terminal de la toxina (dominio B) está involucrada en la unión a receptor el cual consiste de oligopéptidos repetitivos combinados (CROPs). El dominio C (corte) sigue al dominio A y posee la función de proteasa (APD dominio de autoproteólisis). El dominio D probablemente esté involucrado en el suministro de la toxina (o parte de la toxina) al citosol de las células diana (Figura 2) (Aktories, *et al.*, 2017).



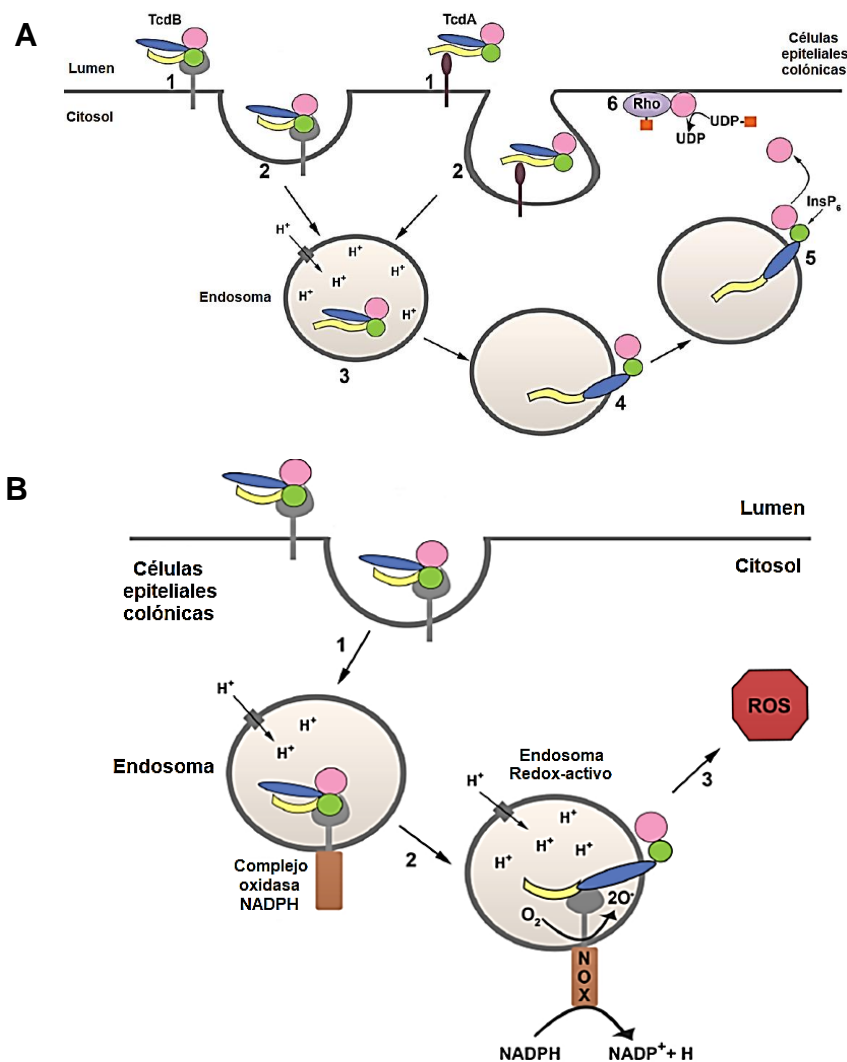
**Figura 2.** Dominios de las toxinas A y B. A color rosa (GTD); B color amarillo (CROPs); C color verde (APD); D color azul (dominio de translocación). Imagen modificada de (Orrell, *et al.*, 2017).

### 1.2.3 Mecanismo de acción de TcdA y TcdB

El primer paso para la acción tóxica por *C. difficile* es ejercido por las toxinas A y B que se unen a su receptor en las células del colon, sin embargo, aún se desconocen los receptores relevantes a los que se une TcdA y TcdB. Los estudios que se han realizado para conocer la naturaleza de estos receptores se han hecho en el modelo de conejo donde se encontró que TcdA se une a secuencias de glicanos  $\alpha$ -Gal-(1,3)- $\beta$ -Gal-(1,4)- $\beta$ -GlcNAc en los eritrocitos, pero estas secuencias no están presentes en las células humanas. Otro estudio se hizo en íleon de conejo, donde TcdA se unió a una glucoproteína (sacarasa-isomaltasa, SI), receptor que tampoco se expresa en las células epiteliales del colon humano. Posteriormente se identificó la glucoproteína 96 (gp96) en colonocitos humanos pero se sugiere que no es un receptor primario por lo que puede ser un co-receptor (Chandrasekaran y Lacy, 2017). En el 2015 Yuan, *et al.*, identificaron el proteoglicano de sulfato de condroitina 4 (CSPG4) como un receptor para TcdB (Yuan, *et al.*, 2015). Después de la identificación de CSPG4 como receptor para TcdB, se publicaron otros dos trabajos que muestran que NECTIN3 (también denominada proteína similar al receptor de poliovirus (PVRL3)) y las proteínas *frizzled* 1, 2 y 7 funcionan como receptores epiteliales de colon para TcdB (NECTIN3 y *frizzled* se expresan en la superficie del epitelio colónico humano) (LaFrance *et al.*, 2015; Tao *et al.*, 2016).

Después de la unión de TcdA y TcdB a su respectivo receptor, la célula ingresa las toxinas por endocitosis mediada por receptor. A pesar de la homología de TcdA y TcdB, ambas toxinas utilizan vías endocíticas distintas para intoxicar la célula huésped. TcdA ocupa la vía dependiente de dinamina e independiente de clatrina y TcdB la vía mediada por clatrina y dependiente de dinamina (Papatheodorou, *et al.*, 2010; Chandrasekaran, *et al.*, 2016). Una vez que las toxinas se internalizan en la célula, éstas se transportan en vesículas las cuales se fusionan a los endosomas tempranos, entonces la región hidrofóbica de las toxinas se desenvuelve del dominio de translocación (D) y se inserta en la membrana del endosoma formando así un poro. A dosis bajas, los dominios GTD y APD de TcdA/TcdB, se translocan a través del poro, donde la APD escinde proteolíticamente y libera la GTD en respuesta al hexafosfato de inositol (Insp6). El GTD libre inactiva las proteínas de la familia Rho al transferir una glucosa (cuadros naranjas) (Figura 3A). La glucosilación

interrumpe la señalización de las GTPasas, lo que lleva primero a efectos citopáticos y luego a efectos citotóxicos (Figura 3A). A altas dosis, TcdB (100pM o más), estimula una vía necrótica que es independiente de GTD (Figura 3B) (Orrell, *et al.*, 2017). TcdB induce la necrosis de las células diana al desencadenar una producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS) a través del ensamblaje del complejo NADPH oxidasa (NOX) en los endosomas. Los altos niveles de ROS promueven la necrosis celular por el daño al ADN, la peroxidación de lípidos, la oxidación de proteínas y/o la disfunción mitocondrial (Figura 3B) (Chumbler, *et al.*, 2012).

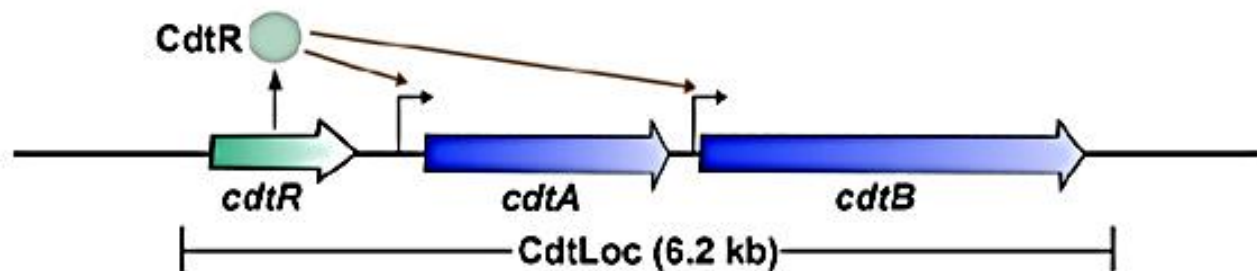


**Figura. 3. A.** Mecanismo de acción de las Toxinas A y B de *C. difficile*. color rosa (GTD); color amarillo (CROPs); color verde (APD); color azul (Dominio de translocación). **B.** Efecto citotóxico de TcdB independiente de la glucosilación. Imagen tomada de (Orrell, *et al.*, 2017).



#### 1.2.4. Toxina binaria

La toxina binaria (CDT) solo es producida por algunas cepas de *C. difficile* (Gerding, *et al.*, 2014). La CDT pertenece a la familia de las toxinas ADP ribosilantes, donde también se encuentran la toxina C2 de *C. botulinium*, la toxina iota de *C. perfringens* y la CST de *C. spiroforme* (Aktories y Barth, 2004). Esta toxina consiste de dos componentes, un componente enzimático (CDTa) y un componente de unión a receptor (CDTb) (Gülke, *et al.* 2001). La CDT esta codificada por los genes *cdtA* y *cdtB* que se encuentran en una región cromosómica distinta a PaLoc, llamada Cdt o CdtLoc de 6.2kb. CdtLoc también contiene un tercer gen *cdtR* que regula positivamente a CDT (Figura 4). Las cepas negativas a CDT tienen una deleción de 2 kb dentro de CdtLoc.



**Figura 4.** Locus Cdt o CdtLoc de *C. difficile*. Imagen tomada de (Chandrasekaran y Lacy, 2017).

#### 1.2.5 Mecanismo de acción de la toxina binaria de *C. difficile* (CDT)

La actina es una proteína que desempeña un papel fundamental en diferentes procesos celulares como la fagocitosis, la adhesión, la morfología celular, el tráfico intracelular, etc., (Visa y Percipalle, 2010) es también el sustrato de modificaciones postraduccionales como la ADP ribosilación causada en este caso por la toxina CDT de *C. difficile*. CDT modifica la polimerización de la actina al ADP-ribosilar la G-actina en la arginina 177.

El primer paso es la unión de la CDT a su receptor (receptor de lipoproteína estimulada por lipólisis (LSR)) en las células diana, el componente de unión (CDTb) de CDT es el que se une al receptor LSR. Una vez que se une a este receptor en su forma monomérica, CDTb se polimeriza para formar heptámeros. La formación de heptámeros permite la unión del dominio CDTa. El complejo LSR-CDT es endocitado y en los endosomas a pH bajo el componente CDTb se une a la membrana endosómica formando un poro por el cual CDTa

se transloca al citosol (Gerding, *et al.*, 2014). En el citosol, CDTa ADP-ribosila la G-actina; la actina-ADP ribosilada no se puede polimerizar y se queda en su forma monomérica. Esta estructura que forma (ADP-R) actúa como proteína protectora que bloquea la polimerización en el extremo positivo de la F-actina lo que provoca la despolimerización del citoesqueleto de actina (Figura 5A) (Kühn y Mannherz , 2017).

La ADP-ribosilación de actina por CDT afecta la organización y la dinámica de los microtúbulos. Los microtúbulos se polimerizan en dirección de la membrana celular pero su crecimiento se bloquea por la red de actina que se encuentra debajo de la membrana celular. La actina captura y estabiliza los microtúbulos evitando aún más su crecimiento, pero debido a que CDT modifica la polimerización de la actina, el crecimiento de microtúbulos no se bloquea en la membrana celular, creando protuberancias llenas de microtúbulos que llegan a tener un diámetro de 0.05-0.5  $\mu\text{m}$  y diferentes longitudes de 5-150  $\mu\text{m}$  (Schwan, *et al.*, 2009). En estudios de microscopía electrónica estas protuberancias forman una red de filamentos en la superficie de las células epiteliales que aumenta la adherencia de la bacteria. El mecanismo preciso de la formación de protrusión inducida por CDT no es claro, pero algunos estudios sugieren un papel fundamental de las septinas (reguladas por la pequeña GTPasa Cdc42 y su proteína efectora Borg), ya que éstas se unen a la actina y también a los microtúbulos. Cuando ocurre la despolimerización de actina por CDT, las septinas se separan de la actina y se redistribuyen en el citosol y en la membrana. Las septinas forman un tipo de anillo en la membrana que parece un punto de contacto para los microtúbulos para guiarlos hacia la superficie celular y formar las protuberancias; esto se ha comprobado ya que al inhibir a las septinas, se reduce de gran manera la formación de las protuberancias (Figura 5B) (Nolke, *et al.*, 2016).

Otra consecuencia de la despolimerización de la F-actina inducida por CDT es el redireccionamiento de la fibronectina y de otras proteínas de la matriz extracelular desde la membrana basolateral de las células epiteliales al lado apical, donde facilitan la unión de la bacteria (Orrell, *et al.*, 2017). Las proteínas de la matriz extracelular (p. Ej., fibronectina) interactúan con los receptores de integrina en el lado basolateral de las

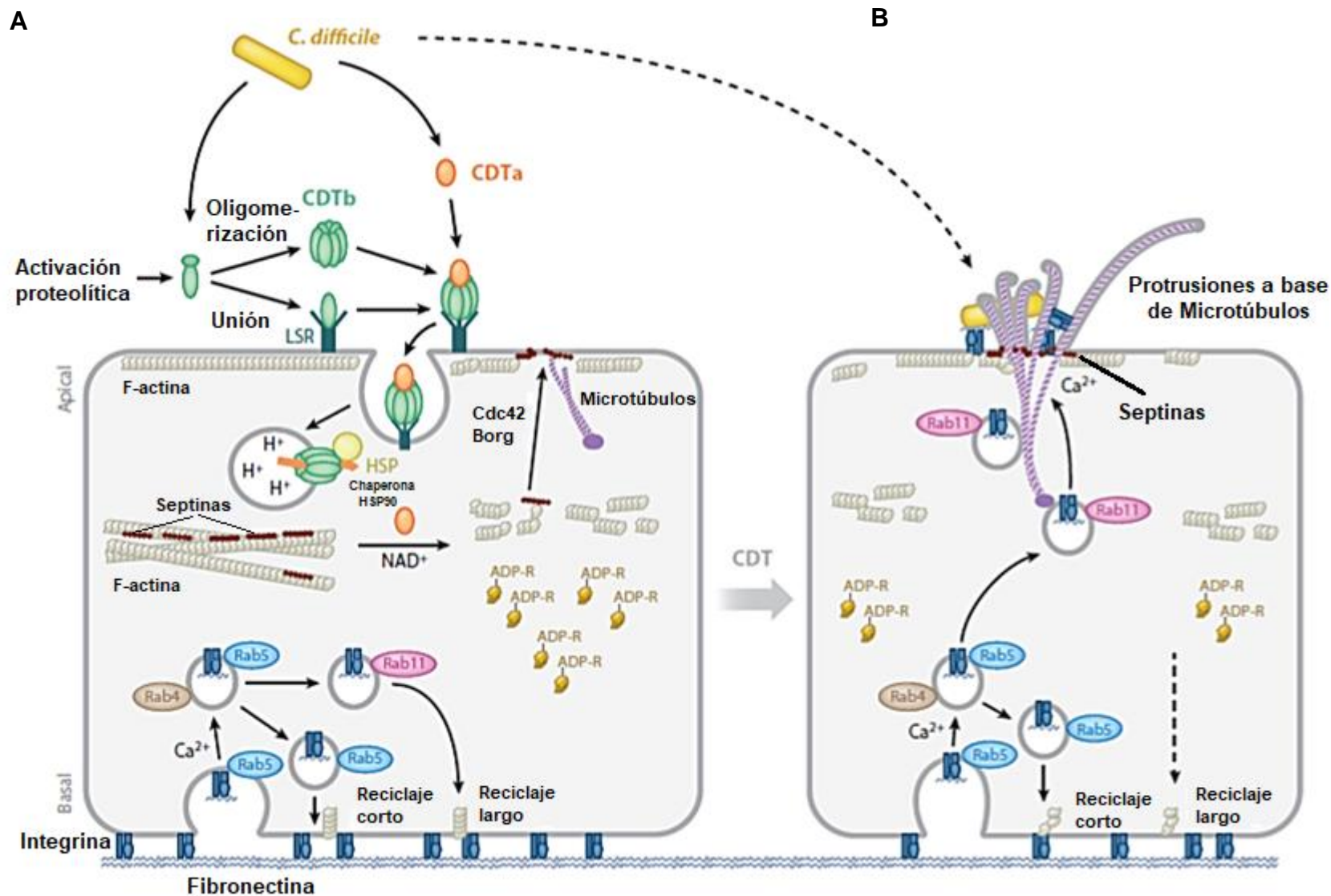
células epiteliales, donde se endocitan a través de receptores de integrina y alcanzan las vesículas asociadas a Rab5 y Rab11. La despolimerización parcial de actina inducida por CDT altera el reciclaje de vesículas. Al usar microtúbulos como pistas, las vesículas se traslocan a la membrana apical, donde se liberan fibronectina y otras proteínas de la membrana extracelular. Por lo tanto, la adherencia de las bacterias puede incrementarse mediante la formación de una red similar a un tentáculo basada en microtúbulos y mediante la acumulación de glucoproteínas adhesivas en la superficie apical de las células (Figura 5B) (Schwan, *et al.*, 2014).

### **1.3 Otros factores de virulencia**

Aunque TcdA y TcdB son los principales factores de virulencia de *C. difficile*, hay otros factores que pueden desempeñar un papel en la adherencia y la colonización de la bacteria, estos son, las proteínas de unión a fibronectina, flagelos, fimbrias y la proteína de choque térmico GroEL (Awad, *et al.*, 2014).

#### **1.3.1 Fimbrias y pili**

Solo algunas cepas de *C. difficile* tienen fimbrias, las cuales tienen un 4-9 nm y una longitud de hasta 6 µm y parecen ser origen polar (Borriello, *et al.*, 1988) aunque parece que no hay correlación entre la presencia de fimbrias y la capacidad de causar una CDI (Awad, *et al.*, 2014). Mediante análisis bioinformáticos se ha demostrado que la mayoría de cepas de *C. difficile* codifican genes para un pili tipo IV (Janoir, 2016 y Awad, *et al.*, 2014). El papel del pili tipo IV en la fisiopatología de *C. difficile* aún es hipotético; sin embargo, está involucrado en la autoagregación bacteriana a altas concentraciones de c-di-GMP (Bordeleau, *et al.*, 2015), lo que plantea la hipótesis de que la regulación inversa de la motilidad y la autoagregación promueve la formación de biopelículas (Purcell, *et al.*, 2012). No obstante no hay muchos que definan el papel de las biopelículas en CDI y sus recurrencias, pero se ha demostrado que estas biopelículas mejoran la resistencia de *C. difficile* a los antibióticos así como al estrés por el oxígeno y la persistencia de la bacterias como espora (Dawson, *et al.*, 2012 y Semenyuk, *et al.*, 2014).



**Figura 5.** Mecanismo de acción de la Toxina binaria de *C. difficile* (CDT). **A.** unión de CDT a la célula huésped y modificación de la actina. **B.** formación de protuberancias basadas en microtúbulos como consecuencia de la despolimerización de la actina. Imagen modificada de (Aktories, *et al.*, 2017).

### **1.3.2 Flagelos**

Se sabe que algunas cepas de *C. difficile* son móviles y poseen flagelos; las proteínas flagelares mejor caracterizadas son FliC y FliD (Tasteyre, *et al.*, 2000), el papel de los flagelos en la patogénesis de *C. difficile* aun es polemico, pero en algunos aislados clínicos se ha demostrado su importancia en la adherencia de la bacteria hacia las células del tejido intestinal (Janoir, 2016 y Awad, *et al.*, 2014). Los primeros estudios de los flagelos en el proceso de colonización mostraron que las proteínas purificadas FliC y FliD pueden unirse al moco murino y que las cepas no flageladas se adhieren menos al ciego del intestino del ratón que las cepas flageladas (Tasteyre, *et al.*, 2001). A pesar de que se ha dilucidado que las proteínas flagelares promueven la unión de *C. difficile* al moco, el papel de los flagelos en el proceso de colonización aún no es del todo claro.

### **1.3.3 Proteínas de unión a Fibronectina**

*C. difficile* se une a proteínas de la matriz extracelular como la fibronectina, el fibrinógeno, el colágeno y la vitronectina (Cerquetti, *et al.*, 2002). Se ha identificado a la proteína Fbp68 que se une a estos componentes de la matriz extracelular (Lin, *et al.*, 2011). Al igual que muchos factores de virulencia de *C. difficile*, el papel de la proteína Fbp68 en la patogénesis de la enfermedad no se comprende completamente, pero se ha demostrado que se une a estas proteínas (Janoir, 2016 y Awad, *et al.*, 2014).

### **1.3.4 Proteína de choque térmico GroEL**

La adherencia de *C. difficile* a las células epiteliales *in vitro* aumenta después del choque térmico, lo que ha llevado a la identificación y caracterización de las proteínas Cwp66 y de GroEL como proteínas participantes en la adherencia de *C. difficile* (Hennequin, *et al.*, 2001). Cwp66 es una adhesina, la primera que se identifica en clostridios, es sobreproducida en la superficie de la bacteria después de un choque térmico que media la adhesión a las células Vero (Waligora, *et al.*, 2001). GroEL es una proteína de 58 kDa que se expresa después de la exposición a una serie de tensiones (calor, choque ácido, osmótico, privación de hierro, presencia de concentraciones sub-inhedoras del antibiótico ampicilina) (Janoir, 2016; Awad, *et al.*, 2014).

### **1.3.5 Enzima glutamato deshidrogenasa (GDH) de *C. difficile***

La enzima GDH es una proteína asociada a la pared de *C. difficile*, se produce de forma constitutiva y en grandes cantidades es por ello que se considera un buen marcador para la detección de esta bacteria (Ledesma, *et al.*, 2017). El gen que codifica para esta enzima se denomina *gluD* y se ubica fuera del PaLoc, está altamente conservado en cepas toxigénicas y no toxigénicas de *C. difficile* (Vaustat y Rollet, 2018). La enzima GDH de *C. difficile* se ha caracterizado previamente por ser una enzima dependiente de NAD y está implicada en la degradación del glutamato (Anderson, *et al.*, 1993). No se conoce bien el papel que desempeña en *C. difficile* pero en un trabajo realizado por Girinathan, *et al.*, en el 2014, donde crean una mutante del gen *gluD*, encontraron que crecía más lentamente en comparación con la cepa original; también encontraron una mayor sensibilidad al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (datos inconclusos), sugiriendo que GDH es una enzima importante y necesaria para el crecimiento eficiente de *C. difficile* (Girinathan, *et al.*, 2014).

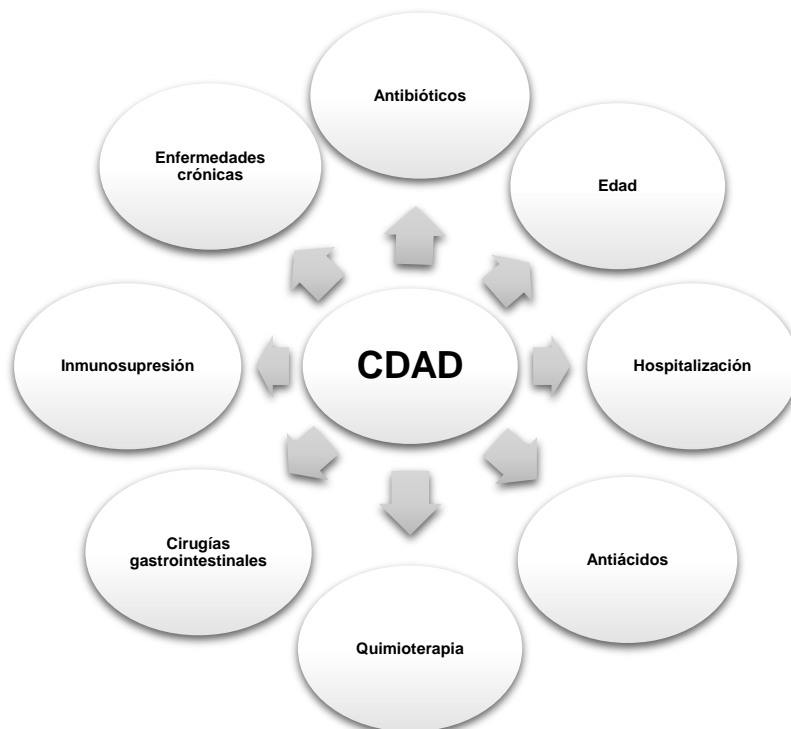
### **1.3.6 Enzima Triosa Fosfato Isomerasa (TPI) de *C. difficile***

Los genes de mantenimiento que codifican enzimas metabólicas pueden proporcionar marcadores alternativos al 16S rRNA para la caracterización genotípica y filogenética de especies bacterianas. El gen *tpi* codifica para la enzima triosa fosfato isomerasa y ofrece una herramienta precisa para la identificación de especies dentro del género *Clostridium* proporcionando un marcador alternativo de 16S rRNA. Lemee, *et al.*, en el 2004 diseñaron cebadores específicos para la amplificación de gen *tpi* de *C. difficile*, estos cebadores los dedujeron de un trabajo previo donde hicieron alineamientos de los fragmentos internos del gen *tpi* para diferenciar 12 especies de *Clostridium* incluyendo *C. difficile* (Dhalluin, *et al.*, 2003). Lemee, *et al.*, probaron la amplificación de *tpi* en 72 aislamientos de *C. difficile* de diversos orígenes hospedadores y geográficos; además, se ensayaron 11 especies diferentes a *C. difficile*, no detectando señal en estas especies diferentes de *Clostridium*, pero si se detectó el gen *tpi* en los 72 aislamientos de *C. difficile*, sugiriendo el uso de este gen *tpi* como un buen marcador para la identificación de *C. difficile* (Lemee, *et al.*, 2004).

## 1.4 Enfermedad

### 1.4.1 Factores de riesgo de una CDAD

Hay varios factores que influyen en el desarrollo de la enfermedad causada por *C. difficile*, pero el más importante es la administración de antibióticos de amplio espectro. Los antibióticos con mayor asociación son, Clindamicina, Ampicilina, Amoxicilina, Cefalosporinas y Fluoroquinolonas. Otros factores son la edad avanzada, especialmente ancianos hospitalizados, ya que este tipo de población presentan una falla en la producción de inmunoglobulina G anti-toxina A como respuesta inicial a la infección; pacientes con enfermedades crónicas; pacientes con estados de inmunosupresión; pacientes con quimioterapia; el consumo de antiácidos y cirugías gastrointestinales (Zea y Salazar 2012; Smits, *et al.*, 2016). La estancia prolongada en hospitales (en particular centros para personas de la tercera edad y UCI), es un factor importante debido a la capacidad de *C. difficile* de esporular. La presencia de esporas en el medio ambiente hospitalario y su transmisión a los pacientes se ve influenciada por las inadecuadas prácticas de desinfección de los espacios físicos (instrumentos médicos, baños utilizados por el paciente portador de *C. difficile*) y el lavado de manos del personal (Smits, *et al.*, 2016) (Figura 6).



**Figura 6.** Resumen de los factores de riesgo que participan en el desarrollo de la enfermedad asociada a *C. difficile*.

### 1.4.3 Manifestaciones clínicas

Los síntomas clínicos asociados a la infección por *C. difficile* varían desde una diarrea leve hasta una colitis fulminante (Smits, *et al.*, 2016). La diarrea leve a moderada, consiste de una diarrea abundante de 3 o más deposiciones diarias acompañadas de síntomas como fiebre, dolor abdominal y generalmente autolimitada. Si el tratamiento es ineficaz se puede llegar a una diarrea severa, la cual es una diarrea más profusa (más de 6 deposiciones al día) con fiebre o escalofríos o el hallazgo de colitis pseudomembranosa (placas amarillentas en el intestino), pudiendo llegar a la colitis fulminante, que es la manifestación más grave por presentar además de una colitis pseudomembranosa, alteración del estado general del paciente, si el cuadro se agrava a un más se puede presentar el megacolon tóxico (dilatación severa del colon) hasta llegar a la colectomía e incluso la muerte. En algunos casos se pueden presentar recurrencias, en un 15-45% de los pacientes que tuvieron la enfermedad asociada a *C. difficile* sufren recaídas en un periodo de 2 meses, posiblemente porque no se ha erradicado por completo las esporas en el intestino del individuo. También se pueden presentar, infecciones extra-intestinales, rara vez se ha reportado este tipo de infecciones (casos como septicemia, peritonitis, osteomielitis, abscesos viscerales y cerebrales). Finalmente la perforación del intestino por las toxinas de *C. difficile* puede facilitar el paso de estas bacterias al torrente sanguíneo causando una septicemia (Smits, *et al.*, 2016).

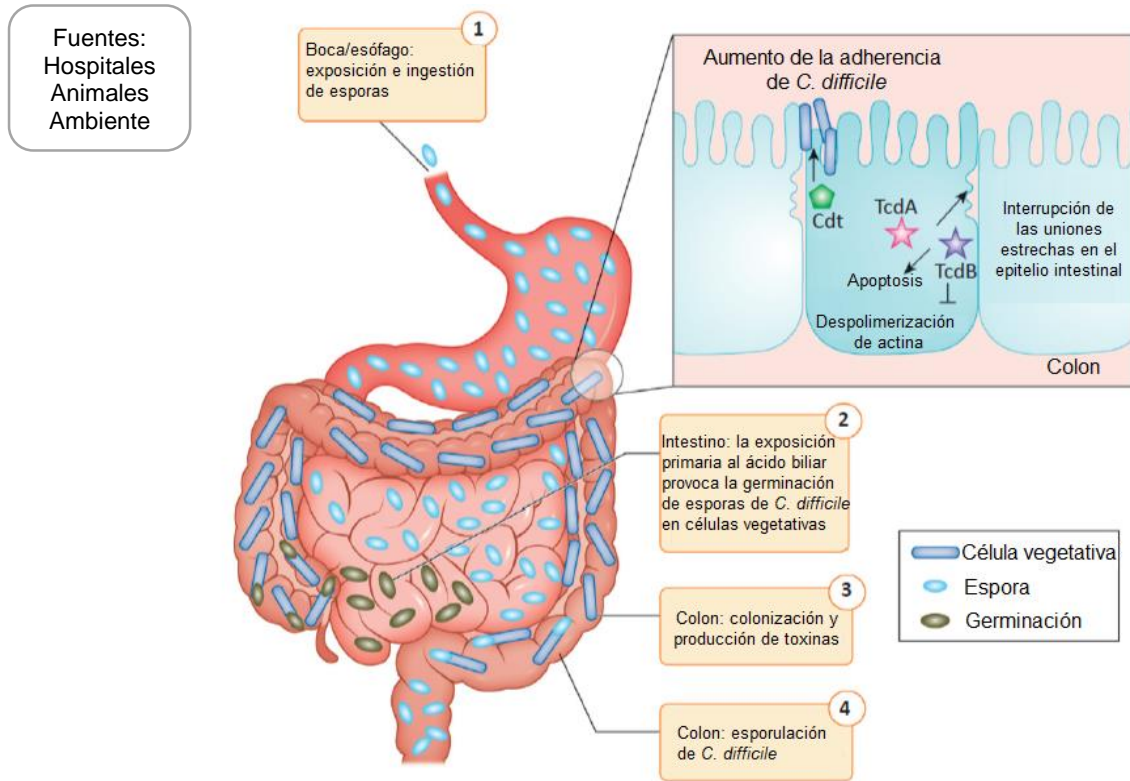
### 1.5 Patogénesis

*C. difficile* se transmite por vía oral-fecal por la ingestión de esporas, las cuales son resistentes a la acción del ácido gástrico y por lo tanto pueden germinar en el tracto gastrointestinal inferior (íleon). El componente que promueve la germinación de las esporas a células vegetativas con replicación activa, es el taurocolato (ácido biliar primario), un componente de los ácidos biliares (Figura 7) (Abt, *et al.*, 2016).

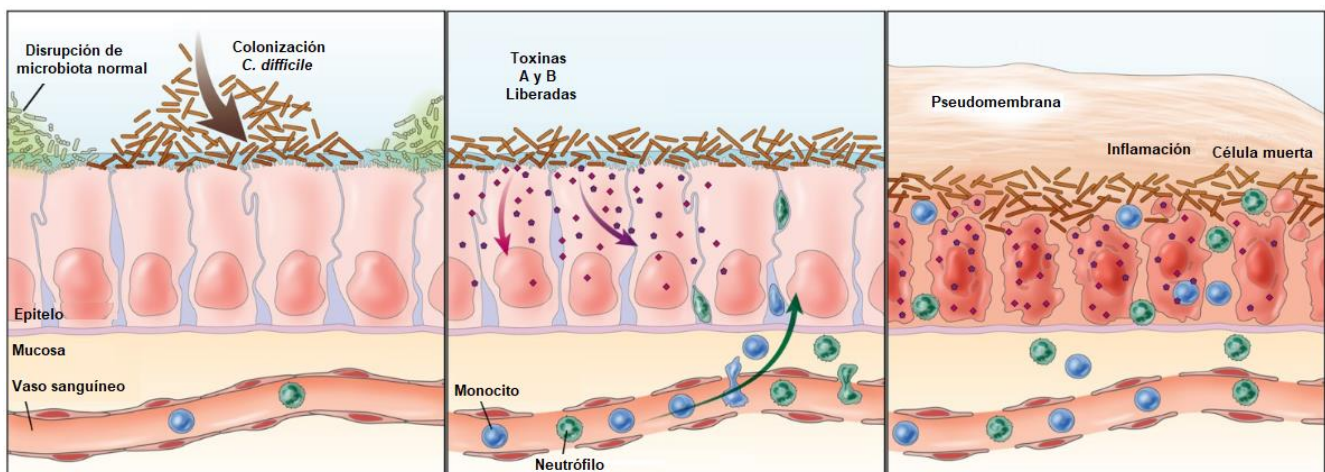
Una vez que las células vegetativa de *C. difficile* llegan al colon en un hospedero susceptible (paciente con una alteración del microbioma por la administración de antibióticos), proliferan y coloniza la mucosa (Rodríguez, *et al.*, 2013). *C. difficile* penetra en la capa de moco gracias a la producción de proteasas (Cwp84) con lo que puede adherirse fácilmente a los enterocitos por medio de sus adhesinas, dando lugar a la primera etapa de la colonización (Simor, 2010). Una vez que *C. difficile* ha colonizado el intestino, secreta las toxinas A y B, desencadenando



apoptosis en las células epiteliales y una cascada de inflamación (Figura 8) (Pant, *et al.*, 2011). Se ha informado que la expresión de las toxinas está influenciada por varios estímulos ambientales, incluida la temperatura, concentraciones subinhibitorias de ciertos antibióticos, señalización de quórum, ácidos grasos de cadena corta (ácido butírico), la presencia de una fuente de carbono rápidamente metabolizable y ciertos aminoácidos (Chandrasekaran y Lacy, 2017).



**Figura 7.** Patogénesis de *C. difficile*. Imagen modificada de (Sandhu y McBride, 2018).



**Figura 8.** Colonización de *C. difficile*. Imagen tomada de (McCollum y Rodriguez, 2012).

## **1.6 Diagnóstico clínico**

El diagnóstico de la enfermedad asociada a *C. difficile* se basa en la clínica del paciente, en exámenes de rutina (colonoscopia o estudios histológicos) y estudios de laboratorio (McCollum y Rodriguez, 2012). La manifestación clínica clave es la presencia de diarrea. Hasta ahora no hay una única prueba estándar para detectar a *C. difficile* a partir de este tipo de muestra, pero existe varios métodos, entre ellos el cultivo toxigénico (TC), ensayos de citotoxicidad, ensayos inmunoenzimáticos (EIA) para toxinas A, B y/o glutamato deshidrogenasa (GDH) y pruebas de amplificación de ácido nucleico (NAAT) (Peng, *et al.*, 2018).

### **1.6.1 Características de las muestras**

La diarrea acuosa o las heces blandas es la mejor muestra para el diagnóstico de la infección asociada a *C. difficile*. Cuando las muestras de heces se analicen en el laboratorio clínico por EIA, estas deben transportarse inmediatamente en recipientes estériles de cierre hermético y sin medio de transporte (muestra de heces frescas) en caso de que no se puedan analizar inmediatamente se pueden refrigerar de 2°C a 8°C hasta ser analizadas (durante las primeras 48-72 horas); esto debido a la inactivación de las toxinas a temperatura ambiente. Si la detección de *C. difficile* se realiza por cultivo toxigénico las muestras pueden analizarse después del tiempo recomendado, debido a la capacidad de *C. difficile* de producir esporas e incluso las muestras pueden congelarse (-60°C a -80°C) hasta su procesamiento por este método (Alcalá, *et al.*, 2016).

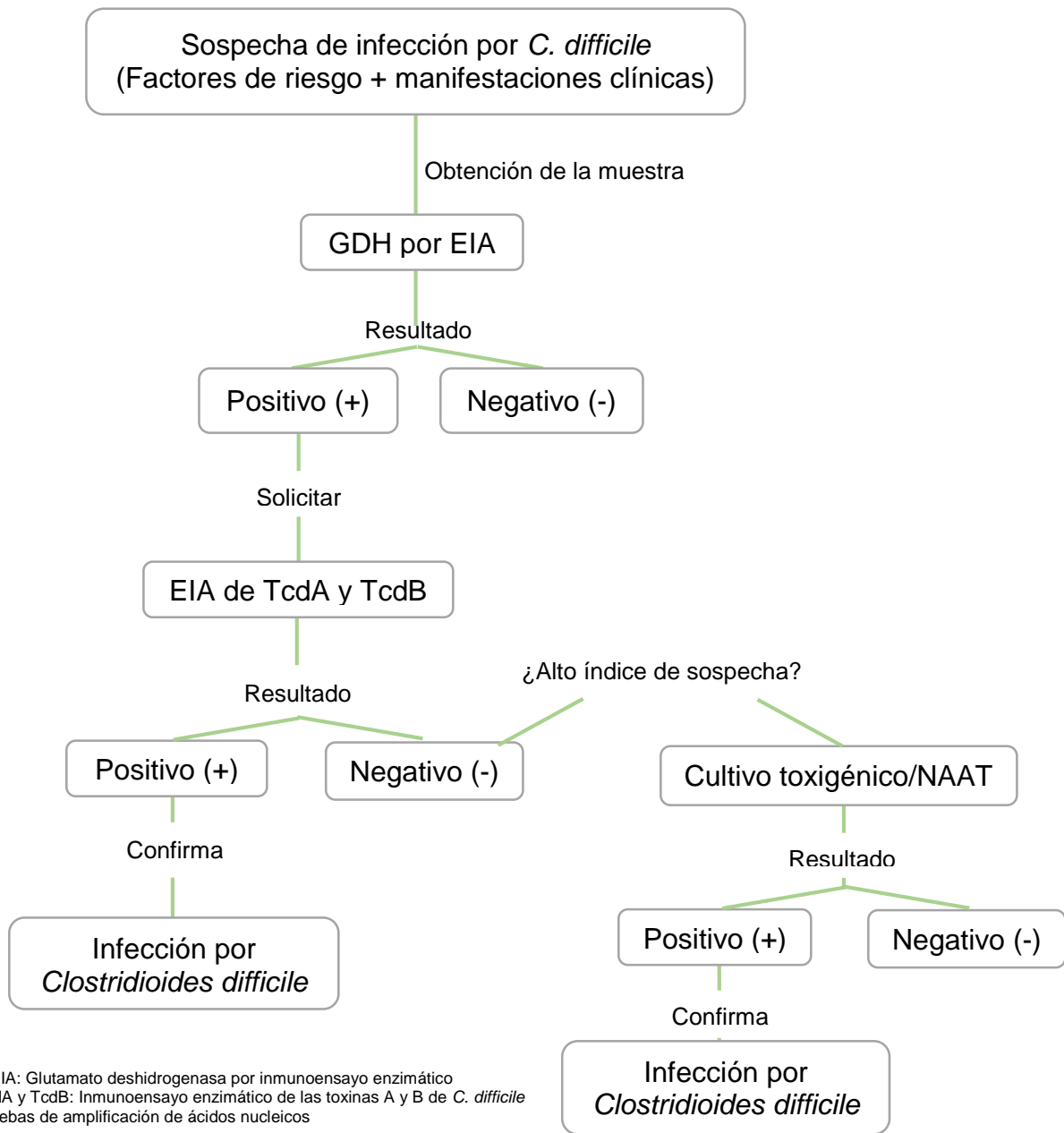
### **1.6.2 Criterios clínicos y de laboratorio para definir una CDAD**

Si se tiene sospecha de una CDAD se puede seguir una serie de criterios clínicos, el primer criterio es la presencia de 6 emisiones de deposiciones líquidas en las últimas 36 horas o 3 episodios en las últimas 24 horas, seguido de antecedentes de uso de antibióticos en un período de hasta 8 semanas previas al inicio del cuadro, observación de pseudomembranas en el estudio endoscópico de intestino bajo, confirmar en las muestras de deposiciones *C. difficile* toxigénico. Respuesta favorable a tratamiento específico y ausencia de otra etiología para la diarrea (Alcalá, *et al.*, 2016).

### 1.6.3 Procedimiento diagnóstico de la infección por *C. difficile*

Como se mencionó anteriormente no existe un único método para la detección de *C. difficile* en muestras diarreicas. Sin embargo, en los laboratorios clínicos la detección se hace mediante pruebas inmunoenzimáticas debido a que son pruebas rápidas, sencillas y de bajo costo, pero por su baja sensibilidad y especificidad las descartan como método único en el diagnóstico de *C. difficile*. No obstante, se hace una combinación de estas pruebas inmunoenzimáticas con otros métodos para mejorar el diagnóstico de la infección, el procedimiento se le conoce como algoritmo de diagnóstico (consiste de 2, 3 y múltiples pasos) (Figura 9) (Peng, *et al.*, 2018).

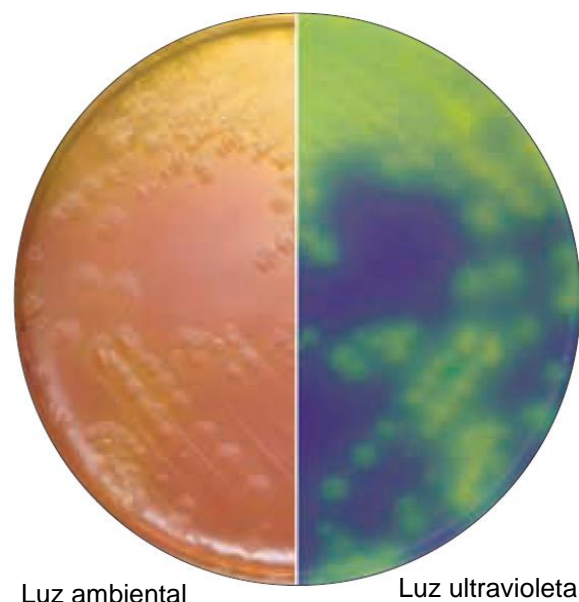
Se ha propuesto la técnica de detección de glutamato deshidrogenasa (GDH) la cual es una enzima de la pared celular de *C. difficile* que se produce con mayor cantidad que las toxinas. Es por ello que su sensibilidad y el valor predictivo negativo son muy altos. Es una técnica poco específica, dado que la GDH se encuentra tanto en cepas toxigénicas como no toxigénicas, por lo que un resultado positivo ha de confirmarse por detección de las toxinas (Rodríguez, *et al.*, 2013). La Sociedad Americana de Epidemiología Hospitalaria (SHEA) y la Sociedad Europea de Enfermedades Infecciosas y Microbiología clínica (ESCMID), sugieren hacer el diagnóstico en 2 o 3 pasos: Determinar la presencia de GDH mediante métodos inmunoenzimáticos (EIA); Detección de *TcdA* y/o *TcdB* mediante EIA. Si es negativo para GDH y/o toxinas, se da un resultado final negativo. Si da positivo para GDH y para alguna toxina, se informa como positivo. En los resultados positivos solo para GDH o para las toxinas se debe realizar pruebas confirmatorias, como el cultivo, estudios de citotoxicidad, así como técnicas moleculares (Cohen, *et al.*, 2010).



**Figura 9.** Algoritmo diagnóstico para la confirmación de la infección por *Clostridioides difficile*. Imagen modificada de (Álvarez, *et al.*, 2018)

#### 1.6.4 Cultivo de *C. difficile*

El cultivo microbiológico de *C. difficile* (cultivo toxigénico) se hace a partir de muestras fecales y posterior detección de las toxinas de los aislados de *C. difficile*. Los medios selectivos tradicionales (CCFA, Brazier o CCEY) han sido reemplazados por medios que llevan taurocolato que favorece la germinación de la esporas de *C. difficile* (Alcalá, *et al.*, 2016). El medio más utilizado es el CCFA-TC y se recomienda como medio selectivo y de diferenciación para el aislamiento de esta bacteria. Para mejorar la selectividad de la técnica, la muestra se somete previamente a un shock etanólico y la incubación se realiza en condiciones de anaerobiosis por 48 horas a 37°C (Figuras 10 y 11) (Tenover, *et al.*, 2011).



**Figura 10.** Morfología colonial y fluorescencia de *C.difficile* en el medio CCFA-TC. Imagen modificada de Manual of Microbiological Culture Media 2009.

#### 1.6.5 Limitaciones del medio CCFA-TC

Algunas especies de clostridios (por ejemplo, *butyricum*, *histolyticum*, *innocuum*, *sordellii* y *subterminale*) pueden crecer en este medio y producir colonias amarillas y fluorescencia verdosa parecida a *C. difficile*. Como algunos microorganismos anaerobios facultativos podrían producir reacciones similares a *C. difficile* se recomienda utilizar una placa incubada en atmósfera aerobia para confirmar que el aislamiento es un microorganismo anaerobio estricto (Hardy Diagnostics 2017).

### 1.6.6 Sistemas anaerobios GasPak

Los sistemas GasPak producen una atmósfera adecuada para favorecer el crecimiento de *C. difficile*, mediante el uso de sobres que desplazan el O<sub>2</sub> sustituyéndolo por otros de gases (H<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>) (Medical Laboratories 2016).



**Figura 11.** Sistemas de anaerobios GasPak. Imagen de BD 2017

### 1.7 Tratamiento

El primer paso para iniciar el tratamiento de la enfermedad asociada a *C. difficile* (CDI), es dejar el antibiótico que inicialmente produjo el problema, irónicamente el tratamiento para la CDI es otro antibiótico. El metronizazol y la vancomicina son los antibióticos de primera elección (Freeman, *et al.*, 2010). Recientemente se ha comercializado un nuevo antibiótico para el tratamiento de la enfermedad llamado fidaxomicina, se trata de un antibiótico específico contra *C. difficile* ya que actúa inhibiendo la ARN polimerasa de la bacteria, esto le da una ventaja con respecto a los otros dos antibióticos al respetar el microbioma del colon y al inhibir la esporulación de *C. difficile*, evitando así el aumento de recurrencias (Rodríguez, *et al.*, 2013). Otro tipo de tratamiento que ha comprobado una gran eficacia ha sido al trasplante de materia fecal (FMT) el cual consiste en la administración de bacterias fecales de un donante sano al tracto gastrointestinal de otra persona que presenta una patología concreta con el fin de manipular el microbioma del receptor y combatir el problema (García, *et al.*, 2015). En el FMT las heces de un donante sano (sometido a rigurosos controles sanitarios) se mezclan en una

solución salina hasta hacer una suspensión líquida la cual se filtra para eliminar las partículas grandes. Aunque en un principio el método de administración era por enema de retención, actualmente el tratamiento se ha modificado en función de las necesidades y de la situación clínica del paciente ya sea a través de la parte superior (sonda nasogástrica y sonda nasoduodenal) o inferior (colonoscopia) del tracto gastrointestinal. Sin embargo, actualmente se ha optado por la administración de cápsulas rellenas de bacterias fecales, permitiendo así una vía menos invasiva y dolorosa para el paciente. La finalidad del FMT es reestablecer la microbiota del paciente la cual evita la colonización de *C. difficile*. Este tratamiento ha sido tan eficaz que en 24 horas el paciente se reestablece por completo (Boyle, *et al.*, 2015). En algunos trabajos se está probando la colonización intencional del pacientes con cepas no toxigénicas de *C. difficile*, por ejemplo en un estudio que se realizó en el 2015 por Kociolek, *et al.*, mostró que la administración de esporas de una cepa de *C. difficile* no toxigénica fue efectiva para evitar recurrencia en la infección, pero aún se sigue en estudio el método para comprobar su eficacia (Kociolek, *et al.*, 2015).

## 2. Antecedentes Generales

Aunque se describió por primera vez en 1935, la importancia clínica de *C. difficile* no se reconoció hasta que varios pacientes murieron de colitis fulminante después de recibir clindamicina en la década de 1970. La prevalencia de *C. difficile* ha aumentado notablemente desde principios de los años 2000 y ahora forma parte de las causas más frecuentes e importante de diarrea a nivel hospitalario (Goudarzi, *et al.*, 2012).

En la actualidad se calcula que la infección por *C. difficile* que causa diarrea y colitis se presenta en 20,000 personas al año sólo en los Estados Unidos de Norteamérica, sin embargo, nuevos datos del Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) en el 2017, estima 223,900 casos en pacientes hospitalizados y 12,800 muertes en los Estados Unidos al año (CDC 2019).

La incidencia y gravedad de *C. difficile* ha aumentado en los últimos 20 años presentándose aún más en países desarrollados. Esta predisposición es más destacada en las personas de edad avanzada en el ambiente hospitalario, tan solo en los EE. UU, *C. difficile* es ahora la 18a causa principal de muerte en las personas mayores de 65 años (Depestele y Aronoff, 2015). La enfermedad por *C. difficile* constituye una importante carga de morbilidad, mortalidad y por tanto económica en los sistemas de salud. De acuerdo a un modelo económico de 2011, en los Estados Unidos se estiman los costos por infección en nueve mil dólares y anualmente y un costo global por más de 500 millones de dólares (McGlone, *et al.*, 2012).

Desde el punto de vista epidemiológico se han producido cambios importantes en la incidencia de la enfermedad producida por *C. difficile*; estos cambios están atribuidos a la aparición y diseminación de una cepa hipervirulenta conocida como NAP1/ BI/027 (por presentar el patrón de restricción [REA] tipo B1, el patrón de campo pulsado NAP1, pertenecer al ribotipo 027 y tener, además, el toxinotipo III). Esta cepa fue aislada por primera vez en 1984 y se encontró en Estados Unidos, en Canadá y en algunos países europeos, como el Reino Unido, Bélgica, Alemania y Holanda, pero debido al incremento de las infecciones por *C. difficile* no puede atribuirse solo a esta cepa, ya que en Europa se han descrito otros ribotipos, como a los 001, 053 y 106, o el 078, que posee un mecanismo similar de hiperproducción de toxinas y capaces de producir brotes de la enfermedad (Freeman, *et al.*, 2010).



Los agentes etiológicos de los brotes en Quebec y en varios hospitales de Estados Unidos fueron cepas hipervirulentas entre la que destaca NAP1/ BI/027. Esta cepa produce de 16 a 26 veces más toxinas que otras. Además de Canadá y todos los estados de los Estados Unidos, la presencia de esta cepa ha sido ampliamente documentada en Europa, incluyendo Reino Unido, Francia, Alemania, Italia, Dinamarca, Irlanda, Holanda, Austria, Polonia, Suiza, Noruega, Bélgica, Finlandia y España; en Asia, incluyendo Japón, Corea y Hong Kong y en Australia (Balassiano, et al., 2012).

Desde 2004, el papel de otras cepas emergentes de *C. difficile* se ha extendido, estas derivan de 39 ribotipos diferentes, pero la cepa 027 es el aislado más común responsable de la enfermedad asociada a *C. difficile*. Sin embargo, con el tiempo esto se ha ido modificando ya que se ha reportado el ribotipo 078 con una mayor prevalencia y el ribotipo 244 parece presentar mayores tasas de mortalidad que las tasas asociadas con el ribotipo 027. La prevalencia de otros ribotipos ahora parece superar la de 027, incluyendo los ribotipos 037, 018 y 078 (Morfin, et al., 2016).

En cuanto a los estudios realizados en América Latina, en la década de 1980 se informaron los primeros datos relacionados con *C. difficile* y sus toxinas en 122 niños menores de un año. El estudio se realizó en pacientes con diarrea asociada a antibióticos, diarrea no asociada a antibióticos y sanos; los resultados mostraron que el 23% de los niños con diarrea asociada a antibióticos tuvieron cultivo positivo para *C. difficile* y el 7.3% se detectó toxina B. Sin embargo, en niños sin diarrea que habían recibido antibióticos y en niños sanos se encontró *C. difficile* en cultivo en 20% y 27.2%, respectivamente, por ello, el papel de *C. difficile* y la presencia de toxinas en niños no fue totalmente esclarecido (Camacho, et al., 2009). De los 25 países que la Organización Panamericana de Salud considera pertenecientes a América Latina, se ha encontrado solo un informe reciente de enfermedad asociada a *C. difficile* en Brasil, Chile, Argentina, Perú, Costa Rica, México y Jamaica, solo registrándose casos en menos de la tercera parte de estos países (Organización Panamericana de la Salud, 2007).

## 2.1 Antecedentes Específicos

En el 2009, Camacho, *et al.*, publicó los resultados de un estudio de cuatro años realizado en un hospital de atención terciaria en la Ciudad de México, cuyo objetivo era determinar la incidencia y los factores de riesgo asociados con la enfermedad asociada a *C. difficile*. De las 3130 muestras fecales presentadas para la detección de TcdA, 170 (5,43%) fueron positivas. Se detectó un brote durante el estudio en agosto de 2005 cuando la incidencia de la enfermedad asociada a *C. difficile* aumentó de 5.04 a 29.5 casos por 1000 descargas hospitalarias (Camacho, *et al.*, 2009).

En el 2015 Camacho, *et al.*, publicaron un trabajo realizado en un Hospital de Nuevo León; en este estudio analizaron 106 muestras que se obtuvieron del periodo de marzo del 2011 hasta agosto del 2012, reportando así el primer informe de *C. difficile* ribotipo NAP1/B1/027 en México (Camacho, *et al.*, 2015).

Otro estudio llevado a cabo en el Hospital Civil de Guadalajara entre diciembre de 2013 y diciembre de 2014, como un caso-control de pacientes adultos con *C. difficile*, se evaluaron 288 pacientes adultos con diarrea definida y a pacientes con episodios de *C. difficile* nosocomial, encontrándose la cepa NAP1/B1/027 en 39% de los pacientes con *C. difficile* (Morfin, *et al.*, 2016).

### 3. Planteamiento del problema

A pesar de que actualmente las enfermedades diarreicas asociadas a *C. difficile* han ido en aumento en países desarrollados, en Latinoamérica y en particular en México se desconoce su prevalencia o si es una enfermedad sub-diagnosticada, así que como equipo de trabajo nos hicimos las siguientes preguntas.

- ❖ ¿Hay presencia de *C. difficile* en pacientes hospitalizados con diarrea en México?
- ❖ ¿Qué tan sensible y específica es la prueba de las toxinas por el método comercial?
- ❖ ¿Qué toxinotipo tienen las muestras aisladas de *C. difficile* en México?

#### **4. Justificación**

En el estado de Puebla, no se cuenta con información sobre la prevalencia de *C. difficile* en pacientes hospitalizados cursando con diarrea y relacionados con el consumo de antibióticos. Por lo tanto, no tenemos datos comparables con la literatura científica a nivel mundial, sobre el estado o zona donde hay mayor número de casos reportados. Debido a la capacidad patógena de las cepas, de los diferentes ribotipos encontrados, es necesario buscar, aislar y caracterizar *C. difficile* en pacientes hospitalizados en nuestra población y analizar en qué porcentaje existen en los aislados clínicos de estos pacientes y si concuerdan con los resultados de la detección de toxinas por pruebas inmunoenzimáticas usadas en la clínica.

## 5. Objetivos

### Objetivo General:

Estudiar la presencia de *C. difficile* en muestras de heces provenientes de pacientes hospitalizados con episodios de diarrea asociada a tratamiento con antibióticos.

### Objetivos Específicos:

- ❖ Aislar *C. difficile* de muestras diarreicas con un resultado Toxina A y B positivo o negativo por diagnóstico clínico.
- ❖ Confirmar especie por determinación del gen *tpi* que codifica para la enzima triosa fosfato isomerasa.
- ❖ Determinar genotipo toxigénico.

## **6. Material y métodos**

### **6.1 Muestras**

Se recolectaron un total de 44 muestras diarreicas de pacientes hospitalizados en el periodo comprendido de Julio 2018 a Julio 2019, de la cuales 21 muestras fueron del Hospital Ángeles Puebla, 11 muestras del Instituto Mexicano del Seguro Social (“La Margarita”) y 12 muestras del Hospital Infantil de México (“Federico Gómez”).

### **6.2 Muestras sembradas en el medio CCFA-TC**

Se pesaron de 0.01g a 0.3g de muestra fecal y se diluyó en un mililitro de agua tridestilada estéril, posteriormente se mezcló en el vortex hasta homogenizar completamente la muestra en el agua. De dicha mezcla se tomaron 100µL y se colocaron en una placa con el medio CCFA-TC, la muestra se distribuyó en toda la superficie del agar con la ayuda de una espátula de plástico, se dejó secar por 5 min y se incubó en condiciones de anaerobiosis a 37°C por 48 horas. Después del período de incubación se observó la morfología colonial y se seleccionó de 1 a 4 clonas por muestra sembrada en el medio CCFA-TC, las clonas seleccionadas se resembraron en placas de BHI suplementado (Extracto de levadura y Taurocolato), las placas se incubaron en condiciones de anaerobiosis a 37°C por 48 horas. Las clonas que crecieron en el medio BHI suplementado (Extracto de levadura y Taurocolato) se resembraron en caldo BHI (3 ml), los tubos se incubaron en condiciones de anaerobiosis a 37°C por 48 horas, se tomó 1 ml del caldo y se transfirió a un tubo Eppendorff, se obtuvo el paquete celular por centrifugación a 12 000 rpm por 5min para hacer lisados de las clonas, también del mismo caldo se tomó 500µL y se mezcló con 500µL de glicerol para guardarse a -80°C.

### **6.3 Procesamiento de las muestras**

Para aislar *C. difficile* de las muestras y evitar la contaminación por otros microorganismos que pudieran crecer en el medio CCFA-TC, se utilizó el método de choque con etanol. Se mezcló perfectamente en vortex partes iguales de la muestra fecal con etanol absoluto (1:1) de modo que toda la muestra estuviera en contacto con el etanol, la mezcla se dejó reposar por 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó la mezcla a 12 000 rpm por 30 segundos y se colocó todo el sobrenadante en la placa con el medio CCFA-TC con la ayuda de una espátula de plástico y se dejó secar por 5 min. Los cultivos se realizaron en anaerobiosis utilizando jarra gas-pack a 37°C por 48 horas. Después de las 48 horas de incubación se observó la morfología colonial y se seleccionó 1 a 4 clonas por muestra

sembrada en el medio CCFA-TC. Las clonas que crecieron en el medio BHI suplementado (Extracto de levadura y Taurocolato) se resembraron en caldo BHI (3 ml), los tubos se incubaron en condiciones de anaerobiosis a 37°C por 48 horas, se tomó 1 ml de caldo y se transfirió a un tubo Eppendorff, se obtuvo el paquete celular por centrifugación a 12 000 rpm por 5 min para hacer lisados de las clonas, también del mismo caldo se tomó 500µL y se mezcló con 500µL de glicerol para guardarse a -80°C.

#### 6.4. Agar Fructosa Cicloserina Cefoxitina y Taurocolato (CCFA-TC)

En 1979 George, *et al.*, desarrollaron un medio llamado CCFA (agar cicloserina-cefoxitina-fructosa), que es un medio sin sangre, basado en el agar de yema de huevo de McClung y Toabe con fructosa como reemplazo de la glucosa (George, *et al.*, 1979; McClung y Toabe, 1947). El agar cicloserina-cefoxitina-fructosa (CCFA) es medio selectivo y diferencial que se emplea para el aislamiento primario de *C. difficile* a partir de muestra fecales, posteriormente se volvió a modificar el medio agregando taurocolato (CCFA-TC) para aprovechar el ciclo de esporulación de *C. difficile*. En el presente trabajo se buscaron en la literatura los componentes del medio CCFA ya que no se pudo conseguir comercialmente y solo se agregaron los antibióticos cicloserina, cefoxitina y el taurocolato (LAB 90).

**Tabla 1.** Componentes y cantidades del medio CCFA-TC utilizado en este trabajo.

<b>Fórmula por litro de agua purificada</b>	
Peptona de caseína	25 g/L
Extracto de levadura	15 g/L
Agar	15 g/L
Fosfato disódico	5 g/L
Fructosa	6 g/L
Sulfato de Magnesio	0.1 g/L
Fosfato de potasio monobásico	1 g/L
Cloruro de sodio	2 g/L
Rojo neutro	0.03 g/L
Glucosa	1 g/L
Taurocolato	1 g/L
Hemina	0.01g/L
Cicloserina	0.5 g/L
Cefoxitina	16µL/L

La peptona y la fructosa suministran las fuentes necesarias de nitrógeno y carbono. Los fosfatos mantienen el pH. La cicloserina y cefoxitina son agentes selectivos para suprimir las bacterias acompañantes. El Taurocolato Sódico favorece la germinación de las esporas. La presencia del Rojo neutro, en el crecimiento de *C. difficile* permite ponerlo en evidencia por un cambio de pH (de rojo a amarillo).

El medio CCFA-TC se preparo de la siguiente manera: se pesó cada componente del medio (Tabla 1) y se mezclaron con agua tridestilada, se ajustó el pH a 7.3 y se esterilizo a 15 Lb por 15 min, después de esterilizarse se dejó enfriar (tolerable al dorso de la mano) y se agregaron los antibióticos (Cicloserina-Cefoxitina), se homogenizo y se vertió el medio en placas de 60x15 mm (aproximadamente 12 ml para cada placa) o en placas de 90x15mm (aproximadamente 20 ml para cada placa). Las placas inoculas se colocaron en forma invertida en la Jarra de anaerobios GasPak, se humedeció la tira Anaerotest® con 35 ml de agua tridestilada estéril, la tira se introdujo con la pagina impresa dirigida hacia las placas, se cerró inmediatamente la jarra de anaerobios y se incubó a 37°C por 48 horas.

## **6.5 Extracción de DNA**

### **6.5.1 Lisado en thermoblock**

El lisado en thermoblock se realizo en un volumen de 100 µL, se agregó 94 µL de buffer 10X (Tris-HCl 0.2M, KCl 0.5M, pH 8) y de 1 a 3 colonias bacterianas o 1 ml de cosecha de caldo, se adiciono 4 µL de lisozima (500 µL/ml), se dejó a temperatura ambiente por 15 min, posteriormente se agregó 2 µL de proteinasa K (10 mg/ml), el tubo se incubó en el thermoblock a 58°C por una hora, una vez transcurrido el tiempo se subió la temperatura a 90°C por 15 min para inactivar la proteinasa K. Se dejó enfriar y se centrifugo a 12 000 rpm por 10 min, el sobrenadante se pasó a un tubo nuevo, se midió la concentración de ADN genómico en el Nanodrop y se ajustó a 200ng.

### **6.5.2 DNA Genómico**

Para obtener el DNA genómico se inoculó una colonia de *C. difficile* en 3 ml de caldo BHI y se incubó a 37°C por 48 horas en condiciones de anaerobiosis. Se hizo la cosecha del caldo centrifugando a 12000 rpm por 10 min. Se desechó el sobrenadante (este y los siguientes



pasos se realizaron sin las condiciones de anaerobiosis). Se lavó el sedimento con 1 ml de tampón TE (se homogenizó con pipeta). Se centrifugó nuevamente a 12000 rpm por 10 min. Se desechó el sobrenadante.

El paquete celular se resuspendió con 50 µl de la solución de lisozima (50 mg/ml) (mezclando suavemente) y se colocó a baño María a 37°C por 15 min. Se dejó enfriar y se agregó 250 µl de la solución GES (Cloruro de Guanidina 5.02M, EDTA 0.5M pH 8 y Sarkosyl 20%), se mezcló suavemente invirtiendo de 4 a 7 veces (no usar vortex) se incubó en un lugar oscuro por 17 min a temperatura ambiente, una vez transcurrido el tiempo se agregó 125 µl de acetato de amonio 7.5 M y se mezcló suavemente de 4-7 veces y se incubó en hielo por 10 min. Después, se agregó 350 µl de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico 25: 24: 1 (v/v/v) y se mezcló (100X). La muestra se centrifugó a 12000 rpm por 10 min. Posteriormente se retiró con cuidado la fase acuosa (fase superior) y se transfirió a un tubo nuevo (Evitar transferir la interfaz blanca, que contiene proteínas y desechos celulares, repetir hasta que la interfaz blanca ya no esté visible). El siguiente paso fue adicionar Isopropanol 0.5 µl por volumen de la fase acuosa y se mezcló durante 2 min por inversión, aproximadamente 2 inversiones por seg. Se incubó a -20°C por 20 min para precipitar el DNA.

Pasado el tiempo de precipitación del DNA se centrifugó a 12000 rpm por 20 min, se decantó el sobrenadante y se agregó 750 µl de etanol al 70% al tubo. Se mezcló suavemente por inversión y posteriormente se centrifugó a 12000 rpm por 4 min, se decantó el etanol cuidando de dejar el pellet en el tubo. Este fue el primer lavado, se repitió el lavado 3 veces más hasta completar 4 lavados. Después del cuarto lavado se decantó y se extrajo cuidadosamente todo el etanol restante dejando el sedimento en el fondo (extrayendo hasta la última gota). Se invirtieron los tubos sobre toallas limpias de papel hasta que seco por completo el tubo del exceso de etanol. El DNA se resuspendió en 30 µl de agua tridestilada grado molecular estéril.

### **6.6 Identificación de genes específicos de *C. difficile***

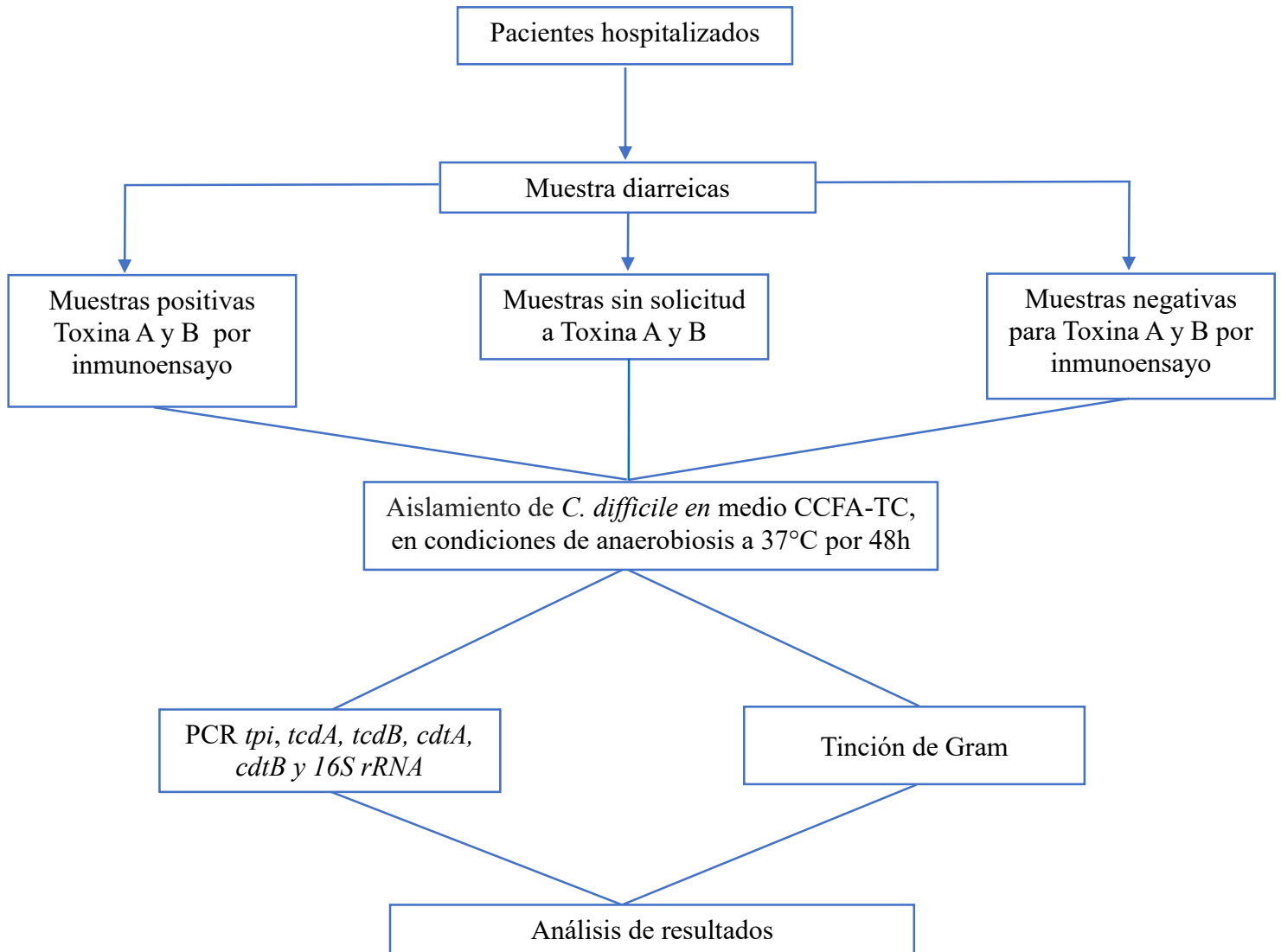
Los PCR se realizaron en un volumen total de 12.5 µL que contiene los siguientes reactivos: Buffer 10x, MgCl<sub>2</sub> 20 mM, dNTPs 10µM, Dream Taq DNA polimerasa 5U/µL y oligonucleótidos a 10µM que se muestran en la Tabla 2, las condiciones de Termociclador para los genes, 16S rRNA, *tcdA*, *tcdB*, *cdtA* y *cdtB* fueron las siguientes, una desnaturalización inicial de 5 min a 94°C seguidos de 30 ciclos de una segunda desnaturalización de 45 seg a 94°C, un alineamiento de 50 seg a 55°C y una extensión de un 1 min a 72°C y una extensión final de 5

min a 72°C. Para el gen *tpi*, una desnaturalización inicial de 3 min a 95°C seguidos de 30 ciclos de una segunda desnaturalización de 20 seg a 95°C, un alineamiento de 30 seg a 56°C, una extensión de 30 seg min a 72°C y una extensión final de 5 min a 72°C. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

**Tabla 2.** Oligonucleótidos utilizados en este trabajo, en la tabla se muestra la secuencia, la concentración a la que se trabajó y el tamaño del amplicón esperado.

Gen	Primer	Secuencia (5'-3')	Concentración primer (μM)	Tamaño del amplicón (pb)	Referencia
<b>16S rRNA</b>	<i>CD16F</i>	GGAGGCAGCAGTGGGGAATA	10	1062	Pearson, <i>et al.</i> , 2008
	<i>CD16R</i>	TGACGGGCGGTGTGTACAAG	10		
<b><i>tpi</i></b>	<i>tpiF</i>	AAAGAAGCTACTAAGGGTACAAA	10	230	Lemee, <i>et al.</i> , 2004
	<i>tpiR</i>	CATAATATTGGGTCTATTCCTAC	10		
<b><i>tcdA</i></b>	<i>tcdAF</i>	GCATGATAAGGCAACTTCAGTGGTA	10	629	Pearson, <i>et al.</i> , 2008
	<i>tcdAR</i>	AGTTCCTCCTGCTCCATCAAATG	10		
<b><i>tcdB</i></b>	<i>tcdBF</i>	CCAAARTGGAGTGTTACAAACAGGTG	10	410	Pearson, <i>et al.</i> , 2008
	<i>tcdBR</i>	GCATTTCTCCGTTTTTCAGCAAAGTA	10		
<b><i>cdtA</i></b>	<i>cdtAF</i>	GGGAAGCACTATATTAAGCAGAAGC	10	221	Pearson, <i>et al.</i> , 2008
	<i>cdtAR</i>	CTGGGTTAGGATTATTTACTGGACCA	10		
<b><i>cdtB</i></b>	<i>cdtBF</i>	TTGACCCAAAGTTGATGTCTGATTG	10	262	Pearson, <i>et al.</i> , 2008
	<i>cdtBR</i>	CGGATCTCTTGCTTCAGTCTTTATAG	10		

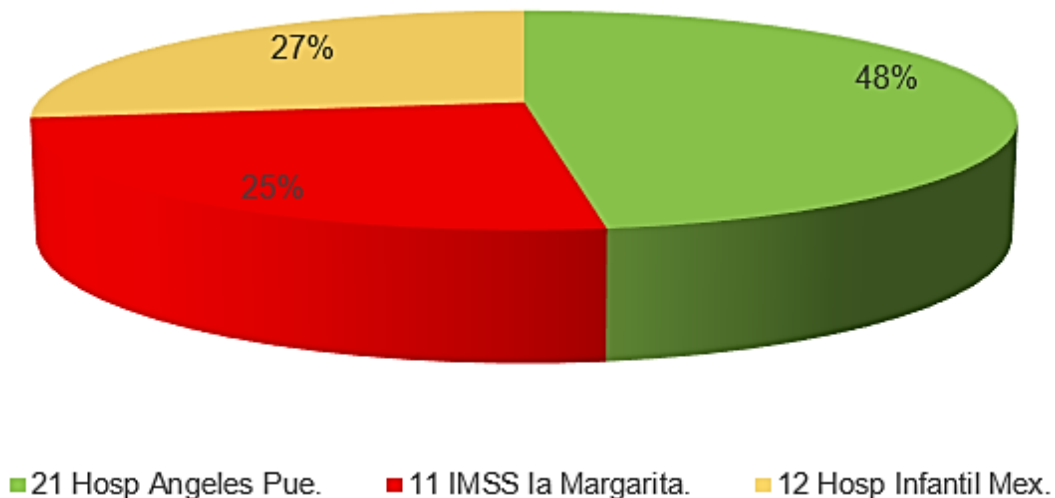
## 7. Esquema general de trabajo



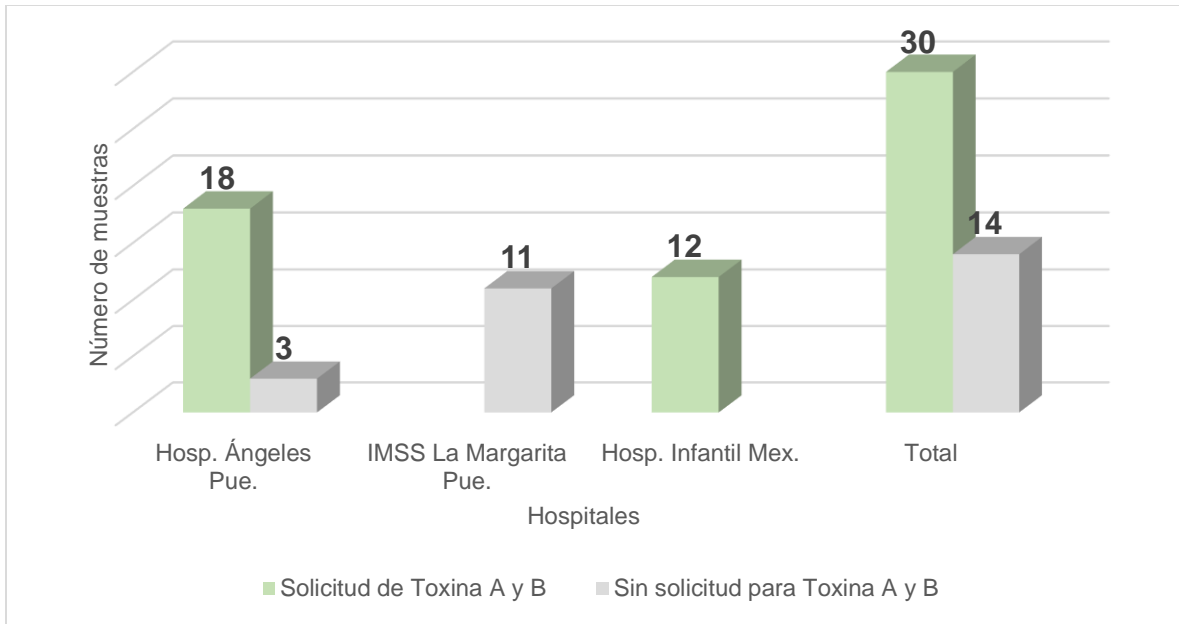
## 8. Resultados

Se recolectaron un total 44 muestras diarreas de tres hospitales durante el periodo Julio 2018-Julio 2019. De las cuales, 21 muestras fueron de Hospital Ángeles Puebla (HA), 11 muestra del Instituto Mexicano del Seguro Social (“La Margarita” Puebla) y 12 muestras del Hospital Infantil de México (“Federico Gómez”). Durante ese periodo se aceptaron muestras diarreas con o sin solicitud a la prueba inmunoenzimatica que detecta Toxina A y B de *C. difficile* (Figura 12).

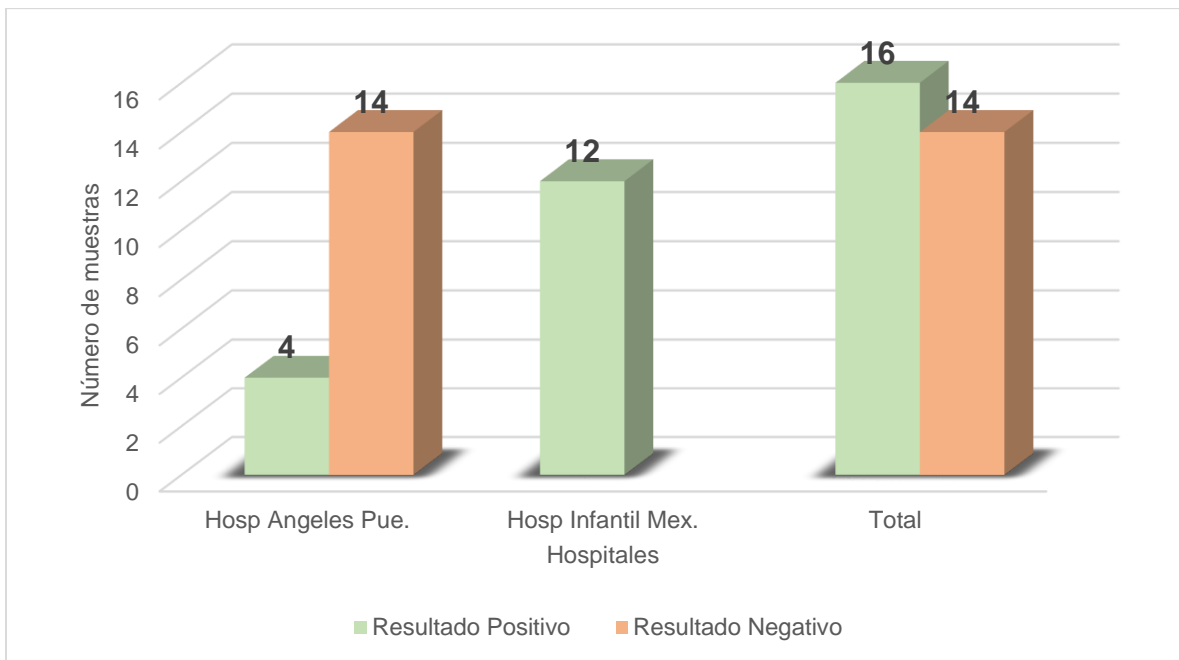
De las 21 muestras del Hospital Ángeles solo a 18 se les realizó la prueba Toxina A y B de *C. difficile*, 4 muestras fueron positivas a la prueba Toxina A y B. Las 11 muestras diarreas del IMSS fueron una donación de la Dra. Lilia Cedillo y dichas muestras no tenían la solicitud para Toxina A y B de *C. difficile*. De las muestras de Hospital Infantil de México, 2 muestras eran diarreas y 10 eran cepas de *C. difficile* ya aisladas en ese mismo Hospital, dando un total de 12 muestras del Hospital Infantil de México que ya habían sido identificadas con la presencia de *C. difficile* toxigénico (Figuras 13 y 14).



**Figura 12. Muestras recolectadas.** Un total de 44 muestras diarreas se recolectaron de tres hospitales, 21 muestras corresponden a Hospital Ángeles Puebla, 11 muestras del IMSS “La Margarita” Puebla y 12 muestras del Hospital Infantil de México “Federico Gómez”. La gráfica representan los porcentajes de cada Hospital con respecto al total de muestras recolectadas.



**Figura 13. Determinación de Toxina A y B de *C. difficile* EIA.** La detección de *C. difficile* en los hospitales se realiza por EIA. En la gráfica se muestra el número de muestras de cada hospital a las cuales se les solicitó o no, la determinación de Toxina A y B.

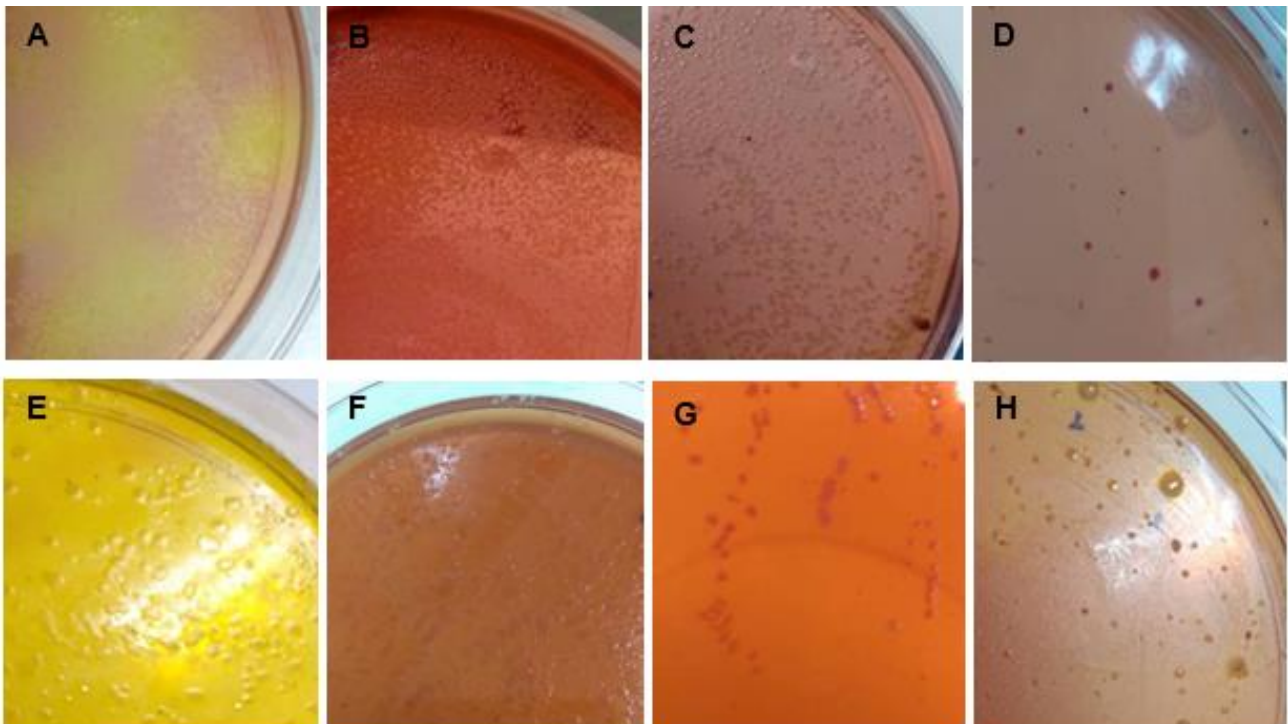


**Figura 14. Muestras positivas y negativas a Toxina A y B por EIA en los hospitales.** Solo en dos Hospitales (Hosp. Ángeles Pue y Hosp. Infantil Mex) se determinaron las Toxina A y B por EIA. La grafica muestra los resultados positivos y negativos de cada Hospital.

## 8.1 Aislamiento de *C. difficile* en el medio CCFA-TC sin tratamiento con etanol

### 8.1.1 Hospital Ángeles Puebla

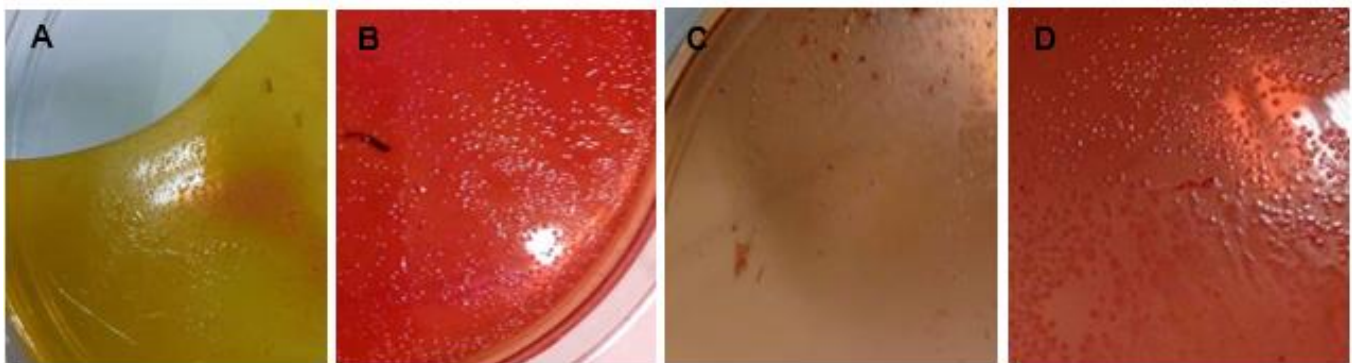
El aislamiento de *C. difficile* de las muestras diarreicas se hizo en el medio de cultivo CCFA-TC en condiciones de anaerobiosis. Las muestras se diluyeron antes en agua para su cultivo en el medio. De julio 2018 hasta agosto del mismo año se recibieron 14 muestras del Hospital Ángeles y una muestra externa al hospital que se decidió incluir en el mismo para fines más prácticos dando un total de 15 muestras para esa fecha. Las muestras se les dio un nombre interno, comenzando con Cd y un número de acuerdo a como se iban recibiendo. Las 15 muestras del Hospital Ángeles se sembraron en el medio CCFA-TC, de las cuales 10 muestras (Cd01, Cd02, Cd03, Cd08, Cd010, Cd011, Cd012, Cd014 y Cd015) crecieron en el medio (Tabla 7). La morfología colonial que se observó fue desde colonias pequeñas hasta colonias grandes, de color rosa y amarillo, con bordes circulares, en algunas irregulares, con una superficie convexa, consistencia mucosa y opacas, no se observó la morfología típica de *C. difficile* como se ha descrito en este medio (CCFA-TC), solo Cd010 tenía una morfología diferente a las demás, colonias grandes amarillas, con bordes irregulares (Figura 15). Dependiendo de la diferencia en la morfología colonial se tomó 1 a 6 clones de cada aislamiento. Se obtuvo un total de 42 clones de las 10 muestras, el total se basó por el número de clones que se tomó de acuerdo a la morfología colonial observada en cada aislamiento.



**Figura 15.** Cultivo microbiológico en CCFA-TC de muestras de heces (método por dilución). Hospital Ángeles Puebla. A: Cd01, B: Cd02, C: Cd03, D: Cd08, E: Cd010, F: Cd011, G: Cd012, H: Cd015.

### 8.1.2 IMSS La Margarita Puebla

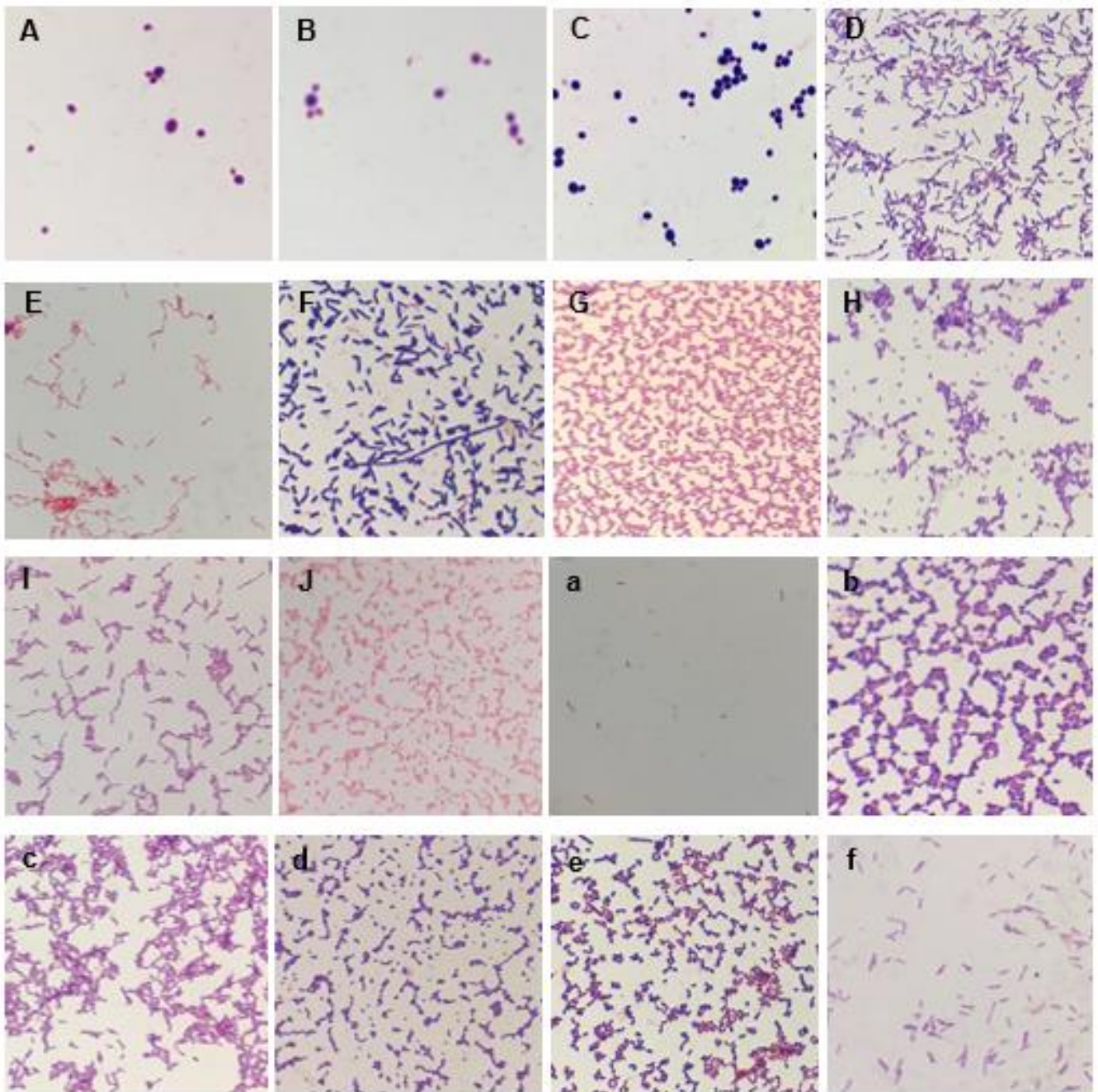
A las 11 muestras diarreicas del IMSS se le asigno un nombre interno para diferenciarlas de las muestras de Hospital Ángeles, empezando con Cdnd y un número. De las 11 muestras diarreicas del IMSS que se sembraron en el medio CCFA-TC solo 5 crecieron en ese medio (Cdnd1, Cdnd2, Cdnd3, Cdnd4 y Cdnd7) (Tabla 8). La variación en la morfología colonial fue similar a la observada en las muestras del Hospital Ángeles y de acuerdo a la diferencia en la morfología de las colonias se tomaron de 1 a 4 clones de cada muestra para su posterior análisis, obteniéndose un total de 12 clones del IMSS de las 11 muestras (Figura 16).



**Figura 16:** Cultivo microbiológico en CCFA-TC de muestras de heces (método por dilución). Instituto Mexicano del Seguro Social (“La Margarita” Puebla). A: Cdnd1, B: Cdnd3, C: Cdnd4, D: Cdnd7.

### 8.1.3 Determinación de Gram

Para observar la presencia de bacilos Gram positivos de las diferentes clonas que se aislaron del medio CCFA-TC se realizó la tinción de Gram de las cepas de los dos Hospitales (HA e IMSS), sin embargo, además de bacilos Gram positivos se observaron otro tipo de morfología bacteriana como cocos Gram positivos y negativos, bacilos Gram negativos, bacilos con esporas sub-terminales, algunas formas filamentosas y unas estructuras con forma de levaduras que se teñían de color morado (Figura 17).

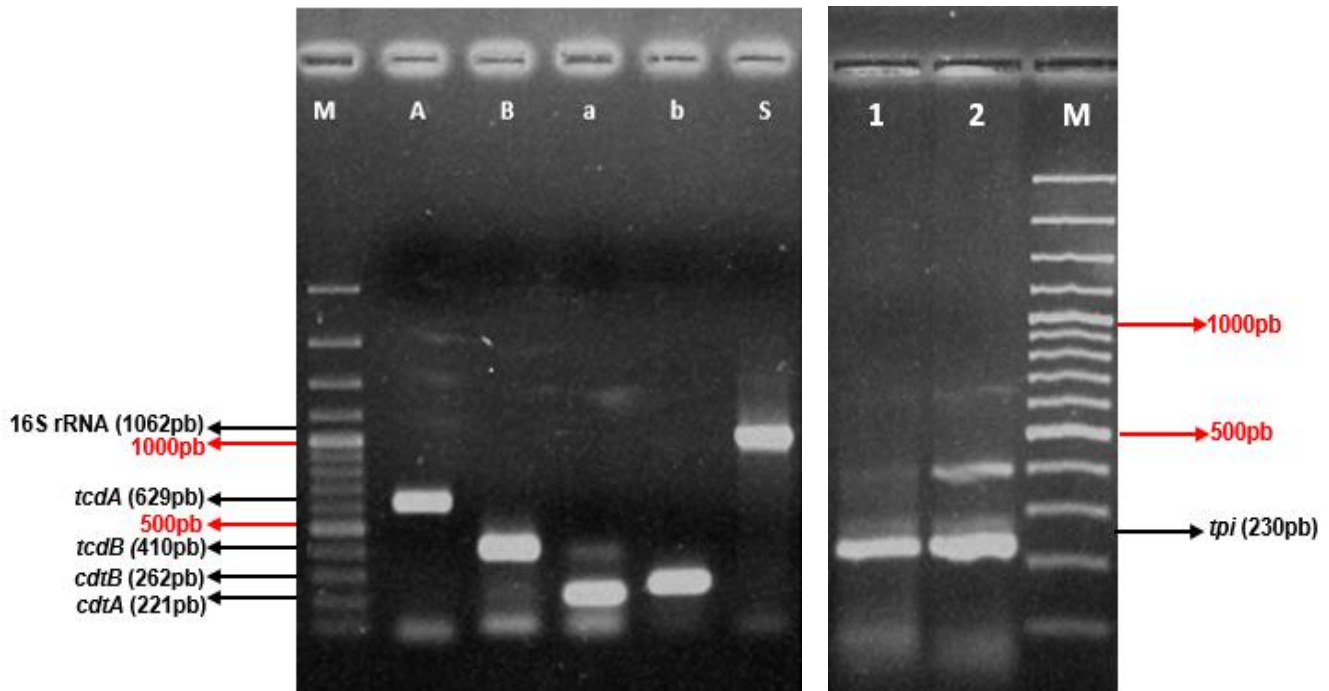


**Figura 17.** Tinción de Gram de las muestras de heces sin tratamiento con etanol. Hospital Ángeles Puebla. A: Cd01 clona 1, B: Cd02, C: Cd03 clona 12, D: Cd06 clona 14, E: Cd08 clona 20, F: Cd010 clona 23, G: Cd011 clona 25, H: Cd012 clona 31, I: Cd014 clona 34, J: Cd015 clona 38. IMSS. a: Cdnd1, b: Cdnd2, c: Cdnd3 clona 4, d: Cdnd4 clona 7, e: Cdnd7 clona 12, f: Wild type.



### 8.1.4 Estandarización de los genes *16s rRNA*, *tcdA*, *tcdB*, *cdtA*, *cdtB* y *tpi*

Se estandarizaron las condiciones de PCR para la amplificación de los genes *16S rRNA* (1062pb), *tcdA* (629pb), *tcdB* (410pb), *cdtA* (221pb), *cdtB* (262pb) y *tpi* (230pb) utilizando oligonucleótidos previamente reportados (Tabla 2). Inicialmente se propuso un PCR múltiple pero las condiciones no fueron siempre reproducibles por lo que se optó por realizar PCR individuales probando diferentes temperaturas de alineamiento para cada gen (Figura 18).

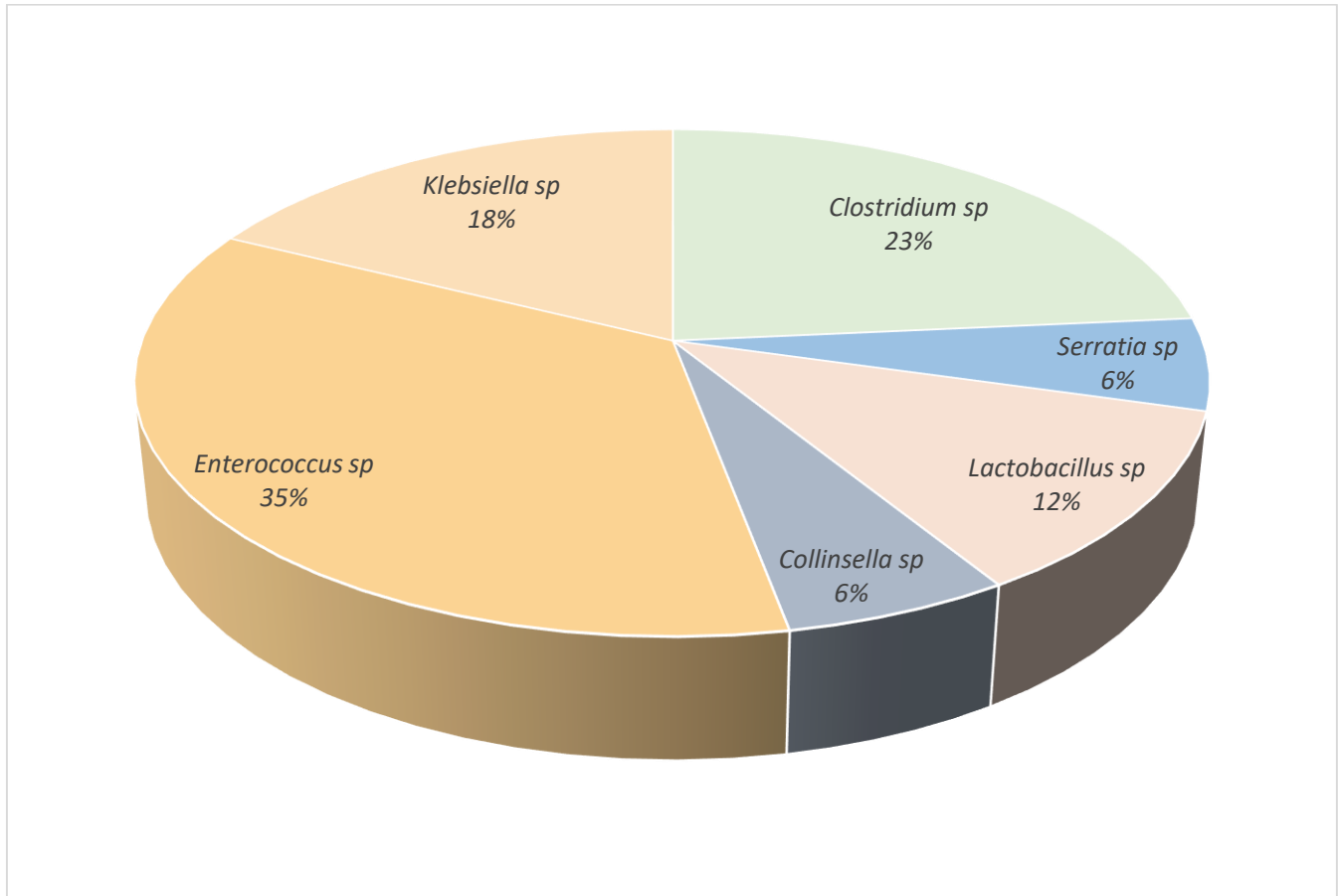


**Figura 18.** Estandarización de los genes *16s rRNA*, *tcdA*, *tcdB*, *cdtA*, *cdtB* y *tpi*: carril M: Marcador de 100pb Plus DNA Ladder, carril A: gen *tcdA*, carril B: gen *tcdB*, carril a: gen *cdtA*, carril b: gen *cdtB*, carril S: *16S rRNA*, carril 1: *tpi* temperatura de alineamiento 56°C, carril 2: *tpi* temperatura de alineamiento 57.9°C.

### 8.1.5 Determinación de los genes *16s rRNA*, *tcdA*, *tcdB*, *cdtA* y *cdtB* del HA y del IMSS

Para las 42 clonas que se obtuvieron del crecimiento de las 10 muestras de HA y las 12 clonas de las 5 muestras del IMSS por el método de dilución de heces, el resultado para la amplificación de los genes *tcdA*, *tcdB*, *cdtA* y *cdtB* fue negativo. Como no se tuvo un resultado positivo en la amplificación de los principales factores de virulencia de *C. difficile*, se analizó su tinción de Gram y de acuerdo a la morfología bacilar de las mismas, se eligió una clona por cada muestra

a la cual se le amplificó el gen 16S rRNA con oligonucleótidos universales para secuenciar e identificar dichas cepas. Las secuencias se analizaron bioinformáticamente por medio de BLAST encontrando diferentes géneros bacterianos como *Enterococcus sp* y *Clostridium sp* y *Klebsiella sp* en mayor porcentaje (Figura 19). Observamos que en el medio CCFA-TC fueron capaces de crecer microorganismo anaerobios facultativos y anaerobios estrictos resistentes a los dos antibióticos Cicloserina y Cefoxitina presentes en el medio.



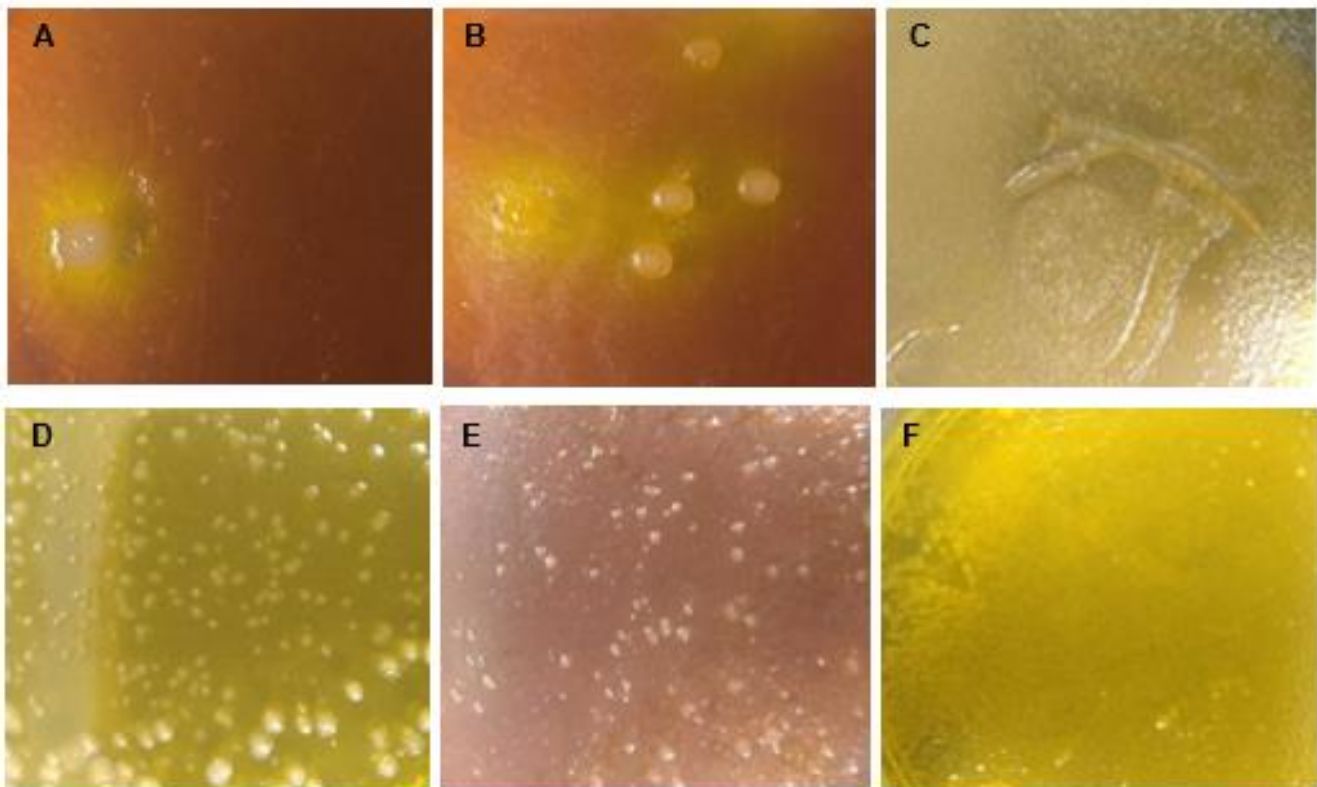
**Figura 19.** Géneros identificados por secuenciación de 16S rRNA.

## 8.2 Aislamiento de *C. difficile* de muestras tratadas con etanol

### 8.1.2 Hospital Ángeles Puebla

Debido al crecimiento de microorganismos contaminantes, se decidió probar la metodología de choque con etanol en el tratamiento de las muestras de heces de los dos Hospitales de Puebla con el fin de eliminar la contaminación que estaba creciendo en el medio CCFA-TC y recuperar solamente microorganismos esporulados especialmente *C. difficile*. En esta etapa se incluyeron 4 nuevas muestras del Hospital Ángeles. Se observó una disminución significativa del

crecimiento microorganismo e incluso la morfología de las colonias cambió ya que no se observaron colonias rosas ni colonias pequeñas. Otra observación fue que las muestras que dieron positivo al cultivo por la metodología anterior, dieron negativo al cultivo con el tratamiento de etanol. Usando esta metodología hubo crecimiento de solo 6 muestras (Cd05-E, Cd010-E, Cd014-E, Cd016-E, Cd018-E y Cd021-E) mostrando que se reduce el crecimiento de microorganismos contaminantes. Se seleccionaron 31 clonas de las 6 muestras con la finalidad de analizarlas (Figura 20 y Tabla 9).

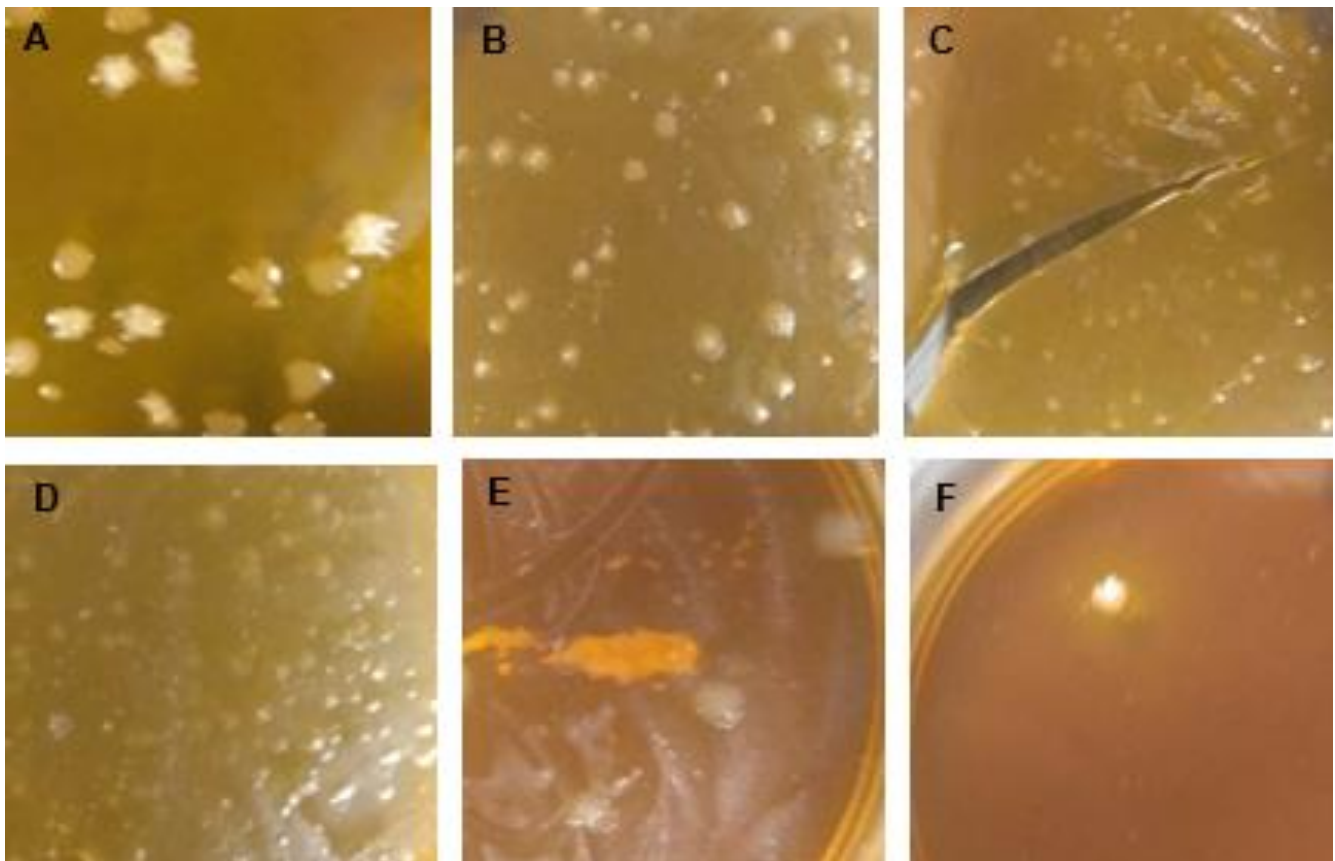


**Figura 20:** Cultivo microbiológico en CCFA-TC de muestra de heces tratadas con etanol. Hospital Ángeles Puebla. A: Cd05-E, B: Cd010-E, C: Cd014-E, D: Cd015-E, E: Cd018-E, F: Cd021-E.

### 8.2.3 IMSS La Margarita Puebla

Las muestras del IMSS también se trataron con etanol para reducir los microorganismos contaminantes. 4 de las 5 muestras positivas al cultivo por dilución de heces sin tratamiento con etanol (Cdnd1, Cdnd2, Cdnd3 y Cdnd4), también crecieron en el agar cuando se les dio el choque por etanol (solo Cdnd7 fue negativo) pero la morfología de las colonias fue diferente.

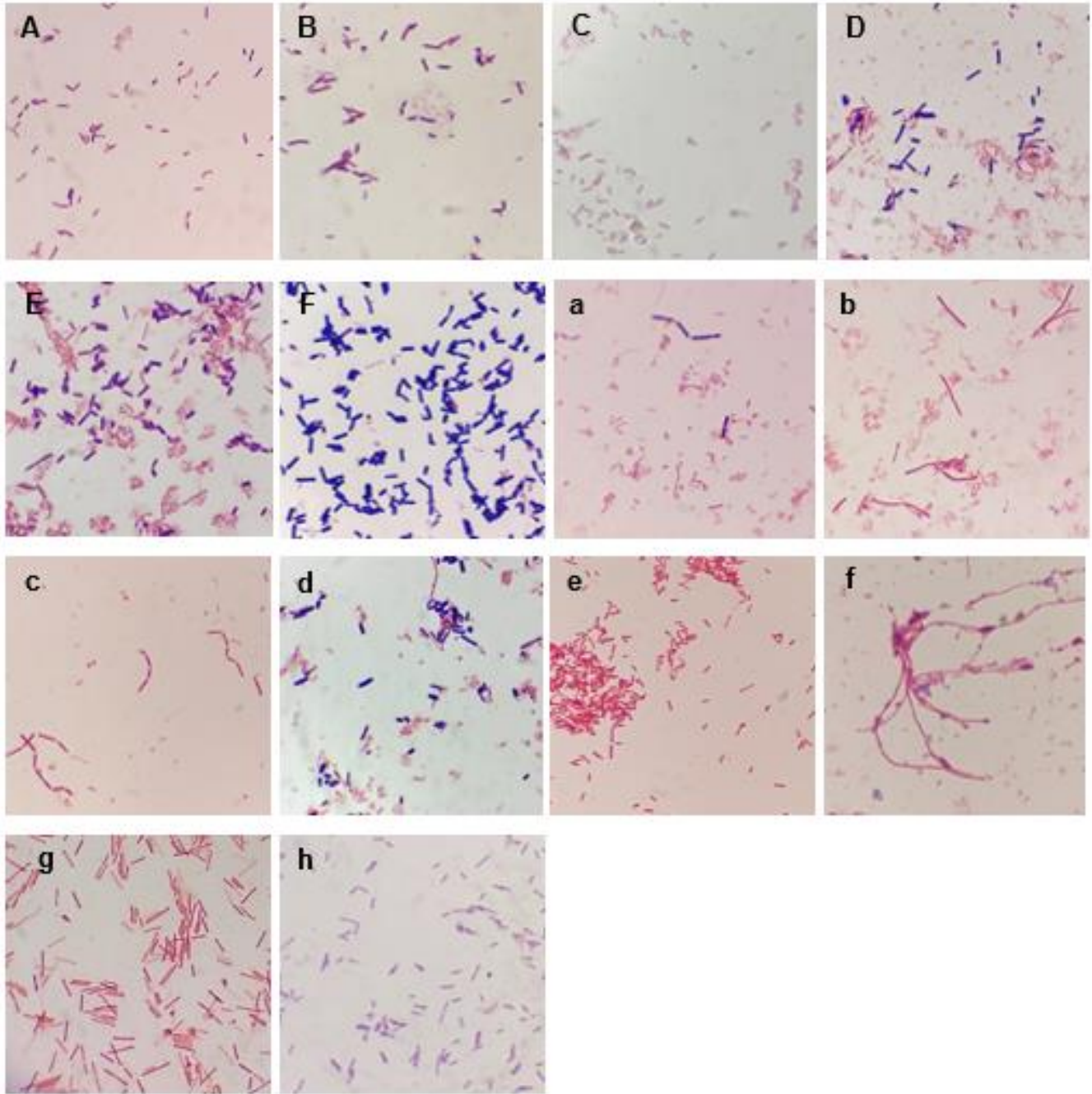
Con etanol se observaron colonias amarillas, más grandes con bordes irregulares y un centro ligeramente blanco, a lo que se observó si tratamiento que era colonias rosas, pequeñas y de bordes circulares. Además, se presentaron muestras que fueron positivas al cultivo por choque de etanol (Cdnd5, Cdnd6, Cdnd10) y que no crecieron por dilución de heces. Se seleccionaron un total de 33 clonas de las 7 muestras (Figura 21 y Tabla 10).



**Figura 21:** Cultivo microbiológico en CCFA-TC de muestras tratadas con etanol. Instituto Mexicano del Seguro Social (“La Margarita” Puebla). A: Cdnd1-E, B: Cdnd2-E, C: Cdnd3-E, D: Cdnd4-E, E: Cdnd6-E, F: Cdnd10-E.

#### 8.2.4 Determinación de Gram

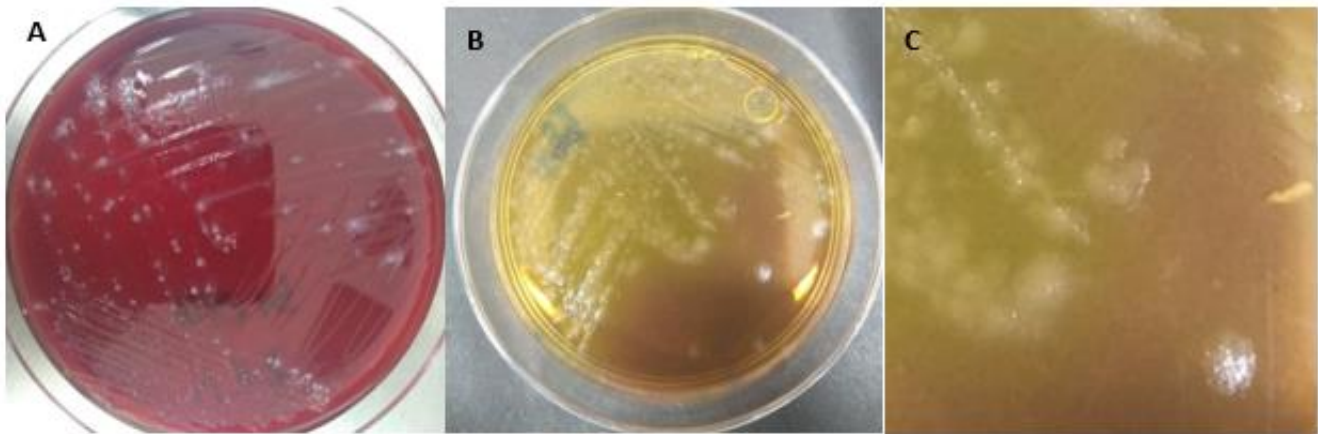
Se realizó tinción de Gram a las clonas que se aislaron de las muestras tratadas con etanol (HA e IMSS) y se observó la presencia de bacilos Gram positivos; ya no se observaron formas bacterianas diferentes a bacilos como se observaron usando la primera metodología (Figura22).



**Figura 22.** Tinción de Gram de las muestras de heces tratadas con etanol. Hospital Ángeles Puebla. A: Cd05-E, B: Cd010-E clona 2, C: Cd014 clona 10, D: Cd016-E clona 17, E: Cd018-E clona 25, F: Cd021-E clona 30. IMSS. a: Cdnd1-E clona 2, b: Cdnd2-E clona 7, c: Cdnd3-E clona 13, d: Cdnd4-E clona 16, e: Cdnd5-E clona 24, f: Cdnd6-E clona 25, g: Cdnd10-E clona 33, h: Wild type.

### 8.3 Hospital Infantil de México (Federico Gómez)

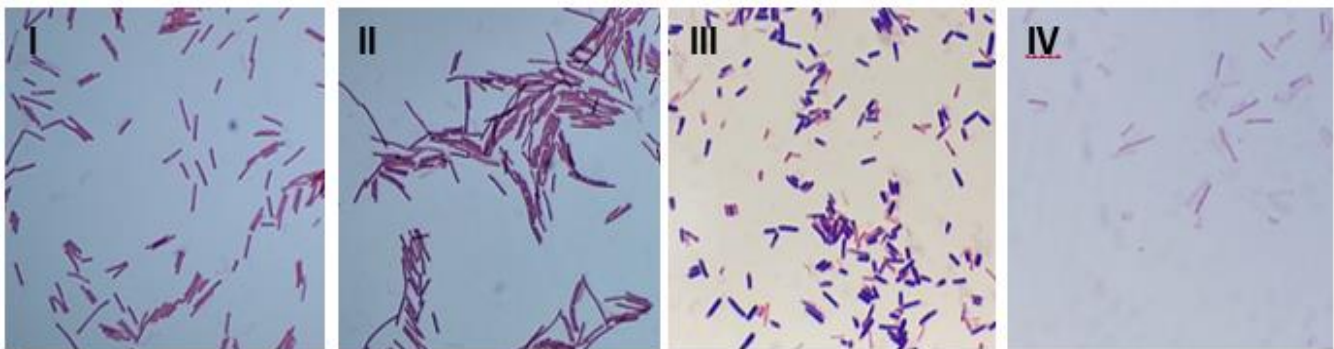
El Hospital Infantil de México nos facilitó 2 muestras diarreicas con la referencia de que ya se habían identificado por inmunoensayo la presencia de *C. difficile* toxigénico. Las dos muestras se cultivaron en el medio CCFA-TC, pero ninguna de las dos creció en el medio de cultivo. Posteriormente recibimos 10 cepas de *C. difficile* ya aisladas de muestras fecales, las cuales fueron transportadas al laboratorio en agar Chocolate (Figura 23A). Las 10 cepas se resembraron en el CCFA-TC y todas crecieron (Figura 23B).

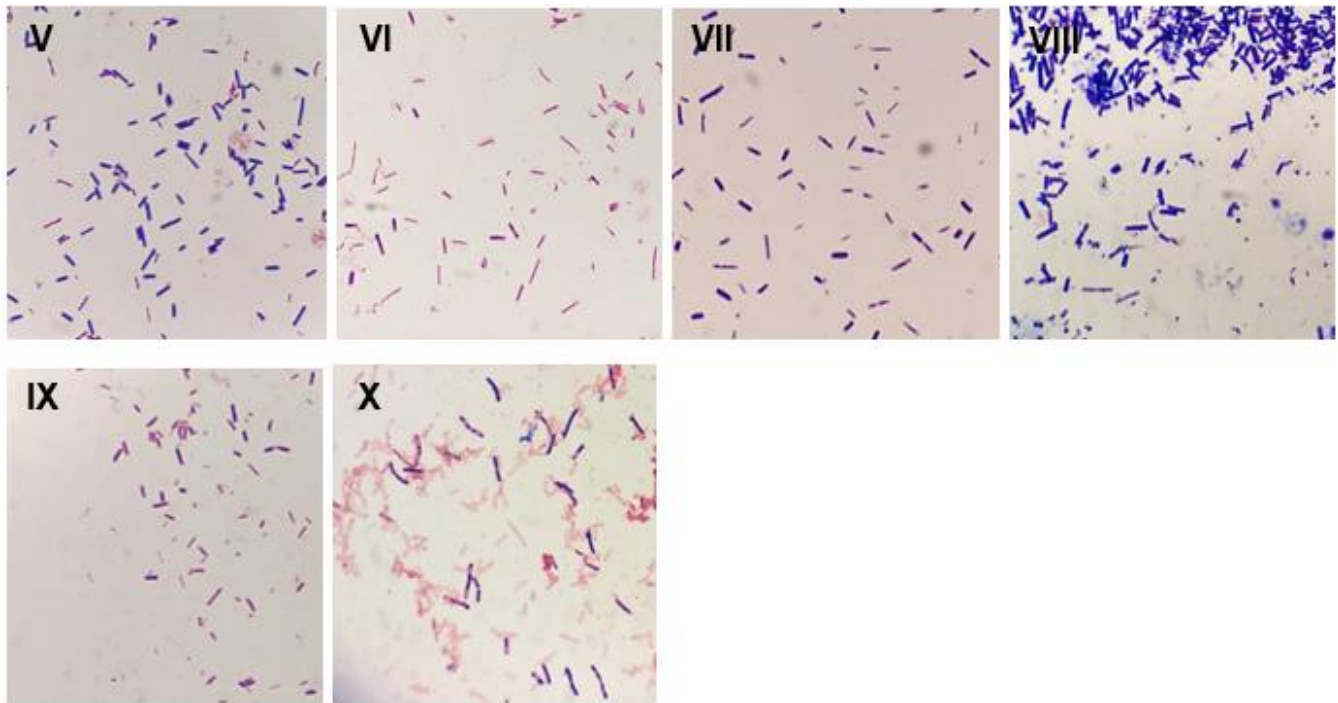


**Figura 23:** Ejemplo de cultivo microbiológico de las muestras positivas a *C. difficile* del Hospital Infantil de México (“Federico Gómez”). A) Agar Chocolate. B) Agar CCFA-TC. C) Morfología de las colonias de *C. difficile*.

#### 8.3.1 Determinación de Gram

Se realizó tinción de Gram de las 10 cepas del Hospital Infantil de México y se observó en todas la presencia de bacilos Gram positivos; no se observó otro tipo de morfología bacteriana (Figura 24).

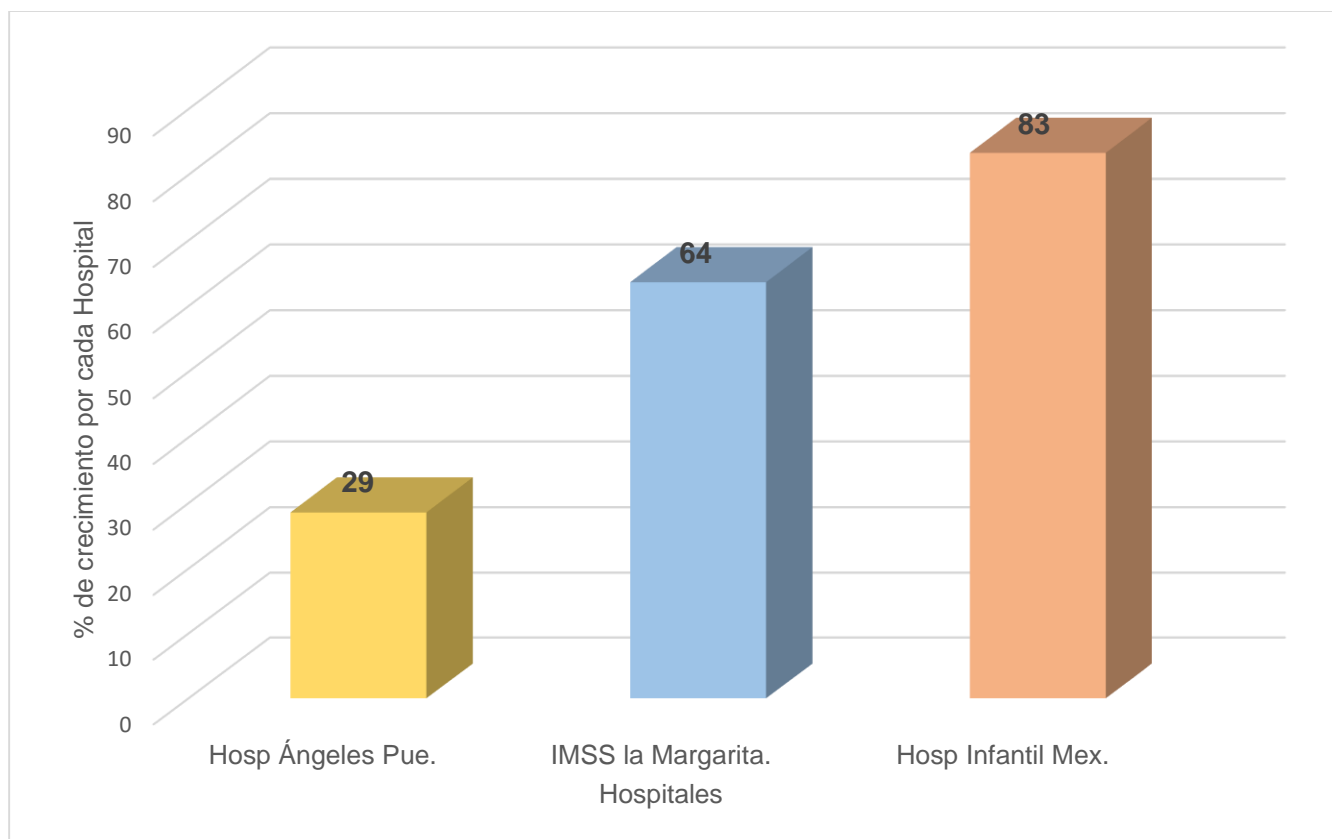




**Figura 24.** Tinción de Gram de las cepas del Hospital Infantil de México (“Federico Gómez”). I: Cdmx3, II: Cdmx4, III: Cdmx5, IV: Cdmx6, V: Cdmx7, VI: Cdmx8, VII: Cdmx9, VIII: Cdmx10, IX: Cdmx11, X: Cdmx12.

#### **8.4 Aislamiento de *C. difficile* en el medio CCFA-TC**

El porcentaje de crecimiento en el medio CCFA-TC del HA fue de 29% (n=6) del total de muestras (21), del IMSS fue del 64% (n=7), con respecto a su total (11) y del Hospital Infantil de México el crecimiento fue del 83% (n=10) del total de muestras (12); En total 23 muestras de heces crecieron en el medio CFFA-TC que representa el 52% de todas las muestra recolectadas (44). El porcentaje de crecimiento por cada Hospital se muestra en la Figura 25 y Tabla 3.



**Figura 25.** Crecimiento en CCFA-TC de muestras de heces tratadas con etanol. Las muestras del Hospital Ángeles y del IMSS se trataron con etanol. El 29% (n=6) de las muestras del Hospital Ángeles creció en el medio CCFA-TC al igual que el 64% (n=7) de las muestras del IMSS y el 83% (n=10) de las muestras del Hospital Infantil de México.

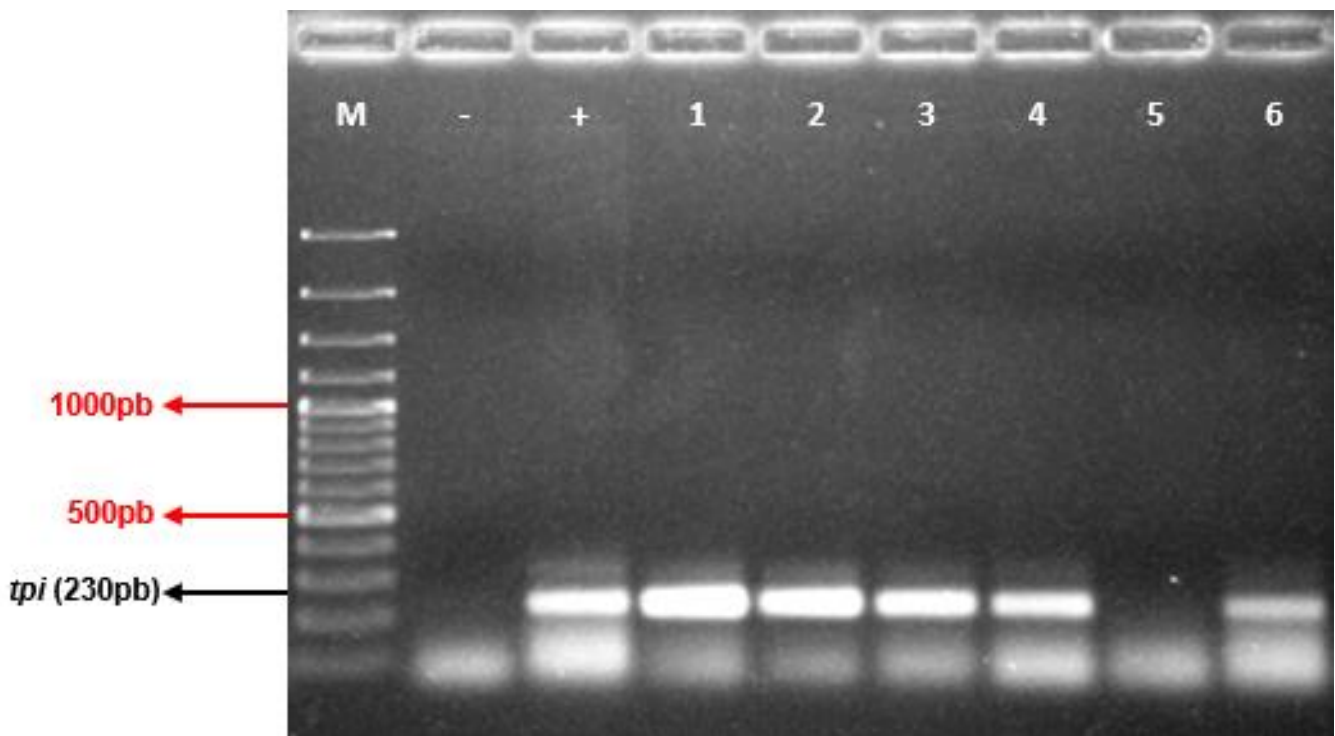
**Tabla 3.** Crecimiento en CCFA-TC de muestras de heces tratadas con etanol. La tabla representa el número de muestras que crecieron en el medio CCFA-TC, el porcentaje que representan por cada hospital.

Crecimiento en CCFA-TC de muestras de heces tratadas con etanol			
Hospital	Crecimiento/Total de muestras por Hosp	% por Hospital	% por el total de muestras (44)
Hosp. Ángeles Pue.	6/21	28.6%	13.6%
Hosp. IMSS La Margarita Pue.	7/11	63.6%	15.9%
Hosp. Infantil de Méx.	10/12	83.3%	22.7%
Total	23/44	-	52.2%



### 8.5 Determinación de gen *tpi*

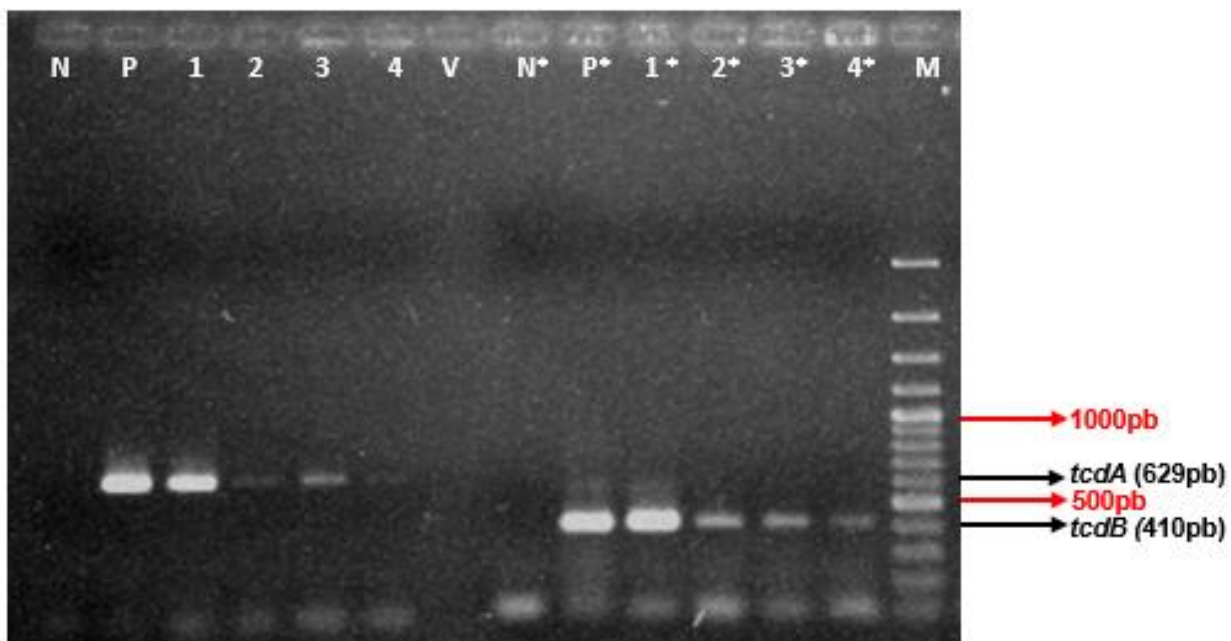
Para la identificación de *C. difficile* de las clonas que se aislaron de los tres hospitales primero se realizó la amplificación del gen *tpi*, para identificar la presencia de *C. difficile* y solo con las clonas que dieron positivo a *tpi* se siguió el estudio con la amplificación de los genes que codifican para las toxinas. De las 6 muestras del Hospital Ángeles Puebla, 4 muestras dieron positivo a *tpi* (Cd010-E, Cd014E, Cd018-E, Cd021-E) solamente dos muestras (Cd05-E y Cd016-E) no amplificaron para este gen (Tabla 4). De las 7 muestras del IMSS (La Margarita Puebla), 6 muestras dieron positivo a *tpi* (Cdnd1-E, Cdnd2-E, Cdnd3-E, Cdnd4-E, Cdnd5-E, Cdnd6-E y Cdnd10-E) solo una muestra dio un resultado negativo (Cdnd5) (Tabla 5) y del Hospital Infantil de México (Federico Gómez) de las 10 muestras, 9 dieron positivo a *tpi* (Cdmx3, Cdmx4, Cdmx5, Cdmx6, Cdmx7, Cdmx9, Cdmx10, Cdmx11 y Cdmx12) y solo una muestra dio negativo a *tpi* (Cdmx8) (Tabla 6, Figura 26).



**Figura 26:** Gel representativo para la determinación del gen *tpi*: carril M, 100 pb Plus DNA Ladder; carril -, control negativo; carril +, control positivo; carril 1, Cd018-E clona 1; carril 2, Cd018-E clona 2; carril 3, Cd018-E clona 3; carril 4, Cd018-E clona 4; carril 5, negativo; carril 6, Cd014-E clona 1.

## 8.6 Determinación de los genes de las toxinas de *C. difficile*

Para la identificación de *C. difficile* toxigénico, de las clonas positivas al gen *tpi*, se amplificaron los genes *tcdA*, *tcdB*, *cdtA* y *cdtB* (Figura 26). Se amplificaron los genes de las toxinas (*tcdA*, *tcdB*, *cdtA* y *cdtB*) de las 4 muestras (Cd010-E, Cd014-E, Cd018 y Cd021-E) del HA, solo 3 de ellas muestras (Cd010-E, Cd018 y Cd021-E) dieron positivo para los genes *tcdA* y *tcdB* y 1 muestra (Cd014-E) dio positivo para *tcdA*, *tcdB*, *cdtA* y *cdtB* (Tabla 4). En 6 muestras (Cdnd1-E, Cdnd2-E, Cdnd3-E, Cdnd4-E, Cdnd6-E y Cdnd10-E) del IMSS no amplificaron los genes de las toxinas dado un resultado negativo de los cuatro genes (Tabla 5) y de 10 muestras (Cdmx3, Cdmx4, Cdmx5, Cdmx6, Cdmx7, Cdmx9, Cdmx10, Cdmx11 y Cdmx12) del Hospital Infantil de México, 7 muestras dieron positivo para los genes *tcdA* y *tcdB* (Cdmx3, Cdmx4, Cdmx5, Cdmx6, Cdmx10, Cdmx11 y Cdmx12), 1 muestra (Cdmx7) dio positivo para *tcdA*, *tcdB*, *cdtA* y *cdtB*, y hubo solamente una muestra (Cdmx9) que dio negativo para los cuatro genes de las toxinas (Tabla 6) (Figuras 27 y 28).



**Figura 27:** Gel representativo de la determinación de los genes de las toxinas de *C. difficile* de la muestra Cd018-E: carril N, control negativo para *tcdA*; carril P, control positivo para *tcdA*; carril 1, Cd018-E clona 1; carril 2, Cd018-E clona 2; carril 3, Cd018-E clona 3; carril 4, Cd018-E clona 4; carril V, Vacío; carril N\*, control negativo para *tcdB*; carril P\*, control positivo para *tcdB*; carril 1\*, Cd018-E clona 1; carril 2\*, Cd018-E clona 2; carril 3\*, Cd018-E clona 3; carril 4\*, Cd018-E clona 4; carril M, 100 pb Plus DNA Ladder.

**Tabla 4.** Resultado de la amplificación de los genes *tpi*, *tcdA*, *tcdB*, *cdtA* y *cdtB* de las cepas aisladas de las muestras del Hospital Ángeles Puebla.

<b>Hospital Ángeles Puebla</b>				
<b>Muestra</b>	PCR para detectar genes de toxinas			Tipo de producción de toxinas
	<i>tpi</i>	<i>tcdA/tcdB</i>	<i>cdtA/cdtB</i>	
<b>Cd05-E</b>	-	-/-	-/-	NA
<b>Cd010-E</b>	+	+/+	-/-	A <sup>+</sup> B <sup>+</sup> CDT <sup>-</sup>
<b>Cd014-E</b>	+	+/+	+/+	A <sup>+</sup> B <sup>+</sup> CDT <sup>+</sup>
<b>Cd016-E</b>	-	-/-	-/-	NA
<b>Cd018-E</b>	+	+/+	-/-	A <sup>+</sup> B <sup>+</sup> CDT <sup>-</sup>
<b>Cd021-E</b>	+	+/+	-/-	A <sup>+</sup> B <sup>+</sup> CDT <sup>-</sup>

NA: No aplica *tpi* negativo

**Tabla 5.** Resultado de la amplificación de los genes *tpi*, *tcdA*, *tcdB*, *cdtA* y *cdtB* de las cepas aisladas de las muestras del IMSS “La Margarita”.

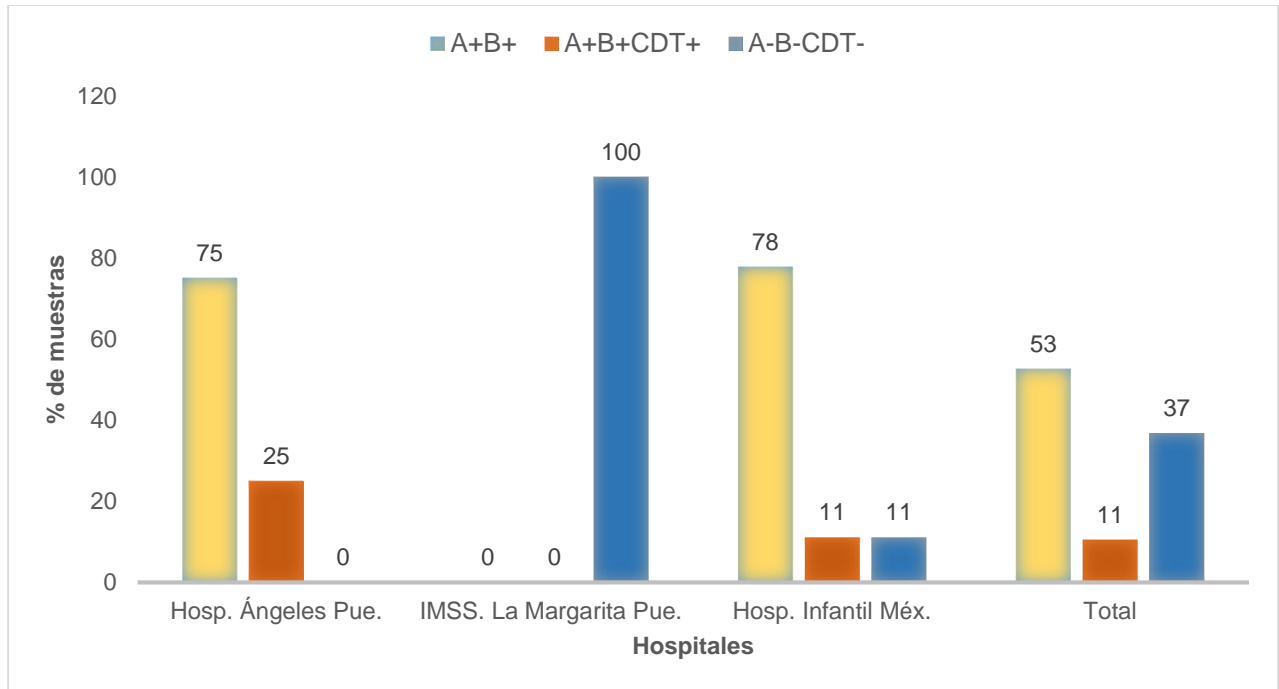
<b>IMSS La Margarita Puebla</b>				
<b>Muestra</b>	PCR para detectar genes de toxinas			Tipo de producción de toxinas
	<i>tpi</i>	<i>tcdA/tcdB</i>	<i>cdtA/cdtB</i>	
<b>Cdnd1-E</b>	+	-/-	-/-	A <sup>-</sup> B <sup>-</sup> CDT <sup>-</sup>
<b>Cdnd2-E</b>	+	-/-	-/-	A <sup>-</sup> B <sup>-</sup> CDT <sup>-</sup>
<b>Cdnd3-E</b>	+	-/-	-/-	A <sup>-</sup> B <sup>-</sup> CDT <sup>-</sup>
<b>Cdnd4-E</b>	+	-/-	-/-	A <sup>-</sup> B <sup>-</sup> CDT <sup>-</sup>
<b>Cdnd5-E</b>	-	-/-	-/-	NA
<b>Cdnd6-E</b>	+	-/-	-/-	A <sup>-</sup> B <sup>-</sup> CDT <sup>-</sup>
<b>Cdnd10-E</b>	+	-/-	-/-	A <sup>-</sup> B <sup>-</sup> CDT <sup>-</sup>

NA: No aplica *tpi* negativo

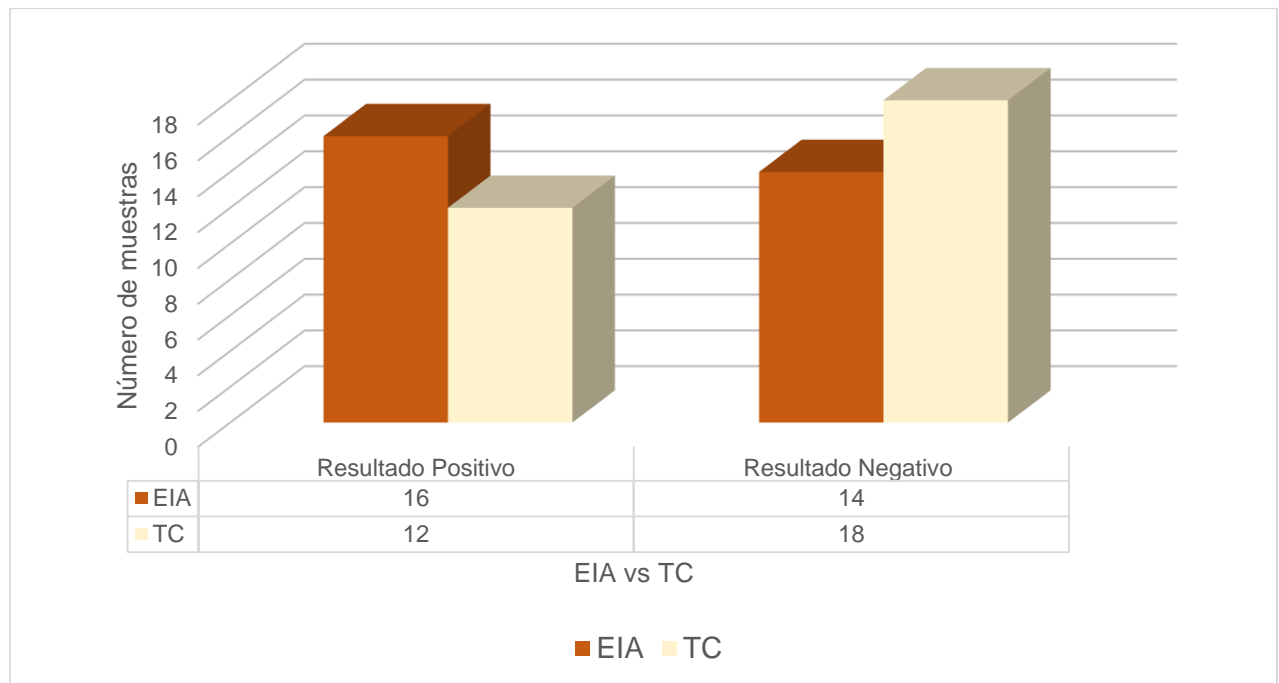
**Tabla 6.** Resultado de la amplificación de los genes *tpi*, *tcdA*, *tcdB*, *cdtA* y *cdtB* de las cepas aisladas de las muestras del Hospital Infantil de México “Federico Gómez”.

<b>Hospital Infantil de México (Federico Gómez)</b>				
<b>Muestra</b>	PCR para detectar genes de toxinas			Tipo de producción de toxinas
	<i>tpi</i>	<i>tcdA/tcdB</i>	<i>cdtA/cdtB</i>	
<b>Cdmx1</b>	+	+/+	-/-	A <sup>+</sup> B <sup>+</sup> CDT <sup>-</sup>
<b>Cdmx2</b>	+	+/+	-/-	A <sup>+</sup> B <sup>+</sup> CDT <sup>-</sup>
<b>Cdmx3</b>	+	+/+	-/-	A <sup>+</sup> B <sup>+</sup> CDT <sup>-</sup>
<b>Cdmx4</b>	+	+/+	-/-	A <sup>+</sup> B <sup>+</sup> CDT <sup>-</sup>
<b>Cdmx5</b>	+	+/+	-/-	A <sup>+</sup> B <sup>+</sup> CDT <sup>-</sup>
<b>Cdmx6</b>	+	+/+	-/-	A <sup>+</sup> B <sup>+</sup> CDT <sup>-</sup>
<b>Cdmx7</b>	+	+/+	+/+	A <sup>+</sup> B <sup>+</sup> CDT <sup>+</sup>
<b>Cdmx8</b>	-	-/-	-/-	NA
<b>Cdmx9</b>	+	-/-	-/-	A <sup>-</sup> B <sup>-</sup> CDT <sup>-</sup>
<b>Cdmx10</b>	+	+/+	-/-	A <sup>+</sup> B <sup>+</sup> CDT <sup>-</sup>

NA: No aplica *tpi* negativo



**Figura 28.** Tipo de producción de toxinas de *Clostridioides difficile* identificado en los tres Hospitales. Muestras positivas a *tpi* (n=19). El 53% (n=10) de las muestras presentaron un genotipo A+B+, el 11% (n=4) un genotipo A+B+CDT+ y el 37%(n=7) un genotipo A-B-CDT-.



**Figura 29.** Comparación del Cultivo toxigénico vs Ensayo inmunoenzimático. Se muestra una discrepancia con respecto a 4 muestras.

**Tabla 7.** Datos de la muestras del **Hospital Ángeles Puebla** sin tratamiento con etanol

Datos								PCR					Gram	Identificación del Microorganismo por Secuenciación de 16S rRNA		
Clave	Paciente	Sexo	Años	Toxina A y B	Forma de la Heces	Cantidad de muestra	Cultivo	Clonas	<i>tpi</i>	<i>tcdA</i>	<i>tcdB</i>	<i>cdtA</i>			<i>cdtB</i>	
Cd01	P1	M	30	Negativo	Liquida	0.1919	SI	4	1	-	-	-	-	-	+	<i>Clostridium sp</i>
									2	-	-	-	-	-	+	
									3	-	-	-	-	-	+	
									4	-	-	-	-	-	+	
Cd02	P2	M	66	Negativo	Liquida	0.1923	SI	1	5	-	-	-	-	-	+	<i>Serratia sp</i>
Cd03	P3	F	22	Negativo	Pastosa	0.0336	SI	7	6	-	-	-	-	-	+	<i>Clostridium sp</i>
									7	-	-	-	-	-	+	
									8	-	-	-	-	-	+	
									9	-	-	-	-	-	+	
									10	-	-	-	-	-	+	
									11	-	-	-	-	-	+	
									12	-	-	-	-	-	+	
Cd04	P4	M	45	Negativo	Pastosa	0.0383	NO									
Cd05	P5	M	32	Negativo	Liquida	0.2005	NO									
Cd06	P6	M	3	Negativo	Liquida	0.1148	SI	4	13	-	-	-	-	-	Bacilos -	<i>Lactobacillus sp</i>
									14	-	-	-	-	-	Bacilos +	
									15	-	-	-	-	-	Bacilos +	
									16	-	-	-	-	-	Bacilos +	
Cd07	P7	F	49	Negativo	Pastosa	0.0339	NO									
Cd08	P8	M	65	Negativo	Pastosa	0.0257	SI	4	17	-	-	-	-	-	Bacilos +	<i>Collinsella sp</i>
									18	-	-	-	-	-	Bacilos +	
									19	-	-	-	-	-	Bacilos +	
									20	-	-	-	-	-	Bacilos +	
Cd09	P9	F	45	Negativo	Liquida	0.0886	NO									
Cd010	P10	F	43	NR	Pastosa	0.1037	SI	4	21	-	-	-	-	-	Bacilos +	<i>Enterococcus sp</i>
									22	-	-	-	-	-	Cocos +	
									23	-	-	-	-	-	Cocos +	
									24	-	-	-	-	-	Cocos +	
Cd011	P11	M	65	Negativo	Pastosa	0.0883	SI	4	25	-	-	-	-	-	Cocos +	<i>Enterococcus sp</i>
									26	-	-	-	-	-	Cocos +	
									27	-	-	-	-	-	Cocos +	
									28	-	-	-	-	-	Cocos +	
Cd012	P12	F	20	NR	Pastosa	0.0883	SI	4	29	-	-	-	-	-	Cocos +	<i>Lactobacillus sp</i>
									30	-	-	-	-	-	Cocos +	
									31	+	-	-	-	-	Bacilos +	
									32	-	-	-	-	-	Bacilos +	
Cd013	P13	F	70	Negativo	Pastosa	0.2263	NO									
Cd014	P14	F	66	Positivo	Liquida	0.1752	SI	4	33	-	-	-	-	-	Cocos +	<i>Enterococcus sp</i>
									34	-	-	-	-	-	Cocos +	
									35	-	-	-	-	-	Cocos +	
									36	-	-	-	-	-	Cocos +	
Cd015	P15 ext.	F	-	NR	Pastosa	0.1451	SI	6	37	-	-	-	-	-	Cocos -	<i>Klebsiella sp</i>
									38	-	-	-	-	-	Cocos -	
									39	-	-	-	-	-	Cocos -	
									40	-	-	-	-	-	Cocos -	
									41	-	-	-	-	-	Cocos - y Bacilos +	
									42	-	-	-	-	-	Cocos - y Bacilos +	

**Tabla 8.** Datos de la muestras del Instituto Mexicano del Seguro Social “La Margarita” sin tratamiento con etanol

Datos									PCR					Gram	Identificación del Microorganismo por Secuenciación de 16S rRNA	
Clave	Paciente	Sexo	Años	Toxina A y B	Forma de las Heces	Cantidad de muestra	Cultivo	Clonas	<i>tpi</i>	<i>tcdA</i>	<i>tcdB</i>	<i>cdtA</i>	<i>cdtB</i>			
Cdnd1	P1	-	-	NR	Pastosa	0.0719	SI	1	1	-	-	-	-	-	Cocos +	<i>Clostridium sp</i>
Cdnd2	P2	-	-	NR	Pastosa	0.0665	SI	1	2	-	-	-	-	-	Cocos +	<i>Enterococcus sp</i>
Cdnd3	P3	-	-	NR	Pastosa	0.0134	SI	4	3	-	-	-	-	-	Bacillos +	
									4	-	-	-	-	-	Bacillos +	<i>Clostridium sp</i>
									5	-	-	-	-	-	Cocos + y Bacillos +	
									6	-	-	-	-	-	Bacillos +	
Cdnd4	P4	-	-	NR	Pastosa	0.2997	SI	2	7	-	-	-	-	-	Cocos +	<i>Enterococcus sp</i>
									8	-	-	-	-	-	Cocos +	
Cdnd5	P5	-	-	NR	Pastosa	0.0384	NO									
Cdnd6	P6	-	-	NR	Pastosa	0.0836	NO									
Cdnd7	P7	-	-	NR	Pastosa	0.0443	SI	4	9	-	-	-	-	-	Cocos -	
									10	-	-	-	-	-	Bacillos +	
									11	-	-	-	-	-	Cocobacilos +	
									12	-	-	-	-	-	Cocos - y Cocobacilos +	
Cdnd8	P8	-	-	NR	Pastosa	0.0017	NO									
Cdnd9	P9	-	-	NR	Líquida	0.2101	NO									
Cdnd10	P10	-	-	NR	Pastosa	0.2019	NO									
Cdnd11	P11	-	-	NR	Pastosa	0.3471	NO									

**Tabla 9. Datos de las muestras del Hospital Ángeles Puebla tratadas con etanol**

Datos								PCR					Gram		
Clave	Paciente	Sexo	Años	Toxina A y B	Forma de las Heces	Cantidad de muestra	Cultivo	Clonas	<i>tpi</i>	<i>tcdA</i>	<i>tcdB</i>	<i>cdtA</i>		<i>cdtB</i>	
Cd01-E	P1	M	30	Negativo	Líquida	0.230g	NO								
Cd02-E	P2	M	66	Negativo	Líquida	0.200g	NO								
Cd03-E	P3	F	22	Negativo	Pastosa	0.076g	NO								
Cd04-E	P4	M	45	Negativo	Pastosa	0.200g	NO								
Cd05-E	P5	M	32	Negativo	Líquida	0.200g	SI	1	1	-			Bacilos +		
Cd06-E	P6	M	3	Negativo	Líquida	0.130g	NO								
Cd07-E	P7	F	49	Negativo	Pastosa	0.200g	NO								
Cd08-E	P8	M	65	Negativo	Pastosa	0.031g	NO								
Cd09-E	P9	F	45	Negativo	Líquida	0.200g	NO								
Cd010-E	P10	F	43	NR	Pastosa	0.058g	SI	7	2	+	+	+	-	-	Bacilos +
									3	-					
									4	-					
									5	-					
									6	-					
									7	-					
									8	-					
Cd011-E	P11	M	65	Negativo	Pastosa	0.0395g	NO								
Cd012-E	P12	F	20	NR	Pastosa	0.1230g	NO								
Cd013-E	P13	F	70	Negativo	Pastosa	0.3207g	NO								
Cd014-E	P14	F	66	Positivo	Líquida	0.1029g	SI	7	9	+	+	+	-	-	Bacilos +
									10	+	+	+	-	-	Bacilos +
									11	+	+	+	-	-	Bacilos +
									12	+	+	+	-	-	Bacilos +
									13	+	+	+	+	+	Bacilos +
									14	+	+	+	+	+	Bacilos +
									15	+	-	-	-	-	Bacilos +
Cd015-E	P15	F	-	NR	Pastosa	0.2722g	NO								
Cd016-E	P16	M	59	Negativa	Pastosa	0.1194g	SI	8	16	-					Bacilos +
									17	-					Bacilos +
									18	-					Bacilos +
									19	-					Bacilos +
									20	-					Bacilos +
									21	-					Bacilos +
									22	-					Bacilos +
									23	-					Bacilos +
Cd018-E	P18	M	0a	Positivo	Líquida	0.2416g	SI	5	24	+	+	+	-	-	Bacilos +
									25	+	+	+	-	-	Bacilos +
									26	+	+	+	-	-	Bacilos +
									27	+	+	+	-	-	Bacilos +
									28	+	+	+	-	-	Bacilos +
Cd019-E	P19	F	30	Negativo	Pastosa	0.0864g	NO								
Cd020-E	P20	M	49	Positivo	Líquida	0.1988g	NO								
Cd021-E	P21	F	20	Positivo	Sólida	0.1593g	SI	3	29	+	+	+	-	-	Bacilos +
									30	+	+	+	-	-	Bacilos +
									31	+	+	+	-	-	Bacilos +

**Tabla 10.** Datos de las muestras del Instituto Mexicano del Seguro Social “La Margarita” tratadas con etanol

Datos									PCR					Gram	
Clave	Paciente	Sexo	Años	Toxina A y B	Forma de las Heces	Cantidad de muestra	Cultivo	Clonas	<i>tpi</i>	<i>tcdA</i>	<i>tcdB</i>	<i>cdtA</i>	<i>cdtB</i>		
Cdnd1-E	P1	-	-	NR	Pastosa	0.0566g	SI	6	1	-				Bacilos -	
									2	+	-	-	-	-	Bacilos +
									3	-					Bacilos -
									4	-					Bacilos -
									5	-					Bacilos -
									6	-					Bacilos -
Cdnd2-E	P2	-	-	NR	Pastosa	0.0333g	SI	5	7	+	-	-	-	-	Bacilos +
									8	+	-	-	-	-	Bacilos +
									9	+	-	-	-	-	Bacilos +
									10	+	-	-	-	-	Bacilos +
									11	+	-	-	-	-	Bacilos +
Cdnd3-E	P3	-	-	NR	Pastosa	0.0106g	SI	3	12	-					Bacilos -
									13	+	-	-	-	-	Bacilos +
									14	-					Bacilos -
Cdnd4-E	P4	-	-	NR	Pastosa	0.0800g	SI	7	15	+	-	-	-	-	Bacilos +
									16	+	-	-	-	-	Bacilos +
									17	+	-	-	-	-	Bacilos +
									18	+	-	-	-	-	Bacilos +
									19	+	-	-	-	-	Bacilos +
									20	+	-	-	-	-	Bacilos +
									21	+	-	-	-	-	Bacilos +
Cdnd5-E	P5	-	-	NR	Pastosa	0.0926g	SI	3	22	-					Bacilos -
									23	-					Bacilos -
									24	-					Bacilos -
Cdnd6-E	P6	-	-	NR	Pastosa	0.0785g	SI	7	25	+	-	-	-	-	Bacilos +
									26	+	-	-	-	-	Bacilos +
									27	+	-	-	-	-	Bacilos +
									28	+	-	-	-	-	Bacilos +
									29	+	-	-	-	-	Bacilos +
									30	+	-	-	-	-	Bacilos +
									31	+	-	-	-	-	Bacilos +
Cdnd7-E	P7	-	-	NR	Pastosa	0.0701g	NO								
Cdnd8-E	P8	-	-	NR	Pastosa	0.0827g	NO								
Cdnd9-E	P9	-	-	NR	Liquida	0.3875g	NO								
Cdnd10-E	P10	-	-	NR	Pastosa	0.0911g	SI	2	32	-					Bacilos -
									33	+	-	-	-	-	Bacilos +
Cdnd11-E	P11	-	-	NR	Pastosa	0.1020g	NO								

NR: No se realizo



**Tabla 11. Datos de la muestras Hospital Infantil de México “Federico Gómez”**

Datos											PCR					Gram
Fecha	Clave Mex	Clave	Paciente	Sexo	Años	Toxina A y B	Forma de las Heces	Cantidad de muestra	Cultivo	Clonas	<i>tqi</i>	<i>tcdA</i>	<i>tcdB</i>	<i>cdtA</i>	<i>cdtB</i>	
dic-18	799	Cdmx1	-	-	-	Positivo	Líquida	200µL	NO							
ene-19	567	Cdmx2	-	-	-	Positivo	Líquida	200µL	NO							
oct-19	100	Cdmx3	-	-	-	Positivo	-	-	SI	1	+	+	+	-	-	Bacilos +
feb-19	571	Cdmx4	-	-	-	Positivo	-	-	SI	1	+	+	+	-	-	Bacilos +
feb-19	572	Cdmx5	-	-	-	Positivo	-	-	SI	1	+	+	+	-	-	Bacilos +
mar-19	774	Cdmx6	-	-	-	Positivo	-	-	SI	1	+	+	+	-	-	Bacilos +
mar-19	799	Cdmx7	-	-	-	Positivo	-	-	SI	1	+	+	+	+	+	Bacilos +
nov-14	179	Cdmx8	-	-	-	Positivo	-	-	SI	1	-	-	-	-	-	Bacilos +
sep-15	246	Cdmx9	-	-	-	Positivo	-	-	SI	1	+	-	-	-	-	Bacilos +
feb-19	355	Cdmx10	-	-	-	Positivo	-	-	SI	1	+	+	+	-	-	Bacilos +
ene-19	472	Cdmx11	-	-	-	Positivo	-	-	SI	1	+	+	+	-	-	Bacilos +
feb-19	602	Cdmx12	-	-	-	Positivo	-	-	SI	1	+	+	+	-	-	Bacilos +

## 9. Discusión

La infección por *Clostridioides difficile* se ha convertido un problema de salud pública en todo el mundo y México nos es la excepción; sin embargo, no se conoce la magnitud real de esta enfermedad en nuestro país debido a las escasas publicaciones. En este trabajo se analizaron 44 muestras diarreicas que se recolectaron por un periodo de un año (Julio 2018-Julio 2019) de tres diferentes hospitales (Hospital Ángeles Puebla, IMSS La Margarita Puebla y el Hospital Infantil de México Federico Gómez), pero debido a políticas de estos hospitales no se tuvo acceso a todos los datos clínicos de los pacientes. Del Hospital Ángeles solo se cuenta con datos como edad, género y resultado de EIA; del Hospital Infantil de México solo con el resultado de EIA y del IMSS no se cuenta con ningún dato. Se hizo la solicitud a los mismos, de información del tratamiento con antibióticos que recibieron estos pacientes para poder conocer el antibiótico con mayor asociación a la infección por *C. difficile*, la duración de este tratamiento, si hubo presencia de diarrea y si fue paciente hospitalizado o ambulatorio pero no se contó con esta información por lo que la discusión de resultados solo será en base a lo obtenido por el cultivo y por amplificación de los genes toxigénicos. De acuerdo a los datos del Hospital Ángeles, la edad promedio de los pacientes incluidos fue de 45.9 años (0-93), 11 muestras (52%) eran hombres y 10 muestras (45%) de mujeres.

Actualmente los inmunoensayos enzimáticos (EIA) para la detección de las toxinas de *C. difficile* no son lo suficientemente sensibles y pueden dar un diagnóstico erróneo para CDI; sin embargo el cultivo toxigénico sigue siendo el estándar de oro por su alta sensibilidad y especificidad y aunque es una técnica lenta (1-3 días), laboriosa y requiere personal preparado, se sigue utilizando como método de referencia. Esta metodología permite la caracterización del microorganismo aislado para la posterior realización de estudios epidemiológicos y del perfil de susceptibilidad antimicrobiana. Aunque las pruebas de inmunoensayo tienen un costo accesible, que las convierte en una prueba ideal para el abordaje inicial de los pacientes con diarrea de inicio reciente, cuando se comparan con el cultivo toxigénico alcanzan una sensibilidad y especificidad >90%. El cultivo toxigénico se utiliza como una prueba de referencia para realizar tanto monitorización de técnicas implantadas en la rutina diagnóstica como evaluaciones de otras técnicas de diagnóstico nuevas. El objetivo de este trabajo no solo fue el

aislamiento y caracterización de *C. difficile* sino también comparar las técnicas usadas en los hospitales con los resultados del cultivo toxigénico.

Se hizo cultivo toxigénico en el medio CCFA-TC de las 44 muestras diarreicas recolectadas de los tres hospitales, cuando se sembraron las muestras, la primera vez se hizo de manera directa (sin tratamiento de las muestras); sin embargo, al caracterizar los aislados (PCR de las toxinas) se tuvo un resultado negativo, pero al tratar las muestras con etanol se pudo recuperar más esporas de *C. difficile* por este método, que tal vez con la metodología anterior no eran suficientes esporas para poder caracterizar esta bacteria. De las 44 muestras 30 ya habían sido analizadas por EIA en los hospitales reportando un resultado positivo para 16 de estas muestras, en cambio en nuestro trabajo 23 muestras de las 44 totales presentaron crecimiento en el medio CCFA-TC. Después de que se analizaron los genes de las toxinas de estos aislamientos se encontró que solo 12 muestras era *C. difficile* toxigénico y comparando con lo que reportan los hospitales se puede ver que el resultado de 4 muestras no corresponde con nuestros resultados; como se mencionó anteriormente los EIA de las *C. difficile* tienen una baja sensibilidad y especificidad, lo que dificulta la detección correcta de la enfermedad asociada a *C. difficile* (Figura 28).

El gen de mantenimiento *tpi* que codifica para la enzima metabólica triosa fosfato isomerasa proporciona un marcador alternativo al 16S rRNA para la caracterización genotípica de *C. difficile*. El protocolo de PCR dirigido a un fragmento interno específico de este gen ya ha sido descrito por primera vez por Lemee, *et al.*, en el 2004, Lemee corroboró su especificidad detectándose señal de amplificación de *tpi* solo en *C. difficile* y no en las 11 especies diferentes del género *Clostridium*. A partir de este trabajo se han reportado otros que utilizan estos cebadores para la identificación primaria de *C. difficile* y descartar otros microorganismos y seguir con el análisis de las toxinas, entre ellos, Samie, *et al.*, en el 2008 que estudió 322 muestras de heces, 45 resultaron positivas para el gen *tpi*, de estas positivas 22 eran toxina negativa y 23 tenían al menos uno de los tres genes de las toxinas. Shin y Lee en el 2014 identificaron de 530 muestras fecales 180 aislados como *C. difficile*, 27 de estas eran cepas no toxigénicas, todas con *tpi* positivos. Park, *et al.*, en el 2015 analizaron 1402 muestras de heces encontrando *C. difficile* en 231 aislados, confirmado por el gen *tpi*. Camorlinga, *et al.*, en el 2019 identificaron cepas no toxigénicas de *C. difficile* de pacientes en México amplificando el gen *tpi*.

Desde que se reportó el primer protocolo de PCR de un gen de mantenimiento para la identificación de *C. difficile*, el gen *tpi* se ha utilizado para confirmar si es o no *C. difficile* y poder seguir con la amplificación de los genes de las toxinas de *C. difficile*. Es por ello que se decidió usar estos cebadores para amplificar el gen *tpi* de los aislados que se obtuvo en el medio CCFA-TC.

A las 23 muestras positivas en el cultivo, se les amplificó el gen *tpi*, de estos aislamientos solo 19 dieron positivo al gen *tpi*. Por hospital, del HA (n=6) solo 4 muestras (Cd010-E, Cd014-E, Cd018-E y Cd021-E) dieron positivo para *tpi* y 2 muestras (Cd05-E y Cd016-E) dieron negativo; del IMSS (n=7), 6 muestras (Cdnd1-E, Cdnd2-E, Cdnd3-E, Cdnd4-E, Cdnd6-E y Cdnd10-E) dieron positivo a *tpi* y 1 muestra (Cdnd5-E) dio negativo y del Hospital Infantil de México (n=10), 9 muestras (Cdmx3, Cdmx4, Cdmx5, Cdmx6, Cdmx7, Cdmx9, Cdmx10, Cdmx11 y Cdmx12) dieron positivo a *tpi* y una muestra dio negativo (Cdmx8). De estas 19 muestras positivas al gen *tpi*, se siguió con la amplificación de los genes de las toxinas y solo 12 aislados (4 del HA y 8 del Hosp. Infantil de Méx) amplificaron para algunos de los dos genes; 7 aislados (6 del IMSS y 1 del Hosp. Infantil de Méx) no amplificaron para ninguna de las toxinas. A pesar de que en los reportes para la identificación de *C. difficile* solo se amplifican las toxinas de los aislados a *tpi* positivos, decidimos amplificar los genes de las toxinas de los 4 aislados (Cd05-E, Cd016-E, Cdnd5-E y Cdmx8) negativos a *tpi* para confirmar que no era *C. difficile* toxigénico dando un resultado negativo para todos los genes de las toxinas. Nuestros resultados se pueden comparar con los de Samie, *et al.*, en el 2008 y Shin BM y Lee en el 2014, donde también analizaron aislados de muestras fecales y al amplificar el gen *tpi* de estos aislados, obtuvieron resultados tanto positivos y negativos para este gen, posteriormente siguieron con la amplificación de los genes de las toxinas solo de las cepas positivas a *tpi*, obteniendo cepas de *C. difficile* toxigénicas y no toxigénicas con *tpi* positivo. En nuestros resultados, 12 aislados fueron *C. difficile* toxigénico y 7 aislados *C. difficile* no toxigénico (NTCD) con resultado positivo a *tpi*.

De los 7 aislados (6 del IMSS y 1 del Hosp. Infantil de Méx) que no amplificaron para ninguno de los genes de toxinas, pero resultado positivo a *tpi*, se reportan como cepas de *C. difficile* no toxigénicas, aunque en las referencias anteriores también utilizan la ampliación del gen 16S rRNA. Lo que sugeriría la necesidad de secuenciarlo en estas cepas para confirmar la especie.

Las cepas de *C. difficile* no toxigénica (NTCD) generalmente se aíslan de individuos asintomáticos, pero hay algunos informes de la asociación de estas cepas NTCD con la diarrea. Además de que se han aislado de pacientes infectados con cepas toxigénicas se sugiere que están involucradas en infecciones mixtas, el papel de estas cepas en la enfermedad intestinal sigue sin ser muy claro (Camorlinga, *et al.*, 2019).

La muestra Cd010-E del Hospital Ángeles, cuyo resultado fue positivo a *C. difficile* A<sup>+</sup>B<sup>+</sup> por cultivo toxigénico, no tuvo solicitud en dicho hospital para determinación de Toxinas por EIA. Debido a la falta de datos del paciente no se pudo saber si cursó con algún síntoma o si tomó algún antibiótico durante su estancia. De acuerdo a un consenso realizado en el 2019 por la revista de gastroenterología de México, las pruebas de laboratorio clínico por sí solas no pueden distinguir entre colonización asintomática y síntomas clínicos de la infección, puesto que éstas solo se deben realizar en pacientes con sospecha clínica, quizá esta sea la razón de porque a esta muestra no se le solicitó la determinación de toxinas por EIA, posiblemente no tenía síntomas que pudieran sospechar un CDI. Si este paciente fuera un portador asintomático de *C. difficile* toxigénico (habría que confirmar con historia clínica) tiene la capacidad de contribuir a la transmisión de la infección en el hospital. Además del riesgo de presentar una CDI al recibir un tratamiento antibiótico.

La muestra Cd014-E del Hospital Ángeles, con un resultado positivo a Toxina A/B por EIA, en el cultivo toxigénico se encontró tres diferentes genotipos *C. difficile* A<sup>+</sup>B<sup>+</sup>CDT<sup>+</sup>, A<sup>+</sup>B<sup>+</sup>CDT<sup>-</sup>, A<sup>-</sup>B<sup>-</sup>CDT<sup>-</sup> en esta misma muestra. Este resultado se obtuvo después de que la muestra se tratara con etanol y fue la única muestra que tenía la toxina CDT del Hospital Ángeles Puebla. Las muestras Cd014-E, Cd018-E y Cd020-E coincidieron con el resultado positivo del EIA y con el resultado positivo del cultivo toxigénico; sin embargo, la muestra Cd021-E que también tenía un resultado positivo a EIA, no presentó crecimiento en el cultivo toxigénico, aun después de varias repeticiones, incluso disminuyendo la concentración de los antibióticos del medio a la mitad, ya que algunas referencias mencionan que al reducir la cefoxitina y la cicloserina a la mitad de la concentración que normalmente se agrega al medio, puede mejorar el crecimiento. También se probó crecer la muestra sin tratamiento con etanol pero tampoco hubo crecimiento por lo que se tomó como un resultado negativo. Esto nos podría indicar que puede haber un falso positivo de esta muestra por las técnicas usadas en este hospital.

La muestra Cd015-E fue un caso especial, como mencionamos en los resultados se incluyó en la muestras del Hospital Ángeles Puebla, para mayor facilidad ya que esta muestra no es proveniente de este Hospital, esta muestra fue de un paciente que se visitó en su domicilio, el cual mencionó que había ingresado al hospital por una cirugía percutánea del pie y había recibido un tratamiento de antibiótico (Clindamicina) a su egreso y después de dos semanas de reposo ingresó nuevamente en el hospital por los síntomas que presentó (dolor abdominal y diarrea). En su reingreso al hospital, se le diagnóstico CDI solo por sintomatología ya que no se le hizo ninguna prueba que lo confirmara, por lo cual se decidió realizar el cultivo toxigénico y obtuvimos un resultado negativo, no encontramos la presencia de *C. difficile* toxigénico, como lo había diagnosticado en el hospital donde se atendió a este paciente; sin embargo, encontramos la presencia de *Klebsiella sp* por la primera metodología para hacer el cultivo. Lo que podemos notar es la falta de información por parte de algunos médicos para detectar *C. difficile* en las muestras fecales, no solo se debe basar en sintomatología sino también en pruebas EIA y hasta técnicas moleculares.

Las muestras Cd05-E y Cd016-E con un resultado a EIA negativo, tuvieron crecimiento en el CCFA-TC, pero el resultado del gen *tpi* fue negativo para todas la clonas de estas dos muestras. A pesar de este resultado se decidió seguir con amplificación de los genes de las toxinas para corroborar, el resultado fue negativo para TcdA, TcdB y CDT, lo que puede ser es que hubo crecimiento de otras especies de *Clostridium*, como se mencionó anteriormente el medio tiene algunas limitaciones entre las cuales es el crecimiento de algunas otras especies de *Clostridium* que tiene una morfología similar a *C. difficile*.

Las 12 muestras del Hospital Infantil de México, están reportadas como positivo a EIA de las toxinas de *C. difficile*, pero las muestras Cdmx1 y Cdmx2, no crecieron en el medio CCFA-TC aunque se sembraron por triplicado. Las muestras Cdmx3, Cdmx4, Cdmx5, Cdmx6, Cdmx7, Cdmx8, Cdmx9, Cdmx10, Cdmx11 y Cdmx12 crecieron en el medio CCFA-TC y solo 8 (Cdmx3, Cdmx4, Cdmx5, Cdmx6, Cdmx7, Cdmx10, Cdmx11 y Cdmx12) de estos aislamientos dieron positivo para las toxinas y solo la muestra Cdmx7 amplificó para las tres toxinas (A<sup>+</sup>B<sup>+</sup>CDT<sup>+</sup>), la muestra Cdmx8 no amplificó para ninguno de los genes que se estaba buscando, tal vez lo que creció fue otro especie de *Clostridium*, la muestra Cdmx9 solo amplifico el gen *tpi*, pero para ninguna de las tres toxinas, las demás muestras tenían un genotipo A<sup>+</sup>B<sup>+</sup>. Lo que podemos decir

de los resultados de este hospital es que la sensibilidad de la técnica que estén usando debe ser menor a 90% ya que al comparar con el cultivo toxigénico se encuentra un contraste de algunas muestras que supuestamente eran positivas a presencia de *C. difficile* toxigénico por EIA, con lo que podemos darnos cuenta de la presencia de algunos falsos positivos.

En cuanto las muestras del IMSS, que en su mayoría eran muestras fecales de bebés, no se encontró la presencia de *C. difficile* toxigénico, ya que los 6 aislamientos solo amplificaron para el gen *tpi*, presentando solo genotipo de A<sup>-</sup>B<sup>-</sup>CDT<sup>-</sup>, en las muestras Cdnd1-E, Cdnd2-E, Cdnd3-E, Cdnd4-E, Cdnd6-E y Cdnd10-E, a pesar de que algunos reportes mencionan que en niños pequeños con frecuencia existe colonización intestinal por este agente, tal es el caso de la muestra Cd018-E del HA que es de un niño de 0 años, sin embargo en este hospital no fue el caso.

En la actualidad se reconoce a la infección de por *C. difficile* como principal causa de diarrea nosocomial en los países desarrollados. Aunque se ha reportado un incremento dramático del número de casos en Estados Unidos y Europa, el incremento no solo es de países de primer mundo si no a nivel global al haber reportes provenientes de Latinoamérica como Brasil, Perú, Chile y México. *Clostridioides difficile* ha captado la atención de los investigadores y médicos en los últimos años debido al incremento del número de infecciones y su elevada mortalidad y reincidencia por la aparición de una nueva cepa (*C. difficile* NAP1/BI/027), aunque Loo, *et al.*, en Quebec, Canadá y McDonald, *et al.*, en Estados Unidos publicaron en diciembre del 2018 varios brotes intrahospitalarios causados por la cepa NAP1/BI/027, en nuestro trabajo no pudimos identificar esta cepa por la falta de tiempo y material ya que se requiere montar una PCR y un software para la identificación de este ribotipo, pero se sospecha de dos aislados, Cd014-E y la Cdmx7 por el genotipo que presentan (A<sup>+</sup>B<sup>+</sup>CDT<sup>+</sup>) por lo que habría que analizar más adelante si en nuestro entorno esta circulando esta cepa hipervirulenta. Solo se hizo la amplificación del gen 16S rRNA de estas dos cepas (Cd014-E y Cdmx7).

## 10. Conclusiones

1. Se aisló *C. difficile* toxigénico de las muestras diarreicas del Hospital Ángeles Puebla y del Hospital Infantil de México, pero no de IMSS La Margarita Puebla.
2. El genotipo que mayor predomina es *C. difficile* A<sup>+</sup>B<sup>+</sup> seguido de A<sup>+</sup>B<sup>+</sup>CDT<sup>+</sup> y A<sup>-</sup>B<sup>-</sup>CDT<sup>-</sup>.
3. Se encontró *C. difficile* A<sup>+</sup>B<sup>+</sup> de una muestra que no tenía solicitud para la determinación Toxina A y B de *C. difficile* del Hospital Ángeles.
4. Se encontró resultados falsos positivos en dos muestras del Hospital Infantil de México ya que estas muestras ya habían sido reportadas con la presencia de *C. difficile* toxigénico; sin embargo, en el laboratorio dieron negativo a las toxinas de *C. difficile*.
5. Con base en los resultados que se obtuvieron en este trabajo se demostró la presencia de *C. difficile* toxigénico en pacientes hospitalizados.
6. Solo en dos cepas de *C. difficile* se encontró la toxina binaria (CDT) coincidiendo con los reportes de que solo del 6 al 12.5% de las cepas de *C. difficile* tienen CDT.



## 11. Perspectivas

1. Secuenciar gen 16S rRNA de las cepas de *C. difficile* aislados por el método de choque con etanol.
2. Determinar el ribotipo de *C. difficile*.
3. Determinar estudios de resistencia.

## 12. Bibliografía

- Abreu, Y. A. A. T., Velarde-Ruiz Velasco, J. A., Zavala-Solares, M. R., Remes-Troche, J. M., Carmona-Sanchez, R. I., Aldana-Ledesma, J. M., . . . Lazo-de la Vega Jasso, S. A. (2019). Consensus on the prevention, diagnosis, and treatment of *Clostridium difficile* infection. *Rev Gastroenterol Mex*, 84(2), 204-219. DOI:10.1016/j.rgmx.2018.12.001
- Abt, M. C., McKenney, P. T., & Pamer, E. G. (2016). *Clostridium difficile* colitis: pathogenesis and host defence. *Nat Rev Microbiol*, 14(10), 609-620. DOI:10.1038/nrmicro.2016.108
- Aktorics, K., Barth, H. (2004). The actin-ADP-ribosylating *Clostridium botulinum* C2 toxin. *Anaerobe*, 10(2), 101–105. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2003.10.003
- Aktorics, K., Schwan, C., & Jank, T. (2017). *Clostridium difficile* Toxin Biology. *Annu Rev Microbiol*, 71, 281-307. DOI:10.1146/annurev-micro-090816-093458
- Alauzet, C., Lozniewski, A., & Marchandin, H. (2019). Metronidazole resistance and nim genes in anaerobes: A review. *Anaerobe*, 55, 40-53. DOI:10.1016/j.anaerobe.2018.10.004
- Alcalá Hernández, L., Marín Arriaza, M., Mena Ribas, A., Niubó Bosh J. (2015). Diagnóstico microbiológico de la infección por *Clostridium difficile*. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). DOI: 10.1016/j.eimc.2015.09.004
- Alcala-Hernandez, L., Mena-Ribas, A., Niubo-Bosh, J., & Marin-Arriaza, M. (2016). [Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infection]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 34(9), 595-602. DOI:10.1016/j.eimc.2015.09.004
- Alvarez-Hernandez, D. A., Gonzalez-Chavez, A. M., Gonzalez-Hermosillo-Cornejo, D., Franyuti-Kelly, G. A., Diaz-Giron-Gidi, A., & Vazquez-Lopez, R. (2018). Present and past perspectives on *Clostridium difficile* infection. *Rev Gastroenterol Mex*, 83(1), 41-50. DOI:10.1016/j.rgmx.2017.03.004
- Anderson, B. M., Anderson, C. D., Van-Tassell, R. L., Lyerly, D. M., Wilkins, T. D. (1993). Purification and characterization of *Clostridium difficile* glutamate dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys* 300, 483–488. DOI: 10.1006/abbi.1993.1065
- Awad, M. M., Johanesen, P. A., Carter, G. P., Rose, E., & Lyras, D. (2014). *Clostridium difficile* virulence factors: Insights into an anaerobic spore-forming pathogen. *Gut Microbes*, 5(5), 579-593. DOI:10.4161/19490976.2014.969632
- Balassiano, I. T., Yates, E.A., Domingues, R.M., Ferreira, E.O. (2012). *Clostridium difficile*: a problem of concern in developed countries and still a mystery in Latin America. *J Med Microbiol*, 61(2),169-79. DOI: 10.1099/jmm.0.037077-0
- Barbut, F., Kajzer, C., Planas, N., & Petit, J. C. (1993). Comparison of three enzyme immunoassays, a cytotoxicity assay, and toxigenic culture for diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *J Clin Microbiol*, 31(4), 963-967.
- Barra-Carrasco, J., Hernandez-Rocha, C., Ibanez, P., Guzman-Duran, A. M., Alvarez-Lobos, M., & Paredes-Sabja, D. (2014). [*Clostridium difficile* spores and its relevance in the persistence and transmission of the infection]. *Rev Chilena Infectol*, 31(6), 694-703. DOI:10.4067/S0716-10182014000600010
- Bidet, P., Barbut, F., Lalande, V., Burghoffer, B., & Petit, J. C. (1999). Development of a new PCR-ribotyping method for *Clostridium difficile* based on ribosomal RNA gene sequencing. *Fems Microbiology Letters*, 175(2), 261-266. DOI:10.1111/j.1574-6968.1999.tb13629.x

- Bien, J., Palagani, V., & Bozko, P. (2013). The intestinal microbiota dysbiosis and *Clostridium difficile* infection: is there a relationship with inflammatory bowel disease? *Therap Adv Gastroenterol*, 6(1), 53-68. DOI:10.1177/1756283X12454590
- Blanco, P. A., Ruiz, M. O., Otero, R. W., Gómez, Z. M. (2013). Infección por *Clostridium difficile* en ancianos. *Rev Col Gastroenterol*, 28(1). DOI: S0120-99572013000100007
- Bordeleau, E., Purcell, E. B., Lafontaine, D. A., Fortier, L. C., Tamayo, R., & Burrusa, V. (2015). Cyclic Di-GMP Riboswitch-Regulated Type IV Pili Contribute to Aggregation of *Clostridium difficile*. *Journal of Bacteriology*, 197(5), 819-832. DOI:10.1128/Jb.02340-14
- Borriello, S. P., Davies, H. A., & Barclay, F. E. (1988). Detection of Fimbriae Amongst Strains of *Clostridium difficile*. *Fems Microbiology Letters*, 49(1), 65-67. DOI: 10.1016/0378-1097(88)90103-6
- Boseiwaqa, L. V., Foster, N. F., Thean, S. K., Squire, M. M., Riley, T. V., & Carson, K. C. (2013). Comparison of ChromID *C. difficile* agar and cycloserine-cefoxitin-fructose agar for the recovery of *Clostridium difficile*. *Pathology*, 45(5), 495-500. DOI:10.1097/PAT.0b013e3283632680
- Bouillaut, L., McBride, S. M., & Sorg, J. A. (2011). Genetic manipulation of *Clostridium difficile*. *Curr Protoc Microbiol*, Chapter 9, Unit 9A 2. DOI:10.1002/9780471729259.mc09a02s20
- Boyle, M. L., Ruth-Sahd, L. A., & Zhou, Z. (2015). Fecal microbiota transplant to treat recurrent *Clostridium difficile* infections. *Crit Care Nurse*, 35(2), 51-64; quiz 65. DOI:10.4037/ccn2015356
- Braun, V., Hundsberger, T., Leukel, P., Sauerborn, M., Eichel-Streiber Von, V. (1996). Definition of the single integration site of the pathogenicity locus in *Clostridium difficile*. *Gene* 181, 29–38. DOI: [org/10.1016/S0378-1119\(96\)00398-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(96)00398-8).
- Brouwer, M. S. M., Roberts, A. P., Hussain, H., Williams, R. J., Allan, E., Mullany, P. (2013). Horizontal gene transfer converts non-toxigenic *Clostridium difficile* strains into toxin producers. *Nat Commun*, 4, 2601.
- Camacho-Ortiz, A., Lopez-Barrera, D., Hernandez-Garcia, R., Galvan-De Los Santos, A. M., Flores-Trevino, S. M., Llaca-Diaz, J. M., . . . Garza-Gonzalez, E. (2015). First report of *Clostridium difficile* NAP1/027 in a Mexican hospital. *PLoS One*, 10(4), e0122627. DOI:10.1371/journal.pone.0122627
- Camacho-Ortiz, A., Ponce-de-Leon, A., & Sifuentes-Osornio, J. (2009). [*Clostridium difficile* associated disease in Latin America]. *Gac Med Mex*, 145(3), 223-229.
- Camorlinga, M., Sanchez-Rojas, M., Torres, J., & Romo-Castillo, M. (2019). Phenotypic Characterization of Non-toxigenic *Clostridioides difficile* Strains Isolated From Patients in Mexico. *Front Microbiol*, 10, 84. DOI:10.3389/fmicb.2019.00084
- Carson, K. C., Boseiwaqa, L. V., Thean, S. K., Foster, N. F., & Riley, T. V. (2013). Isolation of *Clostridium difficile* from faecal specimens--a comparison of chromID *C. difficile* agar and cycloserine-cefoxitin-fructose agar. *J Med Microbiol*, 62(Pt 9), 1423-1427. DOI:10.1099/jmm.0.056515-0
- Cerquetti, M., Serafino, A., Sebastianelli, A., & Mastrantonio, P. (2002). Binding of *Clostridium difficile* to Caco-2 epithelial cell line and to extracellular matrix proteins. *Fems Immunology and Medical Microbiology*, 32(3), 211-218. DOI:Pii S0928-8244(01)00301-7
- Chandrasekaran, R., & Lacy, D. B. (2017). The role of toxins in *Clostridium difficile* infection. *FEMS Microbiol Rev*, 41(6), 723-750. DOI:10.1093/femsre/fux048

- Chandrasekaran, R., Kenworthy, A. K., & Lacy, D. B. (2016). *Clostridium difficile* Toxin A Undergoes Clathrin-Independent, PACSIN2-Dependent Endocytosis. *PLoS pathogens*, 12(12), e1006070. DOI:10.1371/journal.ppat.1006070
- Chumbler, N. M., Rutherford, S. A., Zhang, Z., Farrow, M. A., Lisher, J. P., Farquhar, E., . . . Lacy, D. B. (2016). Crystal structure of *Clostridium difficile* toxin A. *Nat Microbiol*, 1. DOI:10.1038/nmicrobiol.2015.2
- Clabots, C. R., Gerding, S. J., Olson, M. M., Peterson, L. R., & Gerding, D. N. (1989). Detection of asymptomatic *Clostridium difficile* carriage by an alcohol shock procedure. *J Clin Microbiol*, 27(10), 2386-2387.
- Cohen, S. H., Gerding, D. N., Johnson, S., Kelly, C. P., Loo, V. G., McDonald, L. C., . . . Infectious Diseases Society of, A. (2010). Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults: 2010 update by the society for healthcare epidemiology of America (SHEA) and the infectious diseases society of America (IDSA). *Infect Control Hosp Epidemiol*, 31(5), 431-455. DOI:10.1086/651706
- Davies, K. A., Ashwin, H., Longshaw, C. M., Burns, D. A., Davis, G. L., Wilcox, M. H., & group, E. s. (2016). Diversity of *Clostridium difficile* PCR ribotypes in Europe: results from the European, multicentre, prospective, biannual, point-prevalence study of *Clostridium difficile* infection in hospitalised patients with diarrhoea (EUCLID), 2012 and 2013. *Euro Surveill*, 21(29). DOI:10.2807/1560-7917.ES.2016.21.29.30294
- Dawson, L. F., Valiente, E., Faulds-Pain, A., Donahue, E. H., & Wren, B. W. (2012). Characterisation of *Clostridium difficile* Biofilm Formation, a Role for Spo0A. *PLoS One*, 7(12). DOI:ARTN e5052710.1371/journal.pone.0050527
- Depestel, D. D., & Aronoff, D. M. (2013). Epidemiology of *Clostridium difficile* infection. *J Pharm Pract*, 26(5), 464-475. DOI:10.1177/0897190013499521
- Dhalluin, A., Lemeé, L., Pestel-Caron, M., Mory, F., Leluan, G., Lemeland, J. F., & Pons, J. L. (2003). Genotypic differentiation of twelve *Clostridium* species by polymorphism analysis of the triosephosphate isomerase (*tpi*) gene. *Syst Appl Microbiol*, 26(1), 90-96. DOI:10.1078/072320203322337362
- Dingle, K. E., Griffiths, D., Didelot, X., Evans, J., Vaughan, A., Kachrimanidou, M., . . . Crook, D. W. (2011). Clinical *Clostridium difficile*: clonality and pathogenicity locus diversity. *PloS one*, 6(5), e19993. DOI:10.1371/journal.pone.0019993
- Djebbar, A., Sebahia, M., Kuijper, E., Harmanus, C., Sanders, I., Benbraham, N., & Hacene, H. (2018). First molecular characterisation and PCR ribotyping of *Clostridium difficile* strains isolated in two Algerian Hospitals. *J Infect Dev Ctries*, 12(1), 15-21. DOI:10.3855/jidc.9580
- Duleba, K., Pawlowska, M., & Wietlicka-Piszczyk, M. (2014). *Clostridium difficile* infection in children hospitalized due to diarrhea. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 33(2), 201-209. DOI:10.1007/s10096-013-1946-1
- Elliott, B., Reed, R., Chang, B.J., Thomas, V. R. (2009). Bacteremia with a large clostridial toxin-negative, binary toxin-positive strain of *Clostridium difficile*. *Anaerobe*, 15, 249–51. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2009.08.006.
- Flores, R. R., Duery, A. O. (2017). DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE *Clostridium difficile*. Instituto de Salud Pública de Chile.
- Freeman, J., Bauer, M. P., Baines, S. D., Corver, J., Fawley, W. N., Goorhuis, B., . . . Wilcox, M. H. (2010). The changing epidemiology of *Clostridium difficile* infections. *Clinical microbiology reviews*, 23(3), 529–549. DOI:10.1128/CMR.00082-09

- Freifeld, A. G., Simonsen, K. A., Booth, C. S., Zhao, X., Whitney, S. E., Karre, T., . . . Viljoen, H. J. (2012). A new rapid method for *Clostridium difficile* DNA extraction and detection in stool: toward point-of-care diagnostic testing. *Journal of Molecular Diagnostics*, 14(3), 274-279. DOI:10.1016/j.jmoldx.2012.01.003
- Garcia-Garcia-de-Paredes, A., Rodriguez-de-Santiago, E., Aguilera-Castro, L., Ferre-Aracil, C., & Lopez-Sanroman, A. (2015). [Fecal microbiota transplantation]. *Gastroenterol Hepatol*, 38(3), 123-134. DOI:10.1016/j.gastrohep.2014.07.010
- Genth, H., Dreger, S. C., Huelsenbeck, J., & Just, I. (2008). *Clostridium difficile* toxins: more than mere inhibitors of Rho proteins. *Int J Biochem Cell Biol*, 40(4), 592-597. DOI:10.1016/j.biocel.2007.12.014
- George, W. L., Sutter, V. L., Citron, D., & Finegold, S. M. (1979). Selective and differential medium for isolation of *Clostridium difficile*. *Journal of clinical microbiology*, 9(2), 214–219.
- Gerding, D. N., Johnson, S., Rupnik, M., & Aktories, K. (2014). *Clostridium difficile* binary toxin CDT: mechanism, epidemiology, and potential clinical importance. *Gut Microbes*, 5(1), 15-27. DOI:10.4161/gmic.26854
- Ghavidel, M., Salari Sedigh, H., & Razmyar, J. (2016). Isolation of *Clostridium difficile* and molecular detection of binary and A/B toxins in faeces of dogs. *Iran J Vet Res*, 17(4), 273-276.
- Girinathan, B. P., Braun, S. E., & Govind, R. (2014). *Clostridium difficile* glutamate dehydrogenase is a secreted enzyme that confers resistance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Microbiology*, 160(Pt 1), 47-55. DOI:10.1099/mic.0.071365-0
- Goncalves, C., Decre, D., Barbut, F., Burghoffer, B., & Petit, J. C. (2004). Prevalence and characterization of a binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) from *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol*, 42(5), 1933-1939. DOI:10.1128/jcm.42.5.1933-1939.2004
- Goudarzi, M., Seyedjavadi, S. S., Goudarzi, H., Mehdizadeh Aghdam, E., & Nazeri, S. (2014). *Clostridium difficile* Infection: Epidemiology, Pathogenesis, Risk Factors, and Therapeutic Options. *Scientifica (Cairo)*, 2014, 916826. DOI:10.1155/2014/916826
- Gülke, I., Pfeifer, G., Liese, J., Fritz, M., Hofmann, F., Aktories, K., & Barth, H. (2001). Characterization of the enzymatic component of the ADP-ribosyltransferase toxin CDT<sub>a</sub> from *Clostridium difficile*. *Infection and immunity*, 69(10), 6004–6011. DOI:10.1128/IAI.69.10.6004-6011.2001
- Hall, E. O'Toole. (1935). Intestinal flora in newborn infants with a description of a new pathogenic anaerobe. *Bacillus difficilis*, 49, 390-402.
- Hennequin, C., Collignon, A., & Karjalainen, T. (2001). Analysis of expression of GroEL (Hsp60) of *Clostridium difficile* in response to stress. *Microb Pathog*, 31(5), 255-260. DOI:10.1006/mpat.2001.0468
- Hernandez-Rocha, C., Naour, S., Alvarez-Lobos, M., & Paredes-Sabja, D. (2012). [*Clostridium difficile* associated infections: an updated view]. *Rev Chilena Infectol*, 29(4), 434-445. DOI:10.4067/S0716-10182012000400011
- Holy, O., & Chmelar, D. (2012). Oxygen tolerance in anaerobic pathogenic bacteria. *Folia Microbiol (Praha)*, 57(5), 443-446. DOI:10.1007/s12223-012-0149-y
- Houser, B. A., Hattel, A. L., & Jayarao, B. M. (2010). Real-time multiplex polymerase chain reaction assay for rapid detection of *Clostridium difficile* toxin-encoding strains. *Foodborne Pathog Dis*, 7(6), 719-726. DOI:10.1089/fpd.2009.0483

- Hryckowian, A. J., Pruss, K. M., & Sonnenburg, J. L. (2017). The emerging metabolic view of *Clostridium difficile* pathogenesis. *Curr Opin Microbiol*, 35, 42-47. DOI:10.1016/j.mib.2016.11.006
- Hunt, J. J., & Ballard, J. D. (2013). Variations in Virulence and Molecular Biology among Emerging Strains of *Clostridium difficile*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(4), 567-581. DOI:10.1128/Mmbr.00017-13
- Janezic, S. (2016). Direct PCR-Ribotyping of *Clostridium difficile*. *Methods Mol Biol*, 1476, 15-21. DOI:10.1007/978-1-4939-6361-4\_2
- Janezic, S., Indra, A., Rattei, T., Weinmaier, T., & Rupnik, M. (2014). Recombination drives evolution of the *Clostridium difficile* 16S-23S rRNA intergenic spacer region. *PLoS One*, 9(9), e106545. DOI:10.1371/journal.pone.0106545
- Janezic, S., Strumbelj, I., & Rupnik, M. (2011). Use of Modified PCR Ribotyping for Direct Detection of *Clostridium difficile* Ribotypes in Stool Samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(8), 3024-3025. DOI:10.1128/Jcm.01013-11
- Jank, T., & Aktories, K. (2008). Structure and mode of action of *clostridial* glucosylating toxins: the ABCD model. *Trends Microbiol*, 16(5), 222-229. DOI:10.1016/j.tim.2008.01.011
- Janoir, C. (2016). Virulence factors of *Clostridium difficile* and their role during infection. *Anaerobe*, 37, 13-24. DOI:10.1016/j.anaerobe.2015.10.009
- Kocielek, L. K., & Gerding, D. N. (2016). Breakthroughs in the treatment and prevention of *Clostridium difficile* infection. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 13(3), 150-160. DOI:10.1038/nrgastro.2015.220
- Kühn, S., Mannherz, H. G. (2017). Actin: Structure, Function, Dynamics, and Interactions with Bacterial Toxins. *Curr Top Microbiol Immunol*, 399:1-34. DOI: 10.1007/82\_2016\_45
- LaFrance, M. E., Farrow, M. A., Chandrasekaran, R., Sheng, J., Rubin, D. H., & Lacy, D. B. (2015). Identification of an epithelial cell receptor responsible for *Clostridium difficile* TcdB-induced cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(22), 7073–7078. DOI:10.1073/pnas.1500791112
- Lai, H., Huang, C., Cai, J., Ye, J., She, J., Zheng, Y., . . . Jin, D. (2018). Simultaneous detection and characterization of toxigenic *Clostridium difficile* directly from clinical stool specimens. *Front Med*, 12(2), 196-205. DOI:10.1007/s11684-017-0560-5
- Lawson, P. A., Citron, D. M., Tyrrell, K. L., & Finegold, S. M. (2016). Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O'Toole 1935) Prevot 1938. *Anaerobe*, 40, 95-99. DOI:10.1016/j.anaerobe.2016.06.008
- Ledesma-Martínez, V. Michelle., Rueda-Cruz, J. A., Fierros-Urbe. D., García-Preciado, C. J., Santoscoy-Tovar, F. A., Santoscoy-Tovar, L. A., Santoscoy-Tovar, G. José. (2017). Utilidad de la proteína glutamato deshidrogenasa (GDH) en el diagnóstico de diarrea asociado a *Clostridium difficile* en el laboratorio. *Rev Latinoam Patol Clin Med Lab*, 64 (4), 152-157.
- Lemee, L., Bourgeois, I., Ruffin, E., Collignon, A., Lemeland, J. F., & Pons, J. L. (2005). Multilocus sequence analysis and comparative evolution of virulence-associated genes and housekeeping genes of *Clostridium difficile*. *Microbiology*, 151(Pt 10), 3171-3180. DOI:10.1099/mic.0.28155-0
- Lemee, L., Dhalluin, A., Pestel-Caron, M., Lemeland, J. F., & Pons, J. L. (2004). Multilocus sequence typing analysis of human and animal *Clostridium difficile* isolates of various toxigenic types. *J Clin Microbiol*, 42(6), 2609-2617. DOI:10.1128/JCM.42.6.2609-2617.2004

- Lemee, L., Dhalluin, A., Testelin, S., Matrat, M. A., Maillard, K., Lemeland, J. F., & Pons, J. L. (2004). Multiplex PCR targeting *tpi* (triose phosphate isomerase), *tcdA* (Toxin A), and *tcdB* (Toxin B) genes for toxigenic culture of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol*, 42(12), 5710-5714. DOI:10.1128/JCM.42.12.5710-5714.2004
- Limbago, B., Thompson, A. D., Greene, S. A., MacCannell, D., MacGowan, C. E., Jolbitado, B., ... Gould, L. H. (2012). Development of a consensus method for culture of *Clostridium difficile* from meat and its use in a survey of U.S. retail meats. *Food microbiology*, 32(2), 448–451. DOI:10.1016/j.fm.2012.08.005
- Lin, Y. P., Kuo, C. J., Koleci, X., McDonough, S. P., & Chang, Y. F. (2011). Manganese Binds to *Clostridium difficile* Fbp68 and Is Essential for Fibronectin Binding. *Journal of Biological Chemistry*, 286(5), 3957-3969. DOI:10.1074/jbc.M110.184523
- Loo, V.G., Poirier, L., Miller, M. A., Oughton, M., Libman, M. D., Michaud, S., Bourgault, A. M, Nguyen, T., Frenette, C., Kelly, M., Vibien, A., Brassard, P., Fenn, S., Dewar, K., Hudson, T. J., Horn, R, René, P., Monczak, Y., Dascal, A. (2005). A predominantly clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality. *N Engl J Med*, 353, 2442-2449. DOI: 10.1056/NEJMoa051639
- Lopardo, G., Morfin-Otero, R., Moran, V., II, Noriega, F., Zambrano, B., Luxemburger, C., . . . Rivas, E. E. (2015). Epidemiology of *Clostridium difficile*: a hospital-based descriptive study in Argentina and Mexico. *Braz J Infect Dis*, 19(1), 8-14. DOI:10.1016/j.bjid.2014.07.004
- Louie, T. J., Cannon, K., Byrne, B., Emery, J., Ward, L., Eyben, M., & Krulicki, W. (2012). Fidaxomicin preserves the intestinal microbiome during and after treatment of *Clostridium difficile* infection (CDI) and reduces both toxin reexpression and recurrence of CDI. *Clin Infect Dis*, 55 Suppl 2, S132-142. DOI:10.1093/cid/cis338
- Lyras, D., O'Connor, J. R., Howarth, P. M., Sambol, S. P., Carter, G. P., Phumoonna, T., . . . Rood, J. I. (2009). Toxin B is essential for virulence of *Clostridium difficile*. *Nature*, 458(7242), 1176-1181. DOI:10.1038/nature07822
- Ma, G. K., Brensinger, C. M., Wu, Q., & Lewis, J. D. (2017). Increasing Incidence of Multiply Recurrent *Clostridium difficile* Infection in the United States: A Cohort Study. *Ann Intern Med*, 167(3), 152-158. DOI:10.7326/M16-2733
- Maccioni, A., Cerda, J., Terrazas, C., & Abarca, K. (2015). [Clinic and epidemiologic description of *Clostridium difficile* infection in a pediatric population]. *Rev Chilena Infectol*, 32(5), 523-529. DOI:10.4067/S0716-10182015000600005
- Madan, R., & Petri, W. A., Jr. (2012). Immune responses to *Clostridium difficile* infection. *Trends Mol Med*, 18(11), 658-666. DOI:10.1016/j.molmed.2012.09.005
- Martin, J. S., Monaghan, T. M., & Wilcox, M. H. (2016). *Clostridium difficile* infection: epidemiology, diagnosis and understanding transmission. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 13(4), 206-216. DOI:10.1038/nrgastro.2016.25
- McClung, L. S., Toabe, R. (1947). *J. Bacteriol*, 53, 139-147.
- McCollum, D. L., & Rodriguez, J. M. (2012). Detection, treatment, and prevention of *Clostridium difficile* infection. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 10(6), 581-592. DOI:10.1016/j.cgh.2012.03.008
- McDonald, L. C, Killgore, G. E, Thompson, A., Owens, R. C. J., Kazakova, S. V., Sambol, S. P., Johnson, S., Gerding, D. N. (2005). An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. *N Engl J Med*, 353, 2433-2441. DOI: 10.1056/NEJMoa051590

- McGlone, S. M., Bailey, R. R., Zimmer, S. M., Popovich, M. J., Tian, Y., Ufberg, P., ... Lee, B. Y. (2012). The economic burden of *Clostridium difficile*. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 18(3), 282–289. DOI:10.1111/j.1469-0691.2011.03571.x
- Metcalf, D., Sharif, S., & Weese, J. S. (2010). Evaluation of candidate reference genes in *Clostridium difficile* for gene expression normalization. *Anaerobe*, 16(4), 439-443. DOI:10.1016/j.anaerobe.2010.06.007
- Meyer, S. M., Espinoza, A. R., Quera, P. R. (2014). INFECCIÓN POR *Clostridium difficile*: EPIDEMIOLOGÍA, DIAGNÓSTICO Y ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS. *REV. MED. CLIN. CONDES*, 25(3), 473-484. DOI: 10.1016/S0716-8640(14)70064-1
- Miller, M., Gravel, D., Mulvey, M., Taylor, G., Boyd, D., Simor, A., . . . Kelly, S. (2010). Health care-associated *Clostridium difficile* infection in Canada: patient age and infecting strain type are highly predictive of severe outcome and mortality. *Clin Infect Dis*, 50(2), 194-201. DOI:10.1086/649213
- Monot, M., Boursaux-Eude, C., Thibonnier, M., Vallenet, D., Moszer, I., Medigue, C., . . . Dupuy, B. (2011). Reannotation of the genome sequence of *Clostridium difficile* strain 630. *J Med Microbiol*, 60(8), 1193-1199. DOI:10.1099/jmm.0.030452-0
- Monot, M., Eckert, C., Lemire, A., Hamiot, A., Dubois, T., Tessier, C., . . . Dupuy, B. (2015). *Clostridium difficile*: New Insights into the Evolution of the Pathogenicity Locus. *Sci Rep*, 5, 15023. DOI:10.1038/srep15023
- Morfin-Otero, R., Garza-Gonzalez, E., Aguirre-Diaz, S. A., Escobedo-Sanchez, R., Esparza-Ahumada, S., Perez-Gomez, H. R., . . . Hospital Civil de Guadalajara, F. A. A. C. d. T. (2016). *Clostridium difficile* outbreak caused by NAP1/BI/027 strain and non-027 strains in a Mexican hospital. *Braz J Infect Dis*, 20(1), 8-13. DOI:10.1016/j.bjid.2015.09.008
- Morioka, H., Iguchi, M., Kuzuya, T., Mikamo, H., & Yagi, T. (2017). Recurrent bacteremia and liver abscess caused by *Clostridium difficile*: A case report. *Medicine (Baltimore)*, 96(35), e7969. DOI:10.1097/MD.0000000000007969
- Mullany, P., Roberts, A. P. (2016). *Clostridium difficile*: Methods and Protocols. (2<sup>a</sup> ed.) New York: Humana Press. DOI: 10.1007/978-1-4939-6361-4
- Nölke T., Schwan C., Lehmann F., Østevold K., Pertz O., Aktories K. (2016). Septins guide microtubule protrusions induced by actin-depolymerizing toxins like *Clostridium difficile* transferase (CDT). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, 7870–7875. DOI: 10.1073/pnas.1522717113
- Ochoa-Hein, E., Sifuentes-Osornio, J., Ponce de Leon-Garduno, A., Torres-Gonzalez, P., Granados-Garcia, V., & Galindo-Fraga, A. (2018). Factors associated with an outbreak of hospital-onset, healthcare facility-associated *Clostridium difficile* infection (HO-HCFA CDI) in a Mexican tertiary care hospital: A case-control study. *PLoS One*, 13(5), e0198212. DOI:10.1371/journal.pone.0198212
- Orrell, K. E., Zhang, Z., Sugiman-Marangos, S. N., & Melnyk, R. A. (2017). *Clostridium difficile* toxins A and B: Receptors, pores, and translocation into cells. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 52(4), 461-473. DOI:10.1080/10409238.2017.1325831
- Orth, P., Xiao, L., Hernandez, L. D., Reichert, P., Sheth, P. R., Beaumont, M., . . . Therien, A. G. (2014). Mechanism of action and epitopes of *Clostridium difficile* toxin B-neutralizing antibody bezlotoxumab revealed by X-ray crystallography. *J Biol Chem*, 289(26), 18008-18021. DOI:10.1074/jbc.M114.560748



- Paltansing, S., van den Berg, R. J., Guseinova, R. A., Visser, C. E., van der Vorm, E. R., & Kuijper, E. J. (2007). Characteristics and incidence of *Clostridium difficile*-associated disease in The Netherlands, 2005. *Clin Microbiol Infect*, 13(11), 1058-1064. DOI:10.1111/j.1469-0691.2007.01793.x
- Pant, C., Sferra, T.J., Ondrade, C., Bass, P.F., Deshpande, A., Burton, C.V. (2011). Serum markers for severe *Clostridium difficile* infection in immunosuppressed hospitalized patients. *J La State Med Soc*, 163(2), 91-4.
- Papatheodorou, P., Zamboglou, C., Genisyuerek, S., Guttenberg, G., & Aktories, K. (2010). *Clostridial* glucosylating toxins enter cells via clathrin-mediated endocytosis. *PloS one*, 5(5), e10673. DOI:10.1371/journal.pone.0010673
- Peng, Z., Ling, L., Stratton, C. W., Li, C., Polage, C. R., Wu, B., & Tang, Y. W. (2018). Advances in the diagnosis and treatment of *Clostridium difficile* infections. *Emerg Microbes Infect*, 7(1), 15. DOI:10.1038/s41426-017-0019-4
- Persson, S., Torpdahl, M., & Olsen, K. E. P. (2008). New multiplex PCR method for the detection of *Clostridium difficile* toxin A (*tcdA*) and toxin B (*tcdB*) and the binary toxin (*cdtA/cdtB*) genes applied to a Danish strain collection. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(11), 1057-1064. DOI:10.1111/j.1469-0691.2008.02092.x
- Pituch, H., Rupnik, M., Obuch-Woszczatynski, P., Grubescic, A., Meisel-Mikolajczyk, F., & Luczak, M. (2005). Detection of binary-toxin genes (*cdtA* and *cdtB*) among *Clostridium difficile* strains isolated from patients with *C. difficile*-associated diarrhoea (CDAD) in Poland. *J Med Microbiol*, 54(Pt 2), 143-147. DOI:10.1099/jmm.0.45799-0
- Portillo-Lopez, M. I., Castellanos-Urdaibay, M. A., Cortes-Nava, E., & Chiprut, R. (2002). [*Clostridium difficile* infection]. *Gac Med Mex*, 138(1), 57-66.
- Poutanen, S. M., & Simor, A. E. (2004). *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults. *CMAJ*, 171(1), 51-58. DOI:10.1503/cmaj.1031189
- Purcell, E. B., Mckee, R. W., McBride, S. M., Waters, C. M., & Tamayo, R. (2012). Cyclic Diguanylate Inversely Regulates Motility and Aggregation in *Clostridium difficile*. *Journal of Bacteriology*, 194(13), 3307-3316. DOI:10.1128/Jb.00100-12
- Ramirez-Rosales, A., & Cantu-Llanos, E. (2012). [Intrahospital mortality in patients with *Clostridium difficile*-associated diarrhea infection]. *Rev Gastroenterol Mex*, 77(2), 60-65. DOI:10.1016/j.rgmx.2012.04.001
- Remes-Troche, J. M. (2012). [*Clostridium difficile*-associated diarrhea infection: is it time for us to start worrying in Mexico?]. *Rev Gastroenterol Mex*, 77(2), 58-59. DOI:10.1016/j.rgmx.2012.04.003
- Rinttila, T., Kassinen, A., Malinen, E., Krogius, L., & Palva, A. (2004). Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *J Appl Microbiol*, 97(6), 1166-1177. DOI:10.1111/j.1365-2672.2004.02409.x
- Rodriguez-Pardo, D., Mirelis, B., & Navarro, F. (2013). [Infections caused by *Clostridium difficile*]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 31(4), 254-263. DOI:10.1016/j.eimc.2012.12.010
- Rupnik, M. (2008). Heterogeneity of large *clostridial* toxins: importance of *Clostridium difficile* toxinotypes. *FEMS Microbiol Rev*, 32(3), 541-555. DOI:10.1111/j.1574-6976.2008.00110.x
- Rupnik, M., & Janezic, S. (2016). An Update on *Clostridium difficile* Toxinotyping. *J Clin Microbiol*, 54(1), 13-18. DOI:10.1128/JCM.02083-15

- Rupnik, M., Brazier, J. S., Duerden, B. I., Grabnar, M., & Stubbs, S. L. (2001). Comparison of toxinotyping and PCR ribotyping of *Clostridium difficile* strains and description of novel toxinotypes. *Microbiology*, 147(2), 439-447. DOI:10.1099/00221287-147-2-439.
- Rupnik, M., Wilcox, M. H., & Gerding, D. N. (2009). *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol*, 7(7), 526-536. DOI:10.1038/nrmicro2164
- Sabah, T. S. DIARREA ASOCIADA A ANTIBIÓTICOS. (2015). REV. MED. CLIN. CONDES, 26(5), 687-695. DOI: 10.1016/j.rmclc.2015.09.011
- Salazar, G. C. L. (2013). Bacterias anaerobias. *Hechos Microbiol*, 4(1), 56-60.
- Samie, A., Obi, C. L., Franasiak, J., Archbald-Pannone, L., Bessong, P. O., Alcantara-Warren, C., & Guerrant, R. L. (2008). PCR detection of *Clostridium difficile* triose phosphate isomerase (*tpi*), toxin A (*tcdA*), toxin B (*tcdB*), binary toxin (*cdtA*, *cdtB*), and *tcdC* genes in Vhembe District, South Africa. *Am J Trop Med Hyg*, 78(4), 577-585.
- Sandhu, B. K., & McBride, S. M. (2018). *Clostridioides difficile*. *Trends Microbiol*, 26(12), 1049-1050. DOI:10.1016/j.tim.2018.09.004
- Schneeberg, A., Ehricht, R., Slickers, P., Baier, V., Neubauer, H., Zimmermann, S., . . . Seyboldt, C. (2015). DNA microarray-based PCR ribotyping of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol*, 53(2), 433-442. DOI:10.1128/JCM.02524-14
- Schneeberg, A., Neubauer, H., Schmoock, G., Grossmann, E., & Seyboldt, C. (2013). Presence of *Clostridium difficile* PCR ribotype clusters related to 033, 078 and 045 in diarrhoeic calves in Germany. *J Med Microbiol*, 62(Pt 8), 1190-1198. DOI:10.1099/jmm.0.056473-0
- Schwan, C., Kruppke, A. S., Nölke, T., Schumacher, L., Koch-Nolte, F., Kudryashev, M., ... Aktories, K. (2014). *Clostridium difficile* toxin CDT hijacks microtubule organization and reroutes vesicle traffic to increase pathogen adherence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(6), 2313–2318. DOI:10.1073/pnas.1311589111
- Schwan, C., Stecher, B., Tzivelekidis, T., van Ham, M., Rohde, M., Hardt, W. D., ... Aktories, K. (2009). *Clostridium difficile* toxin CDT induces formation of microtubule-based protrusions and increases adherence of bacteria. *PLoS pathogens*, 5(10), e1000626. DOI:10.1371/journal.ppat.1000626
- Schwan, C., Stecher, B., Tzivelekidis, T., van Ham, M., Rohde, M., Hardt, W. D., ... Aktories, K. (2009). *Clostridium difficile* toxin CDT induces formation of microtubule-based protrusions and increases adherence of bacteria. *PLoS pathogens*, 5(10), e1000626. DOI:10.1371/journal.ppat.1000626
- Semenyuk, E. G., Laning, M. L., Foley, J., Johnston, P. F., Knight, K. L., Gerding, D. N., & Driks, A. (2014). Spore formation and toxin production in *Clostridium difficile* biofilms. *PloS one*, 9(1), e87757. DOI:10.1371/journal.pone.0087757
- Shin, B. M., & Lee, E. J. (2014). Comparison of ChromID agar and *Clostridium difficile* selective agar for effective isolation of *C. difficile* from stool specimens. *Annals of laboratory medicine*, 34(1), 15–19. DOI:10.3343/alm.2014.34.1.15
- Simor, A. E. (2010). Diagnosis, management, and prevention of *Clostridium difficile* infection in long-term care facilities: a review. *J Am Geriatr Soc*, 58(8), 1556-64. DOI: 10.1111/j.1532-5415.2010.02958.x.
- Smits, W. K., Lyras, D., Lacy, D. B., Wilcox, M. H., & Kuijper, E. J. (2016). *Clostridium difficile* infection. *Nature reviews. Disease primers*, 2, 16020. DOI:10.1038/nrdp.2016.20

- Sorg, J. A., & Dineen, S. S. (2009). Laboratory maintenance of *Clostridium difficile*. *Curr Protoc Microbiol*, Chapter 9, Unit9A 1. DOI:10.1002/9780471729259.mc09a01s12
- Stabler, R. A., He, M., Dawson, L., Martin, M., Valiente, E., Corton, C., . . . Wren, B. W. (2009). Comparative genome and phenotypic analysis of *Clostridium difficile* 027 strains provides insight into the evolution of a hypervirulent bacterium. *Genome Biol*, 10(9), R102. DOI:10.1186/gb-2009-10-9-r102
- Stahlmann, J., Schonberg, M., Herrmann, M., & von Muller, L. (2014). Detection of nosocomial *Clostridium difficile* infections with toxigenic strains despite negative toxin A and B testing on stool samples. *Clin Microbiol Infect*, 20(9), O590-592. DOI:10.1111/1469-0691.12558
- Sun, X., Savidge, T., & Feng, H. (2010). The enterotoxicity of *Clostridium difficile* toxins. *Toxins (Basel)*, 2(7), 1848-1880. DOI:10.3390/toxins2071848
- Tamez-Torres, K. M., Torres-Gonzalez, P., Leal-Vega, F., Garcia-Alderete, A., Lopez Garcia, N. I., Mendoza-Aguilar, R., . . . Sifuentes-Osornio, J. (2017). Impact of *Clostridium difficile* infection caused by the NAP1/RT027 strain on severity and recurrence during an outbreak and transition to endemicity in a Mexican tertiary care center. *Int J Infect Dis*, 65, 44-49. DOI:10.1016/j.ijid.2017.09.022
- Tao, L., Zhang, J., Meraner, P., Tovaglieri, A., Wu, X., Gerhard, R., . . . Dong, M. (2016). Frizzled proteins are colonic epithelial receptors for *C. difficile* toxin B. *Nature*, 538(7625), 350–355. DOI:10.1038/nature19799
- Tasteyre, A., Barc, M. C., Collignon, A., Boureau, H., & Karjalainen, T. (2001). Role of FliC and FliD flagellar proteins of *Clostridium difficile* in adherence and gut colonization. *Infection and Immunity*, 69(12), 7937-7940. DOI:10.1128/iai.69.12.7937-7940.2001
- Tasteyre, A., Karjalainen, T., Avesani, V., Delmee, M., Collignon, A., Bourlioux, P., & Barc, M. C. (2000). Phenotypic and genotypic diversity of the flagellin gene (fliC) among *Clostridium difficile* isolates from different serogroups. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(9), 3179-3186.
- Tenover, F. C., Baron, E. J., Peterson, L. R., & Persing, D. H. (2011). Laboratory Diagnosis of *Clostridium difficile* Infection Can Molecular Amplification Methods Move Us Out of Uncertainty? *Journal of Molecular Diagnostics*, 13(6), 573-582. DOI:10.1016/j.jmoldx.2011.06.001
- Torres, J. F., Cedillo, R., Sanchez, J., Dillman, C., Giono, S., & Munoz, O. (1984). Prevalence of *Clostridium difficile* and its cytotoxin in infants in Mexico. *J Clin Microbiol*, 20(2), 274-275.
- Truong, C., Schroeder, L. F., Gaur, R., Anikst, V. E., Komo, I., Watters, C., . . . Banaei, N. (2017). *Clostridium difficile* rates in asymptomatic and symptomatic hospitalized patients using nucleic acid testing. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 87(4), 365-370. DOI:10.1016/j.diagmicrobio.2016.12.014
- Vaustat, D., & Rollet, R. (2018). [Glutamate dehydrogenase. Its diagnostic value in *Clostridioides difficile* diarrhea]. *Rev Argent Microbiol*, 50(3), 264-268. DOI:10.1016/j.ram.2017.08.006
- Visa, N., & Percipalle, P. (2010). Nuclear functions of actin. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(4), a000620. DOI:10.1101/cshperspect.a000620
- Voth, D. E., & Ballard, J. D. (2005). *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. *Clin Microbiol Rev*, 18(2), 247-263. DOI:10.1128/CMR.18.2.247-263.2005
- Waligora, A. J., Hennequin, C., Mullany, P., Bourlioux, P., Collignon, A., & Karjalainen, T. (2001). Characterization of a cell surface protein of *Clostridium difficile* with adhesive properties. *Infection and Immunity*, 69(4), 2144-2153. DOI:10.1128/IAI.69.4.2144-2153.2001

- Wenisch, J. M., Schmid, D., Kuo, H. W., Simons, E., Allerberger, F., Michl, V., . . . Wenisch, C. (2012). Hospital-acquired *Clostridium difficile* infection: determinants for severe disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 31(8), 1923-1930. DOI:10.1007/s10096-011-1522-5
- Wiley, J., Ltd, S. (2014). Faecal microbiota transplantation for *Clostridium difficile* infection. *Int J Clin Pract*, March,68(3), 363–368. DOI: 10.1111/ijcp.12320
- Yang, Z., Zhang, Y., Huang, T., & Feng, H. (2015). Glucosyltransferase activity of *Clostridium difficile* Toxin B is essential for disease pathogenesis. *Gut Microbes*, 6(4), 221-224. DOI:10.1080/19490976.2015.1062965
- Yuan, P., Zhang, H., Cai, C., Zhu, S., Zhou, Y., Yang, X., ... Wei, W. (2015). Chondroitin sulfate proteoglycan 4 functions as the cellular receptor for *Clostridium difficile* toxin B. *Cell research*, 25(2), 157–168. DOI:10.1038/cr.2014.169
- Zea, J. W., Salazar, C. L. (2012). Enfermedad asociada a *Clostridium difficile*: prevalencia y diagnóstico por laboratorio. *Infectio*, 16(4), 211–222. DOI: 10.1016/S0123-9392(12)70016-4
- Zhanel, G. G., Walkty, A. J., & Karlowsky, J. A. (2015). Fidaxomicin: A novel agent for the treatment of *Clostridium difficile* infection. *Can J Infect Dis Med Microbiol*, 26(6), 305-312. DOI:10.1155/2015/934594
- Zimbro, J. M., Power, A.D., Miller, M.S., Wilson, E. G., Johnson, A. J. (2009). Difco™ & BBL™ Manual: Manual of Microbiological Culture Media. (2<sup>a</sup> ed.) United States of America: Becton, Dickinson and Company. DOI: 10.1016/0005-2787(72)90426-1

## 13. Anexos

### 13.1 CCFA-TC

Fórmula para 1L

Peptona de caseína.....	25g
Extracto de levadura.....	15g
Agar.....	15g
Fosfato de sodio dibásico.....	5g
Fructosa.....	6g
Sulfato de magnesio.....	0.1g
Fosfato de potasio monobásico.....	1g
Cloruro de sodio.....	2g
Rojo neutro.....	0.03g
Glucosa.....	1g
Taurocolato.....	1g
Hemina.....	0.01g
Cicloserina.....	0.5g
Cefoxitina.....	16µl del stock

Pesar cada uno de los componentes del medio, mezclar con agua tridestilada y ajustar el pH a 7.3, esterilizar a 15 Lb por 15 minutos, dejar enfriar (tolerable al dorso de la mano) y agregar los antibióticos, homogenizar y verter en placas de 60×15 mm (aproximadamente 12 ml para cada placa).

### 13.2 Stock Cefoxitina

40mg..... 1ml agua tridestilada estéril.

### 13.3 GES (Guanidine-EDTA-Sarkosyl)

Para un volumen de 25 ml

Cloruro de guanidinio (5.02M).....	12g
EDTA (0.2M pH 8).....	12.5ml
Sarkosyl al 201%.....	1.25ml
Agua tridestilada estéril.....	3.5ml

Pesar los 12g de Cloruro de guanidinio en un tubo Falcon y agregarle los 12.5ml de EDTA, poner en agitación a 37°C hasta que la mezcla se torne transparente, agregar el Sarkosyl y el Agua tridestilada estéril, mezclar y cubrir el tubo con papel aluminio, se puede almacenar a temperatura ambiente.

### **13.4 BHI suplementado**

Fórmula para 1L

BHI.....37g

Extracto de levadura.....5g

Agar.....15g

Taurocolato.....0.1% en un volumen final

Pesar cada uno de los componentes del medio, mezclar con agua tridestilada y esterilizar a 15 Lb por 15 minutos.

### **13.5 Caldo BHI**

Fórmula para 1L de medio

BHI.....37g

En tubos pequeños (tapa de rosca) con un volumen de 3ml de caldo cada uno.

### **13.6 Tinción de Gram**

#### **Cristal violeta.**

Cristal violeta..... 0.5g

Agua destilada..... 50ml

Preparación:

Disolver el colorante en agua tridestilada estéril.

#### **Safranina.**

Safranina..... 0.25g

Agua destilada..... 50ml.

Preparación:

Disolver el colorante en agua tridestilada estéril.

**Alcohol acetona.** Para un volumen de 10ml.

Etanol 95%..... 7.5ml.

Acetona..... 2.5ml.

Preparación: Mezclar los ingredientes respectivos de cada combinación para su uso.

### Solución de yodo yodurado (Lugol) al 20%.

Lugol concentrado..... 2ml

Agua tridestilada estéril..... 8ml

Para un volumen de 10ml.

### 13.7 Preparación de Oligos a 10 $\mu$ M

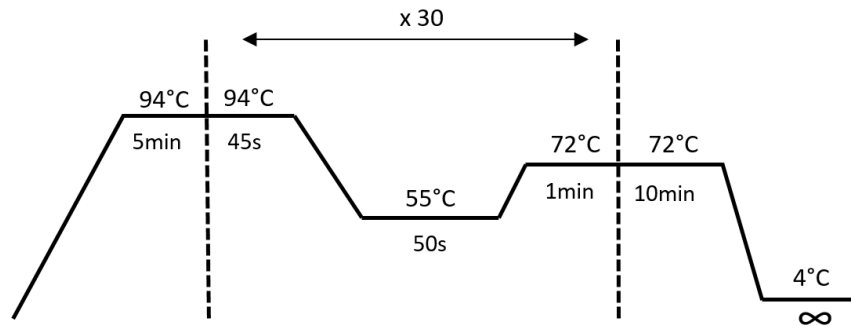
Clave	Gen	Primer	Agua	Oligos	Concentración oligos ( $\mu$ M)	Tamaño del amplicón (pb)
4597	16S rRNA	<i>CD16F</i>	92.7 $\mu$ l	7.3 $\mu$ l	10	1062
4598		<i>CD16R</i>	95.1 $\mu$ l	4.9 $\mu$ l	10	
3440	<i>tpi</i>	<i>tpiF</i>	96.2 $\mu$ l	3.8 $\mu$ l	10	230
3441		<i>tpiR</i>	96.2 $\mu$ l	3.8 $\mu$ l	10	
4589	<i>tcdA</i>	<i>tcdAF</i>	93.4 $\mu$ l	6.6 $\mu$ l	10	629
4590		<i>tcdAR</i>	93.6 $\mu$ l	6.4 $\mu$ l	10	
4591	<i>tcdB</i>	<i>tcdBF</i>	92.9 $\mu$ l	7.1 $\mu$ l	10	410
4592		<i>tcdBR</i>	93.8 $\mu$ l	6.2 $\mu$ l	10	
4593	<i>cdtA</i>	<i>cdtAF</i>	95.5 $\mu$ l	4.5 $\mu$ l	10	221
4594		<i>cdtAR</i>	93.8 $\mu$ l	6.2 $\mu$ l	10	
4595	<i>cdtB</i>	<i>cdtBF</i>	94.5 $\mu$ l	5.5 $\mu$ l	10	262
4596		<i>cdtBR</i>	92.2 $\mu$ l	7.8 $\mu$ l	10	

### 13.8 Reactivos de PCR

Reactivos	<i>tcdA</i>	<i>tcdB</i>	<i>cdtA</i>	<i>cdtB</i>	<i>tpi</i>	16S rRNA
H <sub>2</sub> O	7.95 $\mu$ l	8.95 $\mu$ l	7.95 $\mu$ l	8.95 $\mu$ l	8.95 $\mu$ l	7.95 $\mu$ l
Buffer/MgCl <sub>2</sub>	1.25 $\mu$ l	1.25 $\mu$ l	1.25 $\mu$ l	1.25 $\mu$ l	1.25 $\mu$ l	1.25 $\mu$ l
dNTPs	0.2 $\mu$ l	0.2 $\mu$ l	0.2 $\mu$ l	0.2 $\mu$ l	0.2 $\mu$ l	0.2 $\mu$ l
Oligo F	1 $\mu$ l	0.5 $\mu$ l	1 $\mu$ l	0.5 $\mu$ l	0.5 $\mu$ l	1 $\mu$ l
Oligo R	1 $\mu$ l	0.5 $\mu$ l	1 $\mu$ l	0.5 $\mu$ l	0.5 $\mu$ l	1 $\mu$ l
Dream Taq	0.1 $\mu$ l	0.1 $\mu$ l	0.1 $\mu$ l	0.1 $\mu$ l	0.1 $\mu$ l	0.1 $\mu$ l
DNA	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
Total	12.5 $\mu$ l	12.5 $\mu$ l	12.5 $\mu$ l	12.5 $\mu$ l	12.5 $\mu$ l	12.5 $\mu$ l

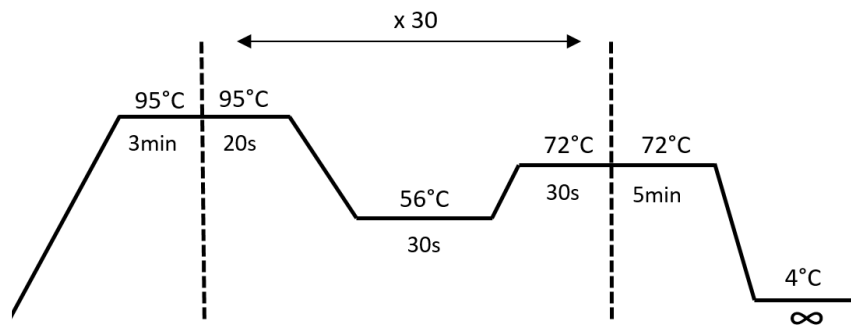
## 13.8 Condiciones de PCR

*tcdA*, *tcdB*, *cdtA*, *cdtB* y *16s rRNA*



2 horas 13 minutos

*tpi*



1 hora 27 minutos





				TGTGCGGGTCCCCGTAATTCTTGAAGTTTAACTTTGCGACC GTACTCCCAGGCGGAATACTTAATGCGTTAGCGCGGCAACGG AGGTGTTGAAACCCACACCTAGTATTCATCGTTTACGGCGGT GACTACCAAGGTATCTAATCCTGTTGCTCCACAGCTTTCRAG CCTGACCGTCAAGTACACTCCAGAGTCTTGGCACTGG TGTTCTCTAATCTCTACCGATTTCCAGCTACACTAGGAATTC CACTCTCTCTCTGCACTAGATAACCACTTTGGAATCGAGC ACCAAGTTGAGCCGGGTATTACATCCCACTTAATCATCCG CCTACGCTCCCTTACGCCAGTAATCCGGATAACGCTCCGC ACCTACGTATTACCGGGCTGTGGCACGTAGTTAGCCGTGGC TTCTCCTTGGGTACCGTCAATATCTCCCAAGACAGAGCTT TAGATCCGAAAACCTTCACTCACTCACGGCGGTTGTGCAT CAAGGTTTCCCCATTGTMATATCCCCACTGCTGCCTYCAA GAAG			GTAGGTAAGGTTCTTCGCGTGTCTCRAATTAACA CATGCTCCGCTACTTGTGCGGGTCCCCGTAATTCTCT TTGAGTTTAACTTTCGCAACCTACTCCCAAGCGGA ATACTTAATGCTTAGCGCGGCAAGGAGGTGTGA AACCCCAACACTAGTATTCATCGTTTACGGCGTGA CTACCAGGTTACTAATCTCTGTTGCTCCCAAGCTT TCRAGCCTCAGCGTCACTACAGTCCAGAGAGTGC CTTGCCCACTGTGTTCTCTAATCTCACTGATTC ACCGCTACACTAGGAATTCACCTCTCTCTCTGCA TCTAGATAACCAAGTTGGAATCGAGCAACCAAGTTGA GCCCGGTTATTCACATCCCACTTAATCATCCGCTA CGCTCCCTTACGCCAGTAATCCGGATAACCGCTG CCACTACGTATTACCGCGGCTTACCGCGTATGTT AGCCGTGGCTTCTCTCTGTTAGCCGCTTATCTTC CCCAAGACAGAGCTTTA	
6069.CPN4 Fab1.ab1	CPN4-F	Cd06(4)	320	AACAATCCAGACTAGAGGCCAACCCCGTGAGTGARATKG CTTTGGGTGTAATACTCTGTTGWWGGAAGAATGGKCTCG AGAGTAACCTGTTGTCGGCGTACCGGTATCCATCCAGAAAGCCA CKGCTAACACTAGTCCCAKAGCCGGGTAATACGTAGTGGCA AGCGTTATCCGGATTATGKSCGTAAGCGAKCGCAGGCGGT TTTTTAACCTGATGTAAGACTCTCGGCTTACCGAGGAAGTG CATCCGAAACTGGRAACTTGASTGWAARAGGACAGTGAAC TCCATGTGWWGCGKGA	<b>Lactobacillus sp.</b>	-	-	-
6070.CPN5 Fab1.ab1	CPN5-F	Cd08(3)	354	TGGGGGGGCGCTGATGCCRTGCGCGGTGTGTAAGAAGS CCTSGGGTSSWAAACASYTTTCCAGCGCAGGGGACTG TCCTGCAAGAACRGCCCGGCTAATACSMGCCAAGAGCC CGGTTATACGTAGCCGCGAGTGTATCCGGATTATTGGGCG TAAAGGGCGCTAGGCTGCGGCAAGCCGGGGTTCGAGCG GGGGCTCAACCCCGAAGCCCGGAACCTCCCGGTTTG CGTCCGGTGGGAGGTTGGAACMCCCGGTGASCCTGGAAT GCKMATATCGCGTGAACCCCGTSGAWTTSGCCCTCG GTCCGATACCRACGCTRA	<b>Collinsella sp.</b>	-	-	-
6752.CPN5 Rab1.ab1	CPN5-R	Cd08(3)	1000	CGCAAGTTCTAMKGSATGCTSGTCCRCGATTACTAGCGGTCK ACTTCTGSSAGCTGGGSRRCGCTGCGGGCGG GCTTTGCTGGTCCCGCTCCCGCTGKCGSKYKSWTCCCTCT GACCGGYCATGGYASGMCGYGTGCCCGCAGGGGATGMGG GYATGATGACTTGACGTCGKCCSCCTCTGTCSCGTTGAGC GGGGGGCGCGGGGSGKTCGGCGTCAACGSAATGGCAA CMKYRKGGGGGTGGCGTGGTGGCGGACTTAAACCAACA TCTACRACRAGCTGACGGRCATGSAACAGGTATGCGG CTCTCTCGGCCACGGGCTCTCCCGCTTACCATATGTCA RGCCTGTGTAAGTCTTTCGCGTGTCTGCAATTAAGCCACAT GCTCCGCTGCTTGGCGGCCCGCTCAATTCCTTGAATTTT AGCCTTGGCGGCTACTCCCAAGCGGGACGCTTAATGCGTT GGCTCGCGCAGGGGGGATCGTCCCGCCACACTAGCGTCCA TCGTTTACGGCTGGGACTACAGGGTATCTAATCCTGTTGCTC CCCCAGCTTTCGCGCTCAGCGTGGTCTCGGCCACAGAGGC CGCCTTCCGACCGGTTTCCACCCGATATCTGCGCATTCAC CGCTACACCGGTTTCCACCCCTCCCTACCGGACCAAGCC GCGGAGGTTCCGGGGGCTTCCGGGGTGGAGCCCGCGCTT GACCCCGGCTGCGGGGCGCTACCGCGCTTACGCCCA ATGAATCCGATAACGCTCGCCCTACGTTATACCGCGGTG CTGGCACGTAGTTAGCCGGGCTTCTTCTGACGTTACAGTCTT GACTCTTCCCTGCTGAAAGCGGTTACGACCCGAAGGCTCCG TCCCGCACCGCGCTGCTGCTGAGGTTCCCGCCATTGGC CAAGATTCCCMCYTGTGCTCCA	<b>Collinsella sp.</b>	30-929	900	<b>Collinsella sp.</b>  Identities 93.51%
6071.CPN6 Fab1.ab1	CPN6-F	Cd010(4)	472	CKGGGGACCTGAYGCGACCGCGTGAGTGATGAGGTTT TCGGATCTAAARCTCTGTGTTGGGAGACAGGACGGTACC CAACTGAACTCCCTGACCGYAACTAACCMGAAGRCGCT AACTACGTGCCSAGCKCGTAATCTTCTTGGCRAGCGT TGCCGGATTTATGGGCGTAAAGCGAGCGCAGCGGYTTCTT AAGTCTGATGTGAAGCCCGCTCAACCGGGAGGTCATT GAAACTGGGAGAMTTGAGTGCRTAASAGARAGTGAATTC ATGTGAGCGGTGAAATGCGTARATATGGAAGAACACCACT GGGGAAGCGGCTCTGCTGCTRACTGACGCTGAGGCTCG AAAGCGTGGGAGCAMACAGGATTAGATACCCTGGTGTCCA CKCCYAAACRATGASTGCTMARTGTTGGAGGKTTCCGCCCT TC	<b>Enterococcus sp.</b>	-	-	-
6072.CPN7 Fab1.ab1	CPN7-F	Cd011(2)	519	TGCSARGCCTGATGACGCCATGCCGCTGTGTAAGAAGGC CTTCGRTTGAAGCWCTTYYKYRAAGAGGAGGGGACGAR STTAAACTGAACRTCCCTGACCGTATCTAAMCARAAAGCC GGCTAACTMCGTGCCAGCAGCCGCGTAAACGKAGKKGCA AGCGTTGTYCGGAWTTATTGGGCGYAAAGCGMGCCGAGCGG TTTTAAGTCTGATGTGAAGCCCGGCTCAACCKGGGAGG GKMTTGGAACTGGGAGACTGAGTGCMAAGAGGAGAGTG GAATCCATGTAKCGGTGAAATGCGTRATATWTGGAGAA CACCMGTGGCGAAGGCGGCTCYCTGGTCTGTAAGTACGCTG AGGCTCAAAGCGTGTGGAGCAAACMGATTARATACCGTGG WAGTCCAGCCCTCAACGATGAYTGTACTWGTGTTGAGGGY TCCGCCCTCAKTGKTGCAWMAACCCMTTAAKACCCCGCT GGGSKCC	<b>Serratia sp.</b>	-	-	-
6753.CPN7 Rab1.ab1	CPN7-R	Cd011(2)	1035	GSAAGTTCGCGGGCGTGTGRTCCGCTACTAGCGRTTCCG GCTTCATGACAGGAGTGTGAGCCTGCRWTCGAACTGAGAG AAGCTTAAAGAGATTGCRGASCTCGCGTCTASCGACTCGK GTACTTCCATTGTAGCAGCGGTGAGSACAGGTCATAGGGG	<b>Enterococcus sp.</b>	20-869		<b>Enterococcus sp.</b>

				CAKGAAGATTGACGTCWTCGCCACCTTCTCCGGTTKGTGAC CGGCAGTGCAGGTAGAGTGCCCAACTAAATGATGGCAACTAAC AATAAGGGTGGGCTGGTGGCGGACTTAAACGARCATCTCAC GAGCGAGGCTGACGACRACCATGCRCCACTGTCACTTGGTCC CCGAAAGGAAAGTCTACCTGAGAGTGGYCAAGCATGGCAG GACCTGTAAGTTCCTCGCTTCTGTAATTAACACACATGC TCCACCGTTGCGGGGCCCGCTCAATCTTGAAGTTTCAA CCTTGGGCTGACTCCCGAGGCGAGTGTCTAATGCGTTTGC TGACGACTGAAGGGCGGAAACCTCCAACTTAGCACTCAT CGTTTACGGCGTGGACTACCGGGTATCTAATCTGTTTGTCC CCAGCTTTGAGCGCTCAGCGTCAAGTACAGACCARAGAGCCG CCTTCCGCACTGGTCTTCCATATATCTACGCACTTACCAGC TACACATGGAATTCACCTCTCTCTTGCACCTAAGTCTCCCA GTTTCCAATGACCTCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATC AGACTAAGAAACCCTGCGCTGCTTACGCCAATAAATCC GGACAACGCTTCCACCTACGATTAACCGCGGCTGTGGCAGC TAGTTAGCCGTGGCTTTGTTAGATACCGTACGGGGACGTT CARTTACTAACGCTCTTCTCTCTAACGACAGAGTTTACAA TCCGAAACCTTCTCACTACCGCMGTTGTCGCTCAGACTTT CGTCCATTGCCRAAATYCCCMKKGCTGCTYMAAGG	Identities 92.09%	850	TAAGGGCAKGAAGATTGACGTCWTCGCCACCTTCTCCGGTTKGTGAC CGGCAGTGCAGGTAGAGTGCCCAACTAAATGATGGCAACTAAC AACTAAATGATGGCACTAAACATAAGGGTGGGCTC GTTCCGGGACTTAAACGARCATCTCACGACCGGAC TGACGACRACCATGCRCCACTGTCACTTGGTCC GAAGGAAAGYCTACCTGAGAGTGGYCAAGCATGGCAG GGCAGGCTGTAAGTTCCTCGCTTCTGTAATTAACACACATGC TCCACCGTTGCGGGGCCCGCTCAATCTTGAAGTTTCAA CCTTGGGCTGACTCCCGAGGCGAGTGTCTAATGCGTTTGC TGACGACTGAAGGGCGGAAACCTCCAACTTAGCACTCAT CGTTTACGGCGTGGACTACCGGGTATCTAATCTGTTTGTCC CCAGCTTTGAGCGCTCAGCGTCAAGTACAGACCARAGAGCCG CCTTCCGCACTGGTCTTCCATATATCTACGCACTTACCAGC TACACATGGAATTCACCTCTCTCTTGCACCTAAGTCTCCCA GTTTCCAATGACCTCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATC AGACTAAGAAACCCTGCGCTGCTTACGCCAATAAATCC GGACAACGCTTCCACCTACGATTAACCGCGGCTGTGGCAGC TAGTTAGCCGTGGCTTTGTTAGATACCGTACGGGGACGTT CARTTACTAACGCTCTTCTCTCTAACGACAGAGTTTACAA TCCGAAACCTTCTCACTACCGCMGTTGTCGCTCAGACTTT CGTCCATTGCCRAAATYCCCMKKGCTGCTYMAAGG	Identities 96.11%
6073.CPN8 Fab1.ab1	CPN8-F	Cd012(2)	97	CKKCSMAGCCYKRWVGCAGCMTCGCCGCTGWGTGAAGAAG GCTTCCGGGTGTAAAGCTCTKTCGWYASGSSGAAGGGCK GMACARWAWCYGTT	Error	-	-	-
6754.CPN8 Rab1.ab1	CPN8-R	Cd012(2)	798	GSAAATMTGCGGCTGCTGRTCSGCGATTACTAGCGRTTCCG ACTTGTGAGGCGAGTKGAGSCTACRGTCCGAAGTGAAGA GGCTTAAAGATTRGCTTACCTCGCGGTCTCGARCTCGKT GTACCRCTCAATGTAGCAGCGGTGTAGSCAGGTCATAAGGGG CATGAKGATTGACGTATGCCCACTTCTCCGGTTTGTGRCC GGCAGTCGTAGTGGGTGSCCACTAAATGCTGGCACTAGTC ATAAGGGTGGGCTGTTGCGGACTTAAACCACGCTCAGC AGCGAGCTGACGACRAGCWTGCGCCACTGTWTTTTGCC CCGAAAGGGAAACCKGAKSTCKCAGGTGATCAAAASATGGCAG GACYTGGTAAGGTTCTGGGCTGCTTGCAGTGAACACATG CTCCACCTTGTGCGGGCCCGKCAATTCCTTGAAGTTTCA ACCTTGGCGTGTACTCCCGAGCGGAATGCTTAAATGCGTTAG CTCGGCACTGAAGGGCGGAAACCTCCAACTAGCATTTCA TCGTTTACGGCACTGACTACAGGATATCAATCTGTTGCGTA CCCATGCTTTCGAGCCTCAGCTCAGTTACAGACCAGACGCG GCCTTCCGCACTGGTGTCTTCCATATATCTACGCACTTACC TACACATGAGTTCACCTGCTCTCTTGCACCTAAGTTTCCCA RTTCCGATGCACTTCTCGTTAAGCCRAGGGCTTTTACATC AGACTTAAAAACCGCTGC	Lactobacillus sp.  Identities 93.80%	20-719  700	GRTCSGCGATTACTAGCGRTTCCGACTTGTGTAGG CGAGTKGAGSCTACRGTCCGAAGTGAAGAAGGCTT TAAGAGATTRGCTTACCTCGCGGTCTCGARCTCG KTGTACCRCTCAATGTAGCAGCGGTGTAGSCAGGTC CATAAGGGGATGAKGATTTGACGTGATGCCACTT CCTCCGGTTTGTGRCCGCGAGTGTAGTGGGTGSC CAACTAAATGCTGGCACTAGTCATAAGGGTGGGCT CGTTGGGGACTTAAACCACGCTCTCAGCAGCKAG CTGACGACRAGCWTGCGCCACTGTWTTTTGCC CCGAAAGGGAAACCKGAKSTCKCAGGTGATCAAAASAT GGCAGGACTGTAAGGTTCTGGGCTGCTTGCAGTGAACACATG TGAACACATGCTCCCGCTTGTGCGGGCCCGK KCAATTCCTTGAAGTTTCAACCTTGGGCTGACTCC CCAGGGGATGCTTAAATGCGTTTACGCGGCACTG AAGGGCGGAAACCTCCAACTAGCATTTCACTGTT TACGGCATGACTACAGGATGATCAATCTGTTGCG TACCATGCTTTCGAGCCTCAGCTCAGTTACAGACC AGACAGCGCCTTCCGCACTGGTGTCTTCCATATAT CTACGATTTACCGCTACACATGGAGTCCACTGTCC TCTTCTG	Lactobacillus sp.  Identities 93.56%
3007.4CDC Fab1.ab1	4-CDCF	Cd014(1)	483	CAAWMYYGMMWMTGASCSARCCAMGCCGCGYAGTGAAGAM GGTTTTSSATCGTAAACTCTGTTGTRCCCATGAWCAAGGA CGTTAGTACTGAACGTCCTGACGGTATCTAACCAGAAAGC CAGGCTAACTACCTGCCASAGCCGCGTAATACSTAGGTGG CAAGCGTTGCGGATTTATGGCGTAAGCGAGCGCAGGGG GTTTCTTAAGTCTGATGTAAGGCCCGCGCTCAMCCSGGAG GGTCATTGAAACTGGGAGACTGTAGTGCAGAACAGGARAGT GAATTACATGTGAGCGGTGAAATGCKTCGATMTRTGGAGAA CAGCGCGGCGAAGGCGGCTCTGCGCTGTAACGATRGTGA GGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAACCGGATATATACCTGGT GTCYAGCCGCTCAACAATGAGTGTAAACGTCGGAGGGTTCC SCCTTCTTTG	Enterococcus sp.  Identities 90.77%	-	-	-
3420.4RCD CFab1	4-CDCR	Cd014(1)	963	GGCGAGTTCGGMKCGWGCTGRTCCRCGATTACTAGCGRTT CGGCTTCAAGGCRRAKTGACGCTGCAATCCGAACTGAGA GAAGCTTAAAGATTTGRTGACCTCGCGGTCTACSACTCGK TGACTTCCCATTTGAWAGCAGCGGTGAGCCAGGYCATAAGG GGCATGAKGATTTGAGCTWTCGCCACTTCTCCGGTTGGT ACCGMAIYCCGCTGAGTCTCCCACTAAATGATGGCAACT ACAATAAGGGTTGGGCTGTTGCGGACTTAAACGARCATCT ACSAGCSASCTGACSAACACCTGRCACCTGYCACTTGGT CCCRAAGGKAAAGCTCTAGCTCGARAGTGGYCAAGGATGGC AAGACCTGGTAAAGTCTTCCGCGTGTGTAATTAACACAT GCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCGCTCAATCTTGAAGTTT AACCTTGGGCTGACTCCCGAGGCGGAGTGTAAATGCGTTT GCTGACGACTGAAGGGCGGAAACCTCCAACTTAGCACT ATCGTTACRGGTGGACTACCGGATATCTAATCTGTTTGT CCCGAGCTTTCRAGCCTCAGCGTCAAGTACAGACCARAGC CSCTTCCSCMCTGGTGTCTCTWAWATCAAGCATTTACC GCTACACATGGAATTCACCTCTCTCTTGCACCTCAAGTCTCC CAGTTTCCAATGACCTCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACA TCAGACTTAAARAAMCGCTGCGCTGCTTWCCEYAAATAA CCGGACAACGCTTGSACCTAARWATTACCRGCTGCTRG MAMRWAAAATAARCCRWGGCATTMCWATWAAAAACARRAC KRGGAACAMTTCAKTTCTAGCKKRCCTTGGTSTTMYTGTGR CAGWGAAGTTTTTAC	Enterococcus sp  Identities 91.85%	-	-	-
3008.5CDC Fab1.ab1	5-CDCF	Cd014(2)	517	AGGGSGAAGAMCYMTGAACSSMAACAACGCCGCGGGGAGGT GAAGAAAGTTTTGGRATCGTAAAACTGCTGTTAGGAAA GAAYAAGGACGTAKTAACTGAACGTCCTCGACKGTATCTWA CCAGAAAGCCACKGCTAACTACKTCCATGAGCCGCGGWAATA CSTWGGTGGCTAGCGTGTGCGGATTTATGGGCGTTAAGCGA GCGCAGCGGTTTCTTAAAGTGTGATGTAAGCCCGCGYTC MCCCGGAGGKGCATTGGAAWCTGGKAGACTTGAAGTGCAGAA GARASAGTGGTATTCATGCTGCCMGMGAAATGCGTWSATA TMTGAGGAACACCTKGTGTAAGCGCYTCTGACAGAAAT RTGACTWKTCTGTGTCATKACCGATTTCTTGGTAACAGC	Enterococcus sp.  Identities 86.76%	-	-	-

				CAATAACKAGATGCATGTGTTTGCYCTCCTTATTAGCKCACCTAC TCCCGWGTGCGGATGCCCCATAACAMACCKCCGTGAGTCTTTK						
3421.5RCD CFab1	5-CDCR	Cd014(2)	1033	GSAGTCGMGKCGWGTGATCCGCGATTACTAGCGRRTCCGGC TTTCATGCAGGCRAGTTGCAGCCTGCRATCCGAACCTGAGAGAAG CTTTAARAGATTGCRRTGASCTCGGGCTACSCACTCGKGTGA CTTCCATTGWAGCAGGGTGYAGCCAGGYCATAAAGGGGCA TGAAGATTGACGTCWTCGCCACCTTCCCGGTTGGTGACCG GMAGYCGRGTAGAGTGCACCACTAAATGATGGCAACTAACAA TAAGGTTGCGCTGTTCCGCACTTACCGARCATCTCCGCA CGCGACTGACGACRACCATGCRCCACTGTCWTTTGTGCCC CGAAGGGAAGCTSTAGCTCGARAGTGGYCAAAGGATGGCAAG ACCTGTAAGGTTCTCGGTTGTTGSAATTAACACATGCT CCACCGCTTGTGCRGRCCCGGCTCAATTCCTTGGATTTCAAC CTTGGCGTACTCCCAGCGGARTGCTTAATGCGTTTGGCT GCAGCACTGAAGGGCGAAACCCWCAACACTAGCACTCAT CGTTTACGGGTGGACTACCAGGATTAATCCTGTTTGTCC CCACGCTTTCGAGCCTCAGCGTACAGACAGAGAGCGG CCTTCCGCACTGGTTCCTCATATATCTACGATTTTCCCGC TACACATGAAATCCACTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCCA GTTTCCAATGACCCTCCCGGTTGAGCCGAGGGCTTTCACATC AGACTTAARAAACCGCCTCGCTCGCTTACGCCCAATAAATCC GGACAACGCTTGCWCCTACTATTACCGCGCTGTGGCAG GTAGTTAGCCGTTCTGWTAGATACCGTCAAGGACGTT CARTTACTAACGTCCTGTTCTTCTAACAACRGAGTTTAMC GATCCGAAATATTCTTCTMCTCAGGRCGTGCTCGGTTCARA CTTTCGCTCATTGCCAARATTCGCCMACTGSKCTYMC	<i>Enterococcus sp.</i>		Identities 93.75%			
3004.1CDC Fab1.ab1	1-CDCF	Cd015(1)	1062	TKCGCAGCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGAAGAAGGCGCT TCGGGTTGTAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGAGTGAAGT TAATAACCTYATTTCATGACGTTACCCGCGAGAAGGACCCGGC TAACCTCGTCCAGCAGCCGCGTAAACGGAGGGTGCAGC GTTAATCGAATTAAGTGGCGTAAGCGCACAGCGGGTGTG TCAAGTCCGATGTGAATCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGA TTGCAAACTGGCAGCGYGGAGTCTTGAAGGGGGTGAAGTT CCAGGTTGAGCGGTGAATCGTAGAGATCTGGAGGAATAACG CTGCGCAAGCGCCCTGCAAAAGACTGACGCTCAAGTGT CRAAAGCGTGGGAGCAACAGGATAGATACCTCTGTAGGAC ACCGTGAACAGTGTGACTTGGAGTGTTCCTTGTAGCG TGCTTCCGAGCTAACCGGTTAAAGTTCGACCGCTGGGGAGT ACGGCCGCAAGGTTAAACTCAATGAATGACGGGGGCCCG ACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCMACGCGAAGA ACWTTACCTACTTGCATCCAGAGAAATYAKCAGAGATGCTT TGTGCTTCCGGAAGCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTGG TCAGCTCGTGTGAAATGTTGGTTAAGTCCCGCAAGGAGC RCAACCTTACTCTGTTCCAGCGATTAGTCCGGAAGTCAA AGGAGACTGCCAGTGAATAACTGGAGGAAGTGGGGYGSRC CTSAACGTCATCATTGCCCTTMCAGASTAKGGCTACACAGTGC TACARTGGCATATACAAAGAGAAAGCWAYCTCKYAGAGCAAG CGGAMCTCWAARATGTGTACTYCGATTGTAKTYCTGTAG YMSAMTYWTKAAGTCRAGTCTGCTAKTAWTYSTGTAAKATG AAKSCCMGTMAATWRTKTTCTCGGGCTTKRTACWAMMCM TGCTSCGTCAATCMMAWATAMWCATGTGTC	<i>Klebsiella sp.</i>		Identities 96.15%	TGCCGCGTGTGAAGAAGCCCTCGGGTGTAAAG TACTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGTGAAGTTAATA CCTYATTCATTGACGTTACCCGCGAGAAGGACCCGG CTAATCCGTGCCAGCAGCCGCTGTAATACGGAGGG TGCAAGCGTTAATCGGAATTCGGGCTAAAGCGC ACGCAAGCGGTGTCAAGTCCGATGTGAAATCCCG GGCTCAACCTGGGAAGTCAATCGAACTGGCAGG CYGGAGTCTGTAGAGGGGGTGAAGTTCCAGGTTG AGCGGTGAATTCGTAGAGATCGGGGAATACCGG TGGCGAAGCGGGCCCTGGACAAGACTGACGCTC AGGTGCRAAAGCGTGGGAGCAACAGGATAGATA CCCTGTAGTCCAGCTGAACAGATGTGCACTGG AGGTTGTTCCCTTGAAGGAGTGGCTTCGGAGCTAAC CGGTAAAGTCCAGCGCTGGGGAGTACGGCCGCAA GGTTAAAACCTAAATGAATGACGGGGGCCGCA AGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCMACCGG AAGAACCWTTACTACTCTTGAATCCAGGAAYTTAK CAGAGATCTTGGTGCCTTCGGGAATCTGTAGACA GGTCTGATGCTGTGCTGAGCTGTGTTGTGAAA TGTGGTTAAGTCCCAACCGACRCAACCTTATA CTCTGTTGCCAGGATAGTGGGAAGTCAAAGGA GACTGCCAGTGATAAAGTGGAGGAGTGGGG	<i>Klebsiella sp.</i>	Identities 98.48%
3005.2CDC Fab1.ab1	2-CDCF	Cd015(2)	946	AKSCAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGAGAAGGCGCT CGGTTGTAAGCACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGKGTGAGG TTAATAACCTYAYCGATTGACGTTACCCGCGAGAAGGACCCG GCTAATCCGTGCCAGCAGCCGCGTAAACGGAGGGTGC GGTTAATCGGAATTAAGTGGCGTAAAGCGCACGCGGGCTC TGCAAGTCCGATGTGAATCCCGGGCTCAACCTGGGAAGT CATTCAAAGTGGCAGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGTAGAA TTCCAGGTGTAGCGGTGAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATAC CGGTGGCGAAGGGCGCCCTGGACAAGACTGACGCTCAGG TGCRAAAGCGTGGGAGCAACAGGATGATACCTGTGACT CCACGCTGTAACGATGTGATTTGAGGTTGTGCCCTGAGG CGTGGCTTCCGAGCTAACCGGTTAAATCGACCGCTGGGGA GTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAATGAATGACGGGGGCC GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAA GAACCTTACCTGGCTTGCATCCACAGAACTTCCAGAGATGG ATTGTTGCTTCCGGAAGTGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGT CGYAGCTCGTGTGAAATGTTGGTTAAGTCCCGCAAGCA GCGCAACCTTATCCTTGTGTCAGCGGTYCGGCGGGAACT CAAAGGAGACTGCCAGTGAATAACTGGAGGAAGTGGGGATG ACGTCAGYCATCATGCCCCCTACGACCGGGCTACACAGT GCTACAWTGGSKTATAAMAAARAAGCTKCGACTTCCGCGAGAR AARRGGACCACYACAAGTATGTCATAAATCCGCTTTGGAACKCT GCA	<i>Klebsiella sp.</i>	20-819 800	Identities 96.26%	ATGCCGCTGTGTGAGAAGCCCTCGGGTGTAAAG CACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGKGTGAGGTTAATA ACCTYAYCGATTGACGTTACCCGCGAGAAGGACCC GGCTAATCCGTGCCAGCAGCCGCGTAAACGGAGGG GGTGAAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGCGTAAAGC GCACGCGGCGGCTGTGCAAGTCCGATGTGAAATCC CCGGCTCAACCTGGGAAGTCAATCRAAAGTGGCA GGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGTGAATTCAGGT GTAGCGTGAATGCTAGAGATCTGGAGGAATACC GTTGGCGAAGGCGCCCTGCGACAAGACTGAGC CTCAGGTGCRAAAGCGTGGGAGCAACAGGATAG ATACCTGTAGTCCAGCTGTAACAGTGTGATTT GGAGTTGTGCCCTTGAAGGCTGGCTTCCGAGCTA ACGCGTTAATCGACCGCTGGGAGGTACGCGCCGCA AGGTTAAACTCAAATGAATGACGGGGGCCGAC AAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACG GAAGAACCCTTACCTGGCTTGCATCCACAGAACTT CCAGAGATGGAATGGTCCCTCGGGAAGTGTGAGAC AGGTGCTCATGGCTGTGCTGCAAGTCTGTGTTGAA ATGTTGGTTAAGTCCCGCAAGCGGCAACCTTAT CCTTGTGTCAGCGGTYCGGCGGGAATCAAAGG AGACTGCCAGTGATAAAGTGGAGGAGGTTGGGGATG ACGTC	<i>Klebsiella sp.</i>	Identities 98.75%
3006.3CDC Fab1.ab1	3-CDCF	Cd015(5)	992	TKSCAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGAAGAAGGCGCT TCGGGTTGTAAGYACTTTCAGCGRGGAGGAAGGCRKGTGAGG TAATAACCTYASYGATTGACGTTACYCGCAGAAGAAGCACC CTAATCCGTGCCAGCAGCCGCGTAAACGGAGGGTGC CGTTAATCGGAATTAAGTGGCGTAAAGCGCACGCGGGCTC GTCAAGTCCGATGTGAAATCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGC ATTCRAAAGTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGTGAAGT TCCAGGTGATCCGGTGAATGCGTAGAGTCTGGAGGAATACC GGTGGCGAAGGCGCCCTGGACAAGACTGACGCTCAGGT GCRAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAAGTACCTCGTATGTC CAGCYGTAACGATGTAKATTGGAGGTTGKCCCTTGAAGM GTGCTTCCGAGCTAACCGGTTAAATMGACCGCTGGGAG TACCGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAAATGACGGGGCGC CACAAGCGGTGGAGCATGTTGTTAATTCGATGCAACGCGAAG	<i>Klebsiella sp.</i>	21-770 750	Identities 94.17%	TGCCGCGTGTGAAGAAGCCCTCGGGTGTAAAG YACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGKGTGAGGTTAATA CCTYASYGATTGACGTTACYCGCAGAAGAAGCACC GCTAATCCGTGCCAGCAGCCGCGTAAACGGAGGG GTCAAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGC CAGCAGCGGCTGTGCAAGTCCGATGTGAAATCC CGGCTCAACCTGGGAAGTCAATCRAAAGTGGCAG GCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGTGAATTCAGGTTG TAGCGGTGAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCG GTGGGAAGGCGGGCCCTGGACAAGACTGACGCT TCAGGTGCRAAAGCGTGGGAGCAACAGGATAGTA TACCCTGGTATCCACGCTGAACAGTGTCKATTTG GAGTTGTGKCCCTGAGGAGTGGCTTCCGAGCTAA CGGTTAATMGACCGCTGGAGGAGTGGGCGCAA	<i>Klebsiella sp.</i>	Identities 96.00%



6077.CPN1 2Fab1.ab1	CPN12-F	Cdnd4(1)	197	AACCCAGGTATCATGACCGAAGTAACGCCGCGTGAGTGAAGAA GGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTGTWAGGGGAAGAGGGGA TGAGAGTAACCTGTTATCCCTTGACGGTATCTAACTAGAGGGCC ACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAAACGTACGTGGAA AAAAAGTTTTTTTTTTTGAATTT	<i>Enterococcus sp.</i>	-	-	-				
26548.CD1 4Fab1	CD14-F	Cd014(6)-E	1007	CGWCSACGTGATGCAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGGCC TTGGGTGCTAAACTCTGTCTCAAGGAAGATAATGACGGTAC TTGAGGAGAAAGCCCGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGG TAATACGTAGGGGCTAGCGTTATCCGGATTTACTGGCGTAA AGGGTGCAGGGGCTTTCAAGTACGAGGTAAGGGCTACG GCTCAACCGTAGTAAGCTTTGAAACTGGGAGACTTGAAGTGA GGAGAGGAGAGTGAATTCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG ATATTAGGAGGAACACCACTTGCAGAGCGGCTCTCTGGACTG TAACGTACCGTGAAGCAGTGCAGAGCGGAGCAACAGGATT AGATACCCCTGGTGTAGTCCAGCGTAAACGATGAGTACTAGGT TCGGGGTTACCCCYTCGGTCCCGCAGCTAACGCATTAAGTA CTCCGCTGGGAACTACGCTCGCAAGAGTGAACCTCAMAGGAA TTGACGGGGACCCGCAAGTACGGGAGCATGTGGTTAATTC GAAGCAACGGCAAGAACCTTACCTAAGCTTGAACATCCCAATGA CATCTCCTTAATCGGAGAGTTCCTTCGGGGACATTTGGTGACA GGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGG TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCTTTAGTGGCATCA TTAAGTTGGCACTCTAGAGAGACTGCCAGGGATAACCTGGAG GAAGGTGGGATGACGCTCAATCATCATGCCCTTATGCTTAG GGCTACACAGTGTCTACAATGGGTAGTACAGAGGGTTGCCAAA CCCGTAAGGTGGAGCTAATCCCTTAAAGCTACTCTCAGTTCCG ATTGTAGCTGAACTCCCTACATGAAGCTGGAGTTACTAGTAT CCAGATCAGAACTGCTCGGTGAATGCGTTCCCGGGTCTTGTGA CACACCCGCCGTCAAA	<i>Clostridioides difficile</i>	21-920	900	<i>Clostridioides difficile</i>				
26549.CD7 99Fab1	CD799-F	Cdmx7	1007	TKSGAGCTGATGCAGCACCGCGGTGAGTGAAGGCCCTC GGTCTGTAATACTGTCTCAAGGAAGATAATGACGGTACTT GAGGAGAAAGCCCGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGGTA ATACGTAGGGGCTAGCGTTATCCGGATTTACTGGCGTAAAG GGTGCAGGGGCTTTCAAGTACGAGTGAAGGGCTACGG CTCAACCGTAGTAAGCTTGAAGTGGGAGACTTGAAGTGCAG GAGAGGAGAGTGAATTCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA TATTAGGAGGAACACCACTTGCAGAGCGGCTCTCTGGACTGT AAGTACCGTGAAGCACRAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTA GATACCCCTGGTGTAGTCCAGCTGAACGATGAGTACTAGGTGT CGGGGTTACCCCTTCGGTCCCGCAGCTAACGCATTAAGTAC TCGGCTGGGAAGTACGCTCGCAAGAGTGAACCTCAAAGGAAT TGACGGGGACCCGCAAGTACGGGAGCATGTGGTTAATTGCG AAGCAACCGCAAGAACCTTACCTAAGCTTGAACCTCAAATGACA TCTCCTTAATCGGAGAGTTCCCTTCGGGGACATTTGGTAGACGG TGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTT AAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCTTTAGTGGCATCATT AAGTTGGGACTCTAGAGAGACTGCCAGGGATAACCTGGAGGA AGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGCTYAGGG CTACACAGTGTCTACAATGGGTAGTACAGAGGGTTGCCAAGCC GTAAGGTGGAGCTAATCCCTTAAAGCTACTCTCAGTTCGGATTG TAGGCTGAACCTCAGCTACATGAAGCTGGAGTTACTAGTAATCG CAGATCAGAACTGCTGCGTGAATGCGTTCCCGGGTCTTGTAC ACMCCCGCCCCGTCAAA	<i>Clostridioides difficile</i>		99.10%	<i>Clostridioides difficile</i>				
								CGCCGCGTGAGTGAAGGCCCTTCGGGCTGTA ACTCTGTCTCAAGGAAGATAATGACGGTACTTGGAG GAGGAAGCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGG GGTAATACGTAGGGGCTAGCGTTATCCGGATTTACTGG TGGCGTAAAGGGTGCAGTGGGCTTTCAAGTACGAG GCAAAACAGGATTAGATACCCCTGGTGTCCAGCGCT GGAGTGAAGGCTACGGCTCAACCGTATGAAGCTC TTGAAACTGGGAGACTTGAAGTGGGAGGAGGAGAG TGAATTCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT TAGGAGGAACACCACTTGCAGAGCGGCTCTCTGG ACTGTAACGTACGCTGAGGACGCAAGAGCGTGGGGA GACATCCCAATGACATCTCCTTAAATCGGAGGATT GACATCCCAATGACATCTCCTTAAATCGGAGGATT CTTCGGGGACATTTGGTGAAGTGGGTTAAGTCC CGTCAAGTGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCC GCAACGAGCGCAACCCCTGTCTTTAGTGGCATCAT TAAGTTGGGCACTCTAGAGAGCTGCCAGGGATAA CCTGGAGGAAGTGGGATGACGCTAAATCATCAT GCCCTTATGCTAGGGTACACAGCTACTCAATG GGTAGTACAGAGGTTGCCAAACCCGTAAGGTGGA GCTAATCCCTTAAAGTACTCTCAGTTGGGATTGAG GCTGAACTCG				99.45%
								CGCCGCGTGAGTGAAGGCCCTTCGGGCTGTA ACTCTGTCTCAAGGAAGATAATGACGGTACTTGGAG GAGGAAGCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGG GGTAATACGTAGGGGCTAGCGTTATCCGGATTTACTGG TGGCGTAAAGGGTGCAGTGGGCTTTCAAGTACGAG AGTGAAGGCTACGGCTCAACCGTATGAAGCTC AAACTGGGAGACTTGAAGTGCAGGAGAGGAGAGTGG AATTCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTA GAGGAACACCACTTGCAGAGCGGCTCTCTGGACT GTAACTGACCTGAGGCAACRAAAGCGTGGGGAGCA AACAGGATAGATACCCCTGGTGTCCAGCTGTA CGATGAGTACTAGGTGTCCGGGGTTACCCCTTCGG TGCCGAGCTAACGCTAATGACTCCCGCTGGGAA GTACGCTCGCAAGAGTGAACCTCAAAGGAATTGAC GGGACCCGCAAGTACGGGAGCATGTGGTTAAT TTCGAAGCAACCGCAAGAACCTTACCTAAGCTTGA ATCCCAATGACATCTCCTTAAATCGGAGGATTCCCTC GGGACATTTGGTGAAGGCGGTTGGTGTGTCGTC AGTCTGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAA CGAGCGCAACCCCTGTCTTTAGTGGCATCATTAA TGGGCACTCTAGAGAGACTGCCAGGGATAACCTGG AGGAAGGTGGGATGACGCTAAATCATCATGCCCT TTATGCTYAGGGTACACAGCTACTCAATGGGTAG TACAGAGGTTGCCAAGCCGTAAGGTGGAGCTAAT CCCTTAAAGTACTCTCAGTTGGGATTGAGGCTGA ACTGCGCT				99.67%

