



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Implementación de la técnica de PCR multiplex para el diagnóstico molecular de *Clostridium difficile* en pacientes internos en un hospital de tercer nivel

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

PRESENTAN:

**GARCÍA MARTÍNEZ YESENIA
SOLÍS SOTO DIANA**

ASESORA:

M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez

CO-ASESORAS:

**Dra. Margarita de la Luz Camorlinga Ponce
Dra. Leticia Manuel Apolinar**

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2018.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis.**

Implementación de la técnica de PCR multiplex para el diagnóstico molecular de Clostridium difficile en pacientes internos en un hospital de tercer nivel.

Que presenta la pasante: **Yesenia García Martínez**

Con número de cuenta: **310113344** para obtener el Título de la carrera: **Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 18 de Junio de 2018.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez	
VOCAL	M. en C. María Guadalupe Avilés Robles	
SECRETARIO	Q.F.B. Verónica Ruiz Solorio	
1er. SUPLENTE	M. en C. Raquel María del Refugio Tapia Romero	
2do. SUPLENTE	L.B.D. Larisa Andrea González Salcedo	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis.**

Implementación de la técnica de PCR multiplex para el diagnóstico molecular de Clostridium difficile en pacientes internos en un hospital de tercer nivel.

Que presenta la pasante: Diana Solís Soto

Con número de cuenta: 310165776 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 18 de Junio de 2018.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez	
VOCAL	M. en C. María Guadalupe Avilés Robles	
SECRETARIO	Q.F.B. Verónica Ruiz Solorio	
1er. SUPLENTE	M. en C. Raquel María del Refugio Tapia Romero	
2do. SUPLENTE	L.B.D. Larisa Andrea González Salcedo	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

AGRADECIMIENTOS

A la máxima casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México, nuestro segundo hogar durante 7 años, ya que nos brindó la oportunidad de desarrollarnos tanto profesional como personalmente.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo 1, por los grandes conocimientos adquiridos que nos permitieron aprender lo necesario para enfrentar la vida profesional sobre una base de ética y alto compromiso con la sociedad para colaborar en la construcción de un mejor país.

A nuestra asesora, la M. en C. Ana Laura, por su apoyo incondicional, por confiar en nosotras. Gracias por motivarnos, por aconsejarnos y por guiarnos en este último gran paso. Admiramos su pasión por lo que hace, desde la enseñanza hasta la manera de involucrarse con sus alumnos; sin duda alguna, es de las mejores profesoras que puede tener la FESC.

A nuestras Co-asesoras, las Dras. Margarita Camorlinga y Leticia Manuel por su apoyo en la realización de este trabajo, por el apoyo con el material experimental, con la técnica y por la resolución de dudas. Gracias porque sin su apoyo este trabajo no hubiera sido posible.

Al Hospital de Especialidades “Dr. Bernardo Sepúlveda” por abrir sus puertas a los estudiantes y permitir que pongamos en práctica nuestros conocimientos y para la adquisición de nuevos. A los todos los Químicos del laboratorio central, en especial a la Q.F.B Reyna Flores por habernos permitido estar en la sección de Bacteriología durante nuestra estancia en el servicio social y la Lab. Esther Polanco por el apoyo para la recolección de las muestras clínicas. También agradecemos al Q.FB. Jorge Alberto Ramírez por proporcionarnos todo el apoyo y orientación requeridos durante la experimentación.

A todos ustedes, nuestro mayor reconocimiento y gratitud.

“Por mi raza hablará el espíritu.”

Dedicatorias

De Diana:

A Dios, por la vida, por la salud, por mi familia y por su amor incondicional que sobre pasa todo entendimiento; gracias por la sabiduría y la inteligencia, gracias por haber puesto en mi camino a las personas correctas que formaron parte de este gran logro, gracias por darme la fuerza cuando creía que ya no podía, por levantarme y direccionarme, por protegerme bajo la sombra de tus alas, gracias por ser mi roca y mi fortaleza. Gracias por que me pusiste en el lugar correcto, en la mejor carrera, en lo que me llena y apasiona. Gracias por cumplir uno de los anhelos de mi corazón, por eso y más, a ti sea toda la Gloria y la Honra.

A mi papá, la persona que más admiro, a la cual tengo tanto que agradecerle que creo que nunca terminaría. Eres mi inspiración, me siento tan orgullosa de ti, de todo el esfuerzo que has hecho por darnos un techo, comida, calzado, estudios, etc. Gracias porque has entregado tu vida entera por vernos realizados y alcanzando nuestras metas, ahora más que nunca te doy las gracias por ser el padre estricto y protector que eres, por guiarme por el buen camino porque gracias a eso formaste a la mujer que ahora soy. Le doy gracias a Dios por tu vida y por darme a ese padre de ejemplo, soy tan afortunada de ser tu hija. Dios te bendiga siempre y te siga dando fortaleza y salud como hasta ahora. Te amo, y ahora si papá, lo logramos, porque este triunfo es de ambos.

A mi mamá, mi chaparrita hermosa, por protegerme en el camino de la vida, por tu amor inigualable, por ser esa amiga en quien podía confiar, por tus consejos y tú apoyo, por esos abrazos protectores, por tu valentía y por ser esa mujer guerrera hasta el final. Aunque físicamente ya no estés conmigo, tus palabras, tus consejos y tu recuerdo vivirán en mi corazón hasta que nos reencontremos. Sé que desde aquel lugar maravilloso en donde estas, junto a Dios, estas muy feliz y orgullosa de que este día haya llegado. Gracias mami, ¡lo logramos! Sé que a cada paso que de tu estarás conmigo. Te amo y te amare hasta la eternidad.

A mi hermano, Heriberto, sé que hemos tenido pequeñas peleas pero, a pesar de todo te amo y te doy las gracias porque has sido un pilar fundamental para mi vida, que padre se siente tener un hermano mayor que sabes que estará allí para defenderte y protegerte cuando lo necesites. Gracias por tus ocurrencias, por lo divertido que eres, eso te hace especial y único. Muchas gracias hermano, y acuérdate que el futuro recompensa a los que siguen adelante, esfuérate y veras que todos tus anhelos se harán realidad, primero Dios.

A mi hermana, Janeth, mi ninus, no sé por dónde empezar, simplemente no me puedo imaginar la vida con otra hermana que no seas tú, eres la mejor compañera y amiga que Dios me pudo dar, tienes muchos defectos, el más grande, y lo sabes, tu carácter, pero son aún más tus virtudes las que te hacen ser autentica y especial; eres divertida, alegre,

inteligente, fuerte, valiente, en fin, no terminaría si te digo todas. Sé que el camino no ha sido fácil, y que a pesar de ser la pequeña de la casa has pasado por más pruebas que incluso nosotros, y créeme que por eso y más te admiro, porque a pesar de las adversidades te levantas y lo intentas, admiro tu fortaleza, admiro tus ganas de salir adelante. Te amo y siempre voy a estar para apoyarte en todo. Muchas gracias por estar ahí siempre, por escucharme en los buenos y en los malos momentos, por escucharme cuando llegaba de la escuela emocionada, contándote lo que había aprendido en clases, y tú, como siempre, poniéndome toda la atención del mundo. Espero, primero Dios, en unos añitos verte terminado una carrera profesional, que encuentres aquello que te haga feliz y te apasione, como yo lo encontré. No tengas miedo de dar un paso, nunca dudes de lo que te espera más adelante, yo estaré ahí sin importar las circunstancias. Te amo, y este logro es de todos, familia.

A Yes, mi compañera y esposa de tesis. Que te digo hermosa, estoy muy agradecida contigo. Primero, jamás me imagine que íbamos a estar juntas en este último paso, pero como siempre digo, Dios te pone a las personas correctas en el momento correcto. Doy gracias por la oportunidad de haber trabajado contigo, porque no solo te conocí profesionalmente, si no también personalmente, ya que a pesar de haber compartido varias clases juntas, fue hasta los últimos semestres que nos empezamos a hablar. Eres una personita maravillosa en todos los sentidos, eres inteligente, honesta, humilde, trabajadora y bondadosa. En verdad que eres de las personas más buenas que he conocido y por eso te mereces lo mejor de la vida. Muchas gracias por todo el gran apoyo que me diste, no sé qué hubiera hecho sin ti manita. Fue difícil, y no tan rápido como creíamos, pero mira, después de muchos sacrificios ¡Lo logramos! Es un enorme placer compartir contigo este grandísimo logro, que sin duda, es el comienzo de muchos más. Te quiero mucho y espero que de aquí en adelante esta amistad que surgió perdure por siempre. De nuevo, muchas gracias manita, y ¡muchas felicidades!

A mis manas, Clara y Julieta, que les puedo decir que no sepan, simplemente estoy agradecida con Dios por haberlas puesto en mi camino, ustedes fueron a las dos primeras personas que les hable en la Facultad, Clara cuando llegue al salón y te pregunte en donde estaban todos, ese día se me había hecho tarde, que raro (jajaja), me dijiste que estaban sacando copias. July, a ti te hable por primera vez en las copias, donde Clara me había mandado, desde ese día nos juntamos y unos días después Clara se nos unió. Muchas gracias hermanas, fue un honor haber compartido con ustedes la mejor etapa de mi vida, compartir esas desveladas, momentos de estrés, cuando sentíamos que ya no podíamos, cuando queríamos tirar la toalla, cuando queríamos llorar por tanta presión en semanas de exámenes, por tantos esfuerzos, sacrificios, por esas horas de estudio, por esos momentos de orgullo y satisfacción cuando veíamos nuestros esfuerzos reflejados en cada fin de semestre, por esos momentos de triunfo en las exposiciones, sin duda, fuimos un gran equipo. Gracias por todo su apoyo en los momentos buenos y malos, son lo mejor que me pudo pasar en la Universidad. Que orgullo que lo hayamos logrado, que todo todo todo valió la pena hermanas. Deseo de todo corazón que de aquí en adelante sus vidas estén llenas de éxitos, las amo con todo mi corazón y nuevamente, gracias por todo.

A Oliver y Sonia, muchas gracias. Oli, manito, a veces me pregunto, ¿Qué sería de nuestras vidas si no te hubieras cruzado en ellas?, ¿De dónde hubiéramos sacado ese vocabulario tan científico y coloquial?, jajaja. Gracias manito, por esos momentos de risa, por tus ocurrencias, siempre que te veía alegrabas mis días. Muchas gracias por tu apoyo en los momentos difíciles, eres una gran persona, como tú no hay dos en esta vida. Y pues órale pues manito, así le hacemos. Te quiero mil. Sonia, fue un placer conocerte, eres una mujer admirable. Gracias por poner tu casa para las fiestas en los primeros semestres, sin duda, eran de las mejores fiestas. Gracias por tu entrega en los equipos que estuvimos juntas, y sobre todo gracias por tu apoyo en los momentos difíciles. Te quiero mucho y deseo que Dios te de lo mejor en tu vida, que seas muy feliz y que logres todos tus objetivos.

A Monse y Juan. Muchas gracias amigos, a ustedes los conocí por Oli y creo que compartimos más fiestas que clases jajaja. Gracias Monse por las clases que llegamos a tomar juntas, por aguantarme en los equipos, porque considero que a veces soy medio especial jaja. Juan, gracias por los momentos divertidos que pasamos, por la confianza que me brindaste. A los dos, les agradezco su apoyo cuando lo necesitaba, los quiero mucho y les deseo mucho éxito en su vida profesional.

Por último, gracias a todos esos excelentes profesores de la FESC-Campo 1, que se apasionan por lo que hacen, ya que parte de esa pasión la transmiten en sus clases, porque nos motivan a dar lo mejor de nosotros y sobre todo porque nos dan alas para querer volar. ♥

“Tu trabajo va a ocupar gran parte de tu vida, y la única forma de estar realmente satisfecho con lo que haces es haciendo un gran trabajo, y la única forma de hacer un gran trabajo es amando lo que haces. Si aún no lo encuentras, sigue buscando. No te conformes. Como todos los asuntos del corazón, sabrás cuando lo hayas encontrado.”

Steve Jobs

De Yesenia:

A Dios por permitirme disfrutar de la vida, por fortalecerme en los momentos difíciles, llenarme de oportunidades, iluminar y bendecir cada uno de mis días. Gracias Dios padre por darme la sabiduría para poder manejar mi vida de la mejor manera posible y gracias por los padres tan maravillosos que tengo.

A mamá y papá porque desde el momento que llegué a sus vidas, me han llenado de amor, comprensión y valores que han hecho de mí lo que soy ahora. Los amo con todo mi corazón y les agradezco por haberme dado la vida y por hacer de esa vida algo maravilloso. Estaré eternamente agradecida por todo el amor y dicha que me han dado. Hemos pasado por situaciones difíciles y de esas situaciones difíciles me he dado cuenta que a mi alrededor no hay personas más valientes que ustedes, los admiro por toda esa fuerza que tienen y de ustedes he aprendido que rendirse no es una opción y que siempre es posible salir adelante y superarse. Gracias por enseñarme el valor de la familia y de la amistad. Gracias por inculcarme todo lo bueno que hacen de mí la persona que soy ahora y por impulsarme a cumplir mis sueños. Sé que no los he defraudado y tengan por seguro que nunca lo haré porque cada día de mi vida pondré en práctica todas sus enseñanzas. Los amo infinitamente.

A Fernanda, mi hermanita, por ser el mayor tesoro que tuve en mis primeros 10 años de vida y ser mi motivación al despertar cada mañana. A ti te dedico todo mi esfuerzo y trabajo porque en gran parte es por ti que he logrado llegar hasta aquí. Gracias por enseñarme el significado de compartir, de amar incondicionalmente, de amar y disfrutar cada instante de la vida. Físicamente no estás conmigo pero vivirás en mi corazón eternamente y sé que desde donde estás me cuidas y acompañas en cada instante de mi vida.

A ti Daniel, por estar conmigo en los momentos hermosos y difíciles de mi vida, por tu paciencia y amor que me impulsan a ser mejor cada día. Gracias por ofrecerme lo mejor de ti en cada instante vivido durante estos años, por tu comprensión, por creer en mí y motivarme cuando más lo necesitaba. Gracias por llegar a mi vida y convertirte en mi mejor consejero, compañero y amigo. Eres parte de esto porque tu apoyo y amor contribuyen cada día en el cumplimiento de mis metas. Gracias por recorrer conmigo este camino y los que nos faltan, te amo.

A mis maestros, cómo símbolo de respeto, admiración y gratitud por la labor que desempeñan diariamente y por haber contribuido a mi formación académica y ser un elemento fundamental de este y todos los logros académicos de cada uno de los alumnos a quienes guían en las aulas.

A mi amada UNAM y a las que por varios años se convirtieron en mi hogar, la ENP 9 y la FES Cuautitlán. Estaré siempre en deuda por todo lo recibido, porque además de los conocimientos adquiridos tuve la oportunidad de conocer a personas maravillosas que hicieron que la vida universitaria fuera más divertida y llevadera.

A mis amigos, Ana, Carlos, Naye, Delmi y Dani (amix) que me acompañaron en el camino desde el principio hasta el final de la universidad e hicieron de la universidad toda una aventura. A mi mejor amiga de la secu Daniela por permanecer a mi lado a pesar del tiempo y la distancia y estar cuando más lo he necesitado. Están siempre en mi corazón y les agradezco infinitamente todo su apoyo, las alegrías y la gran cantidad experiencias que compartimos. Los amo a todos

Y sobre todo a mi “esposa de tesis” Dian, gracias por permitirme colaborar contigo y tener esta tesis como fruto de nuestro esfuerzo, trabajo, dedicación y amistad. Gracias por permitirme conocerte y darme cuenta que en ti hay un ángel distraído pero con grandiosas cualidades. Eres una persona increíble y verdaderamente valiosa. Te admiro mucho por tu manera de enfrentar las situaciones que Dios nos pone en frente. Gracias también por darme la motivación y las palabras de aliento cuando las he necesitado. Por tu esfuerzo y compromiso a pesar de las dificultades que se presentaron. Sigue siendo la persona tan hermosa que eres y llegarás más lejos de lo que te propongas. Te mereces todas las dichas del mundo y una vida de éxito. Deseo que esto sólo sea el comienzo de una muy larga y verdadera amistad. Gracias por nuestros logros y por vivir conmigo momentos que quedarán en mi memoria por siempre. Te quiero muchísimo.

Y gracias a mis familiares y aquellas personas que me han brindado un consejo y/o una palabra de aliento para que no me rindiera nunca. Y aquellos que tampoco creían en mí, porque me enseñaron a demostrarme que puedo cumplir las metas sin importar y a pesar de lo que los demás opinen.

Comparto con todos ustedes éste que es uno de los muchos logros que con su apoyo sé que seguiré logrando.

¡GRACIAS!

**“Nuestra mayor debilidad radica en renunciar. La forma más segura de tener éxito es siempre intentarlo una vez más”
Thomas A. Edison**

Índice

ÍNDICE DE FIGURAS	11
ÍNDICE DE TABLAS	13
ABREVIATURAS	13
1. INTRODUCCIÓN	14
2. ASPECTOS TEÓRICOS	15
2.1 Los intestinos	15
2.1.1 Anatomía, histología y fisiología de los intestinos delgado y grueso	15
2.1.2 La microbiota normal	19
2.1.2.1 Composición de la microbiota	20
2.2 <i>Clostridium difficile</i>	21
2.2.1 Historia	21
2.2.2 Características de <i>Clostridium difficile</i>	22
2.2.3 Patogenia	25
2.2.4 Factores de virulencia de <i>C. difficile</i>	28
2.2.4.1 Toxinas	28
2.2.4.2 Adhesinas	38
2.2.4.3 Flagelos	39
2.2.4.4 Fimbrias	40
2.2.5 Toxinotipos de <i>Clostridium difficile</i>	40
2.2.6 Epidemiología	42
2.2.7 Manifestaciones clínicas	43
2.2.8 Clasificación de la ICD	48
2.2.9 Factores de riesgo	49
2.2.10 Diagnóstico	51
2.2.10.1 Tipo de muestra, transporte y conservación	51
2.2.10.2 Métodos de Diagnóstico de laboratorio	52
2.2.10.3 Caracterización molecular de <i>C. difficile</i>	57
2.2.10.4 Algoritmo Diagnóstico para la identificación de <i>Clostridium difficile</i>	60
2.2.11 Tratamiento	62
2.2.11.1 Trasplante de microbiota fecal (TMF)	64
2.2.11.2 Resinas	65
2.2.11.3 Probióticos	65
2.2.11.4 Vacuna	66
2.2.11.5 Anticuerpos monoclonales contra <i>Clostridium difficile</i>	66
2.2.12 Medidas de prevención y control de la infección	67
2.3 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)	69
2.3.1 Tipos de PCR	73
3. JUSTIFICACIÓN	79
4. OBJETIVOS	80
4.1 Objetivo general	80
4.2 Objetivos específicos	80
5. HIPÓTESIS	80
6. METODOLOGÍA	81
6.1 Pacientes y muestras	82
6.2 Controles	83
6.3 Preparación de muestras	83
6.4 Materiales, equipos y reactivos	83

6.5 Extracción del DNA	84
6.6 Amplificación del DNA por PCR multiplex	85
6.6.1 Oligonucleótidos	85
6.6.2 Preparación de la mezcla de reacción.....	86
6.6.3 Condiciones de la reacción.....	87
6.6.4 Electroforesis en gel de agarosa	88
6.7 Identificación de las toxinas A y B por Quimioluminiscencia	89
7. RESULTADOS.....	90
8. DISCUSIÓN	99
9. CONCLUSIONES	108
10. PERSPECTIVAS.....	109
11. REFERENCIAS.....	110
12. ANEXOS	118
11.1 Anexo A. Especificaciones de los oligonucleótidos	118
11.2 Anexo B. Master Mix (2x) para la PCR.....	119
11.3 Anexo C. Marcador de Peso Molecular (Thermo Scientific™ GeneRuler™ 100 pb DNA Ladder).....	119
11.4 Anexo D. Preparación del gel de agarosa	120
11.5 Anexo E. Preparación de la cámara para la electroforesis.....	121
11.6 Anexo F. Integridad del DNA.....	121
11.7 Anexo G. Cálculo de índice kappa (Programa XLSTAT).....	122
11.8 Anexo H. Determinación de la sensibilidad y especificidad de las técnicas de diagnóstico.....	123

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía macroscópica del intestino delgado.....	15
Figura 2. Esquema que ilustra las capas que constituyen el intestino delgado	16
Figura 3. La anatomía del intestino grueso	17
Figura 4. Histología del intestino grueso	18
Figura 5 Características morfológicas de <i>Clostridium difficile</i>	24
Figura 6. Las esporas y células vegetativas de <i>C. difficile</i> se adhieren al epitelio intestinal del hospedero	26
Figura 7 Superficie de esporas de los aislados clínicos de <i>C. difficile</i>	26
Figura 8. Patogenia de la infección por <i>Clostridium difficile</i>	27
Figura 9 Disposición genética del locus de patogenicidad (PaLoc).....	30
Figura 10. Dominios funcionales de <i>tcdA</i> y <i>tcdB</i> (Tian y cols., 2017).	31
Figura 11. Visión general de las modificaciones intracelulares de <i>tcdA</i> y <i>tcdB</i>	33
Figura 12. Efectos celulares de <i>tcdA</i> y <i>tcdB</i> en el epitelio intestinal	36
Figura 13 Dominios funcionales de la toxina binaria de <i>Clostridium difficile</i>	37
Figura 14. Los aislamientos clínicos de <i>C. difficile</i> producen flagelos.	40
Figura 15. Toxinotipos de <i>Clostridium difficile</i>	41
Figura 16. Escala de Bristol de consistencia de heces.....	44
Figura 1. Colitis con cambios mínimos. "Mucosa eritematosa"	45
Figura 18. Colitis pseudomembranosa	46
Figura 19. Perforación colónica	47

Figura 20. Algoritmo diagnóstico de 2 pasos para la confirmación de la infección por <i>Clostridium difficile</i>	61
Figura 21. Algoritmo diagnóstico de 3 pasos para la confirmación de la infección por <i>Clostridium difficile</i>	61
Figura 22. Componentes de la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)	71
Figura 23. Esquema convencional de una PCR	72
Figura 24. Visualización del producto de PCR mediante electroforesis en gel	74
Figura 25. Análisis de imagen de la banda del producto de PCR	75
Figura 26. PCR anidada	77
Figura 27. Diagrama de trabajo	81
Figura 28. Muestras de heces diarreicas de pacientes con sospecha clínica de ICD	82
Figura 29. Extracción de DNA	85
Figura 30. Marcador de peso molecular de 100pb DNA Ladder.....	88
Figura 31. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, de la PCR multiplex MPI para la amplificación del fragmento correspondiente al gen <i>tpi</i> y al gen <i>tcdC</i> en los controles	90
Figura 32. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de la PCR multiplex MPII para la amplificación del fragmento correspondiente a los genes <i>cdtB</i> (Toxina binaria), <i>tcdA</i> (Toxina A) y <i>tcdB</i> (Toxina B) en los controles.	90
Figura 33. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de la PCR multiplex MPI para la amplificación del fragmento correspondiente al gen <i>tpi</i> en las muestras de los pacientes 1- 12	91
Figura 34. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de la PCR multiplex MPII para la amplificación del fragmento correspondiente a los genes <i>cdtB</i> (Toxina binaria), <i>tcdA</i> (Toxina A) y <i>tcdB</i> (Toxina B) en las muestras de los pacientes 1, 3, 7 y 11.....	91
Figura 35. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de la PCR multiplex MPI para la amplificación del fragmento correspondiente al gen <i>tpi</i> en las muestras de los pacientes 13-17	92
Figura 36. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de la PCR multiplex MPII para la amplificación del fragmento correspondiente a los genes <i>cdtB</i> (Toxina binaria), <i>tcdA</i> (Toxina A) y <i>tcdB</i> (Toxina B) en las muestras de los pacientes 13-17.	92
Figura 37. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de la PCR multiplex MPI para la amplificación del fragmento correspondiente al gen <i>tpi</i> en las muestras de los pacientes 18-21	93
Figura 38. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de la PCR multiplex MPII para la amplificación del fragmento correspondiente a los genes <i>cdtB</i> (Toxina binaria), <i>tcdA</i> (Toxina A) y <i>tcdB</i> (Toxina B) en las muestras del paciente 21	93
Figura 39. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de la PCR multiplex MPI para la amplificación del fragmento correspondiente al gen <i>tpi</i> en las muestras de los pacientes 22-27	94
Figura 40. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de la PCR multiplex MPI para la amplificación del fragmento correspondiente al gen <i>tpi</i> en las muestras de los pacientes 28-31	94
Figura 41. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de la PCR multiplex MPI para la amplificación del fragmento correspondiente al gen <i>tpi</i> en las muestras de los pacientes 32-37	95
Figura 42. Resultado de la identificación de <i>C. difficile</i> por QL y PCR.	95
Figura 43. Porcentaje de las muestras aceptadas y rechazadas en QL y PCR.	96
Figura 44. Representación gráfica de la procedencia de los pacientes con ICD.....	96
Figura 45. Edades de los pacientes con infección por <i>C. difficile</i>	97
Figura 46. Género de los pacientes con infección por <i>C. difficile</i>	97
Figura 47. Servicios de origen de los pacientes con CD positivo	98
Figura 48. Porcentaje de pacientes con CD positivo y CD negativo en cada servicio.....	98

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Clasificación de la infección por <i>Clostridium difficile</i> (ICD) según la gravedad de la enfermedad.....	49
Tabla 2. Principales factores de riesgo de la infección por <i>Clostridium difficile</i> asociada a centros sanitarios.....	50
Tabla 3. Tratamiento de la infección por <i>Clostridium difficile</i>	63
Tabla 4. Material, Equipos y reactivos a utilizar.....	83
Tabla 5. Características de los oligonucleótidos utilizados para la identificación de <i>C. difficile</i>	86
Tabla 6. Componentes de la mezcla de reacción.	87
Tabla 7. Condiciones de la reacción de PCR multiplex.	87
Tabla 8. Interpretación de los resultados de Quimioluminiscencia para el diagnóstico de CD	89

ABREVIATURAS

ATP	Adenosin trifosfato	RNA	Ácido ribonucleico
CD	<i>Clostridium difficile</i>	tcdA	Toxina A
cdtB	Subunidad B de la toxina binaria	tcdB	Toxina B
cDNA	ADN complementario	TGI	Tracto gastrointestinal
cm	Centímetro	TMF	Trasplante de microbiota fecal
CPM	Colitis pseudomembranosa	TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa
DACD	Diarrea asociada a <i>Clostridium difficile</i>	TPI	Triosa Fosfato Isomerasa
DNA	Ácido desoxirribonucleico	VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
EIA	Inmunoensayo enzimático	μL	Microlitro
FDA	Administración de alimentos y medicamentos	μg	Microgramo
GDH	Glutamato deshidrogenasa	$^{\circ}$C	Grados centígrados
h	Hora	RNA	Ácido ribonucleico
IA	Inmunoanálisis	tcdA	Toxina A
ICD	Infección por <i>Clostridium difficile</i>	tcdB	Toxina B
IL	Interleucinas	TGI	Tracto gastrointestinal
Kda	Kilo Dalton	TMF	Trasplante de microbiota fecal
m	Metro	TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa
min.	Minuto	TPI	Triosa Fosfato Isomerasa
mL	Mililitro	VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
mm	Milímetro	μL	Microlitro
mRNA	RNA mensajero	μg	Microgramo
PaLoc	Locus de patogenicidad	$^{\circ}$C	Grados centígrados
Pb	pares de bases	RNA	Ácido ribonucleico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa	tcdA	Toxina A
PGs	Prostaglandinas	tcdB	Toxina B
rDNA	ADN ribosomal	TGI	Tracto gastrointestinal

1. INTRODUCCIÓN

El uso indiscriminado de antibióticos no solo se relaciona con la resistencia, sino también con el aumento de algunas infecciones bacterianas, como es el caso de *Clostridium difficile* (Carreño e Higuera, 2016). La infección por *C. difficile* (ICD) es la principal causa de diarrea en pacientes hospitalizados.

C. difficile es un bacilo Gram positivo, anaerobio estricto, capaz de formar esporas que le permiten su supervivencia en aguas, suelos y en ambientes hospitalarios, donde puede permanecer hasta años (Walter y Lina, 2012). La principal ruta de transmisión del bacilo es la fecal-oral, con la ingestión de esporas o de formas vegetativas encontradas en las heces tanto de los portadores como de los enfermos. La infección se da por el contacto con superficies u objetos contaminados con materia fecal infectada. Así mismo, se ha documentado la diseminación vía aérea (Barrientos, Esquivel y cols., 2017).

La mayoría de las formas vegetativas de *C. difficile* ingeridas son eliminadas en el estómago y solo un 1 % del inóculo llega al intestino delgado. Sin embargo, las esporas son resistentes a la acidez del estómago y pueden germinar en el intestino delgado con la exposición a las sales biliares, reactivándose a su forma vegetativa. La alteración de la microbiota intestinal normal permite que las células en su forma vegetativa penetren la mucosa y se adhieran a la superficie del epitelio (Meyer, Espinoza y Quera, 2014).

Este microorganismo causa un espectro de presentación desde diarrea autolimitada, diarrea muy severa, colitis pseudomembranosa y colitis fulminante, la que puede ser inclusive mortal (Barrientos, Esquivel y cols., 2017).

Al reconocer a *C. difficile* como un patógeno importante para la salud, con alto potencial epidémico, se han desarrollado herramientas diagnósticas y de estudio que han permitido conocer a fondo la fisiopatología de la enfermedad, factores de riesgo asociados y medidas adecuadas de prevención. (Walter y Lina, 2012).

La importancia del diagnóstico rápido y preciso de este patógeno como causa de la enfermedad permite la instauración temprana del tratamiento adecuado, lo que evita el agravamiento del cuadro y la posible diseminación del agente etiológico a otros pacientes.

2. ASPECTOS TEÓRICOS

2.1 Los intestinos

2.1.1 Anatomía, histología y fisiología de los intestinos delgado y grueso

a) *Intestino delgado*

La mayor parte de la absorción y la digestión se produce en el intestino delgado, que mide aproximadamente unos 3 m de largo y en promedio 2.5 cm de diámetro. El intestino delgado se divide en tres regiones, la primera es el duodeno, que es la parte más corta y se une a la segunda parte que es el yeyuno el cual se extiende hasta la tercera parte, el íleon y se une al intestino grueso a través de la válvula ileocecal (Rizzo, 2010)

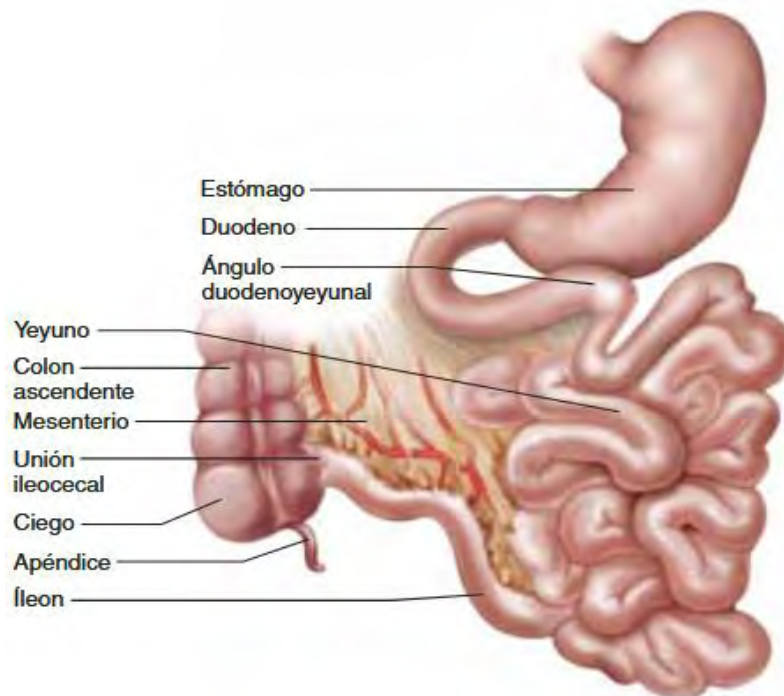


Figura 2. Anatomía macroscópica del intestino delgado. El intestino se hizo a un lado para exponer el mesenterio y la unión ileocecal (Saladin, 2012).

La pared del intestino delgado está compuesta por las 4 capas que forman la mayor parte del tubo digestivo: mucosa, submucosa, muscular y serosa (Tortora y Derrickson, 2015). La mucosa del intestino delgado contiene muchas cavidades revestidas con epitelio glandular. Estas cavidades se conocen como las glándulas intestinales o criptas de Lieberkun, y secretan las enzimas digestivas intestinales que complementan la mayor parte de las enzimas digestivas secretadas por el hígado y el páncreas. (Rizzo, 2010)

La submucosa del duodeno contiene numerosas glándulas de Brunner, ahora llamadas glándulas duodenales, las cuales secretan moco alcalino, mientras que el moco adicional es secretado por las células caliciformes. Este moco protege a las paredes del intestino delgado de ser digeridas por enzimas propias, y neutraliza los ácidos que se encuentran en el quimo. El quimo es el término utilizado para describir el contenido viscoso y semifluido resultado de la digestión, presente en el intestino (Rizzo, 2010).

La capa muscular del intestino se compone de una capa circular interna y una capa longitudinal externa, y tiene a su cargo la actividad peristáltica del intestino delgado. La capa circular tiene a cargo las contracciones de segmentación que mueven el quilo de manera local mezclándolo con los jugos digestivos y lo ponen en contacto con la mucosa para la absorción de los nutrientes. Por otro lado, la capa longitudinal tiene a su cargo las contracciones peristálticas que desplazan el contenido intestinal a lo largo del tubo hasta la porción distal del intestino (Fortoul, 2013). La capa serosa está constituida por un epitelio plano simple o mesotelio y por tejido conectivo fibrocolagenoso (Sepúlveda, 2012)

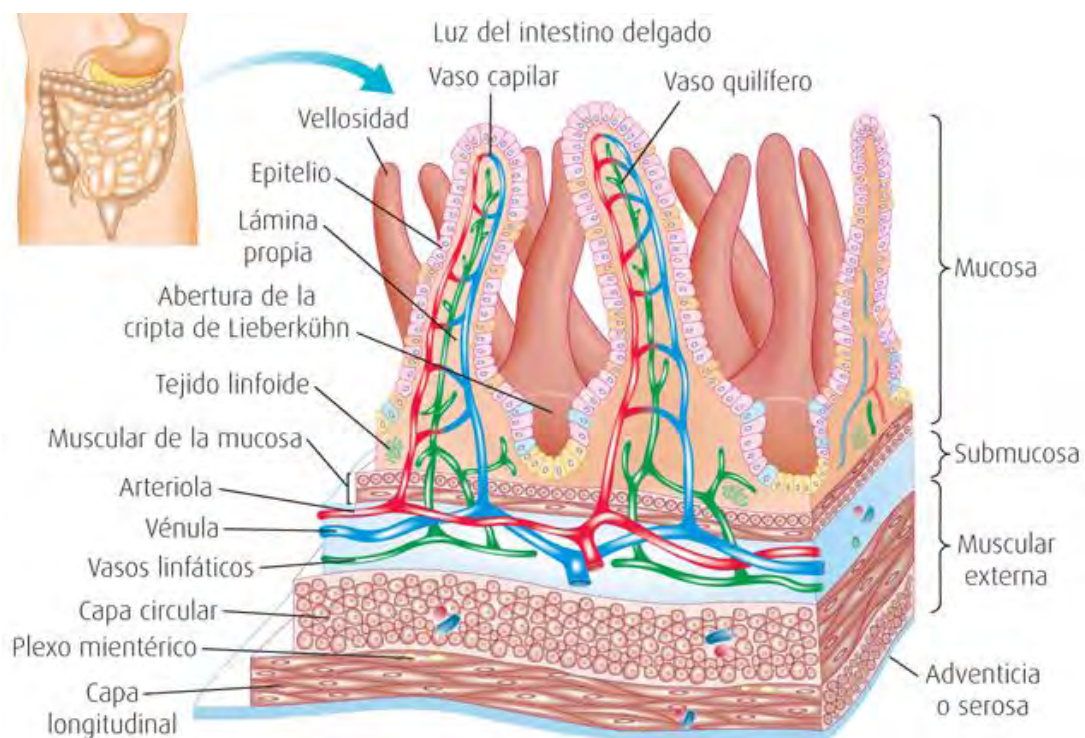


Figura 3. Esquema que ilustra las capas que constituyen el intestino delgado (Sepúlveda, 2012).

b) Intestino grueso

Las funciones del intestino grueso son la absorción de agua, la producción y la absorción de ciertas vitaminas, y la formación y expulsión de las heces (Rizzo, 2010). El intestino grueso mide casi 1.5 m de largo y 6.5 cm de diámetro. Consta de cuatro regiones: ciego, colon, recto y conducto anal. El ciego es una bolsa cerrada en el cuadrante abdominal inferior derecho, debajo de la válvula ileocecal. Adjunto a su extremo inferior se encuentra el apéndice, un tubo ciego de 2 a 7 cm de largo. El apéndice tiene una densa población de linfocitos y es una fuente significativa de células inmunitarias (Saladin, 2012).

El colon es la parte del intestino grueso entre la unión ileocecal y el recto (no incluye el ciego, el recto ni el conducto anal). Está dividido en las regiones ascendente, transversa, descendente y sigmoide. En la cavidad pélvica, el intestino grueso continúa como recto de casi 15 cm de largo. Los 3 cm finales del intestino corresponden al conducto anal (Saladin, 2012).

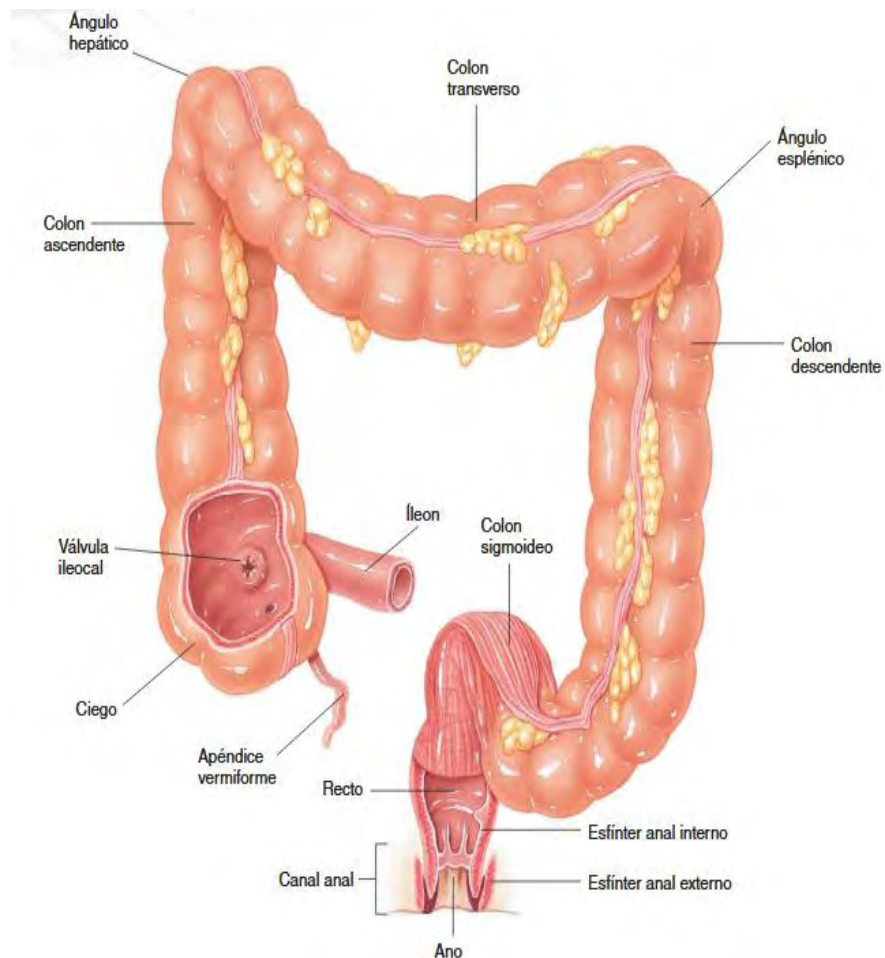


Figura 4. La anatomía del intestino grueso (Rizzo, 2010).

La pared del intestino grueso contiene las cuatro tnicas encontradas en el resto del tubo digestivo: mucosa, submucosa, muscular y serosa. La mucosa del intestino grueso tiene un epitelio cilíndrico simple en todas las regiones, excepto la mitad inferior del conducto anal, donde cuenta con epitelio pavimentoso estratificado no queratinizado. Este último proporciona más resistencia a la abraccin causada por el paso de heces. No hay pliegues circulares o vellosidades en el intestino grueso, pero sí criptas intestinales. Son más profundas que las del intestino delgado y tienen mayor densidad que las células caliciformes; el moco es su única secreción significativa. La lámina propia y la submucosa tienen abundante tejido linfático que proporciona protección ante las bacterias que pueblan de manera densa el intestino grueso (Saladin, 2012).

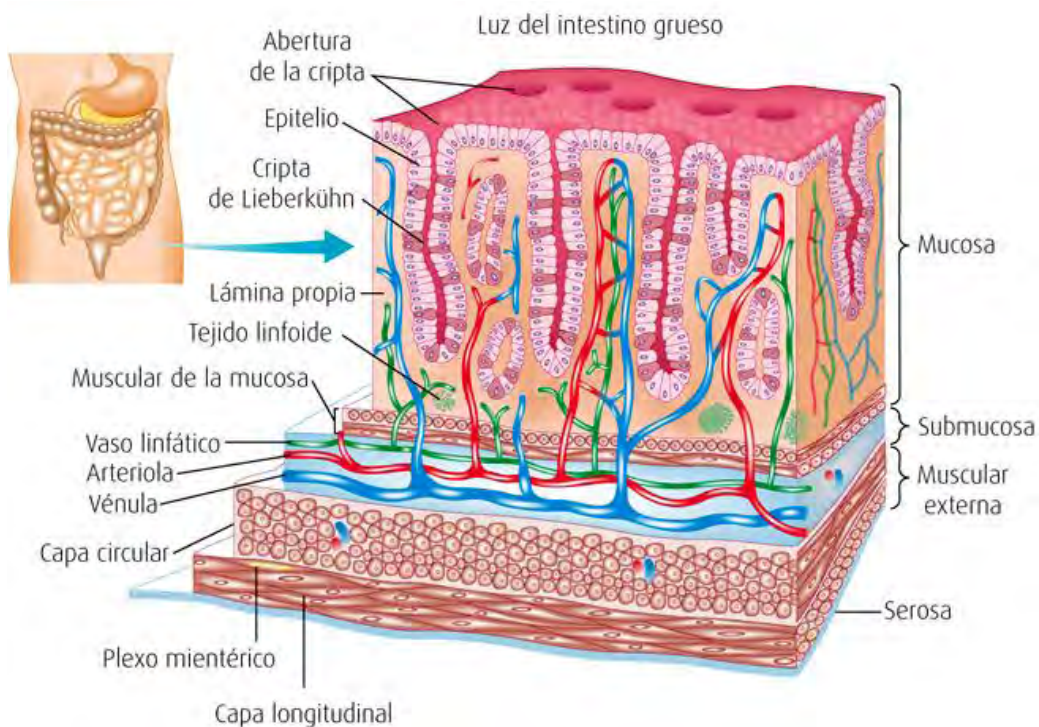


Figura 5. Histología del intestino grueso. (Tortora y Derrickson, 2015)

El paso del quimo del íleon al ciego está regulado por la acción del esfínter leocecal. Los movimientos del colon comienzan cuando las sustancias atraviesan la válvula ileocecal. A medida que los alimentos pasan por la válvula ileocecal, ocupan el ciego y se acumulan en el colon ascendente. El intestino realiza movimientos de peristaltismo, el movimiento final es el peristaltismo en masa, una fuerte onda peristáltica que comienza en la parte media del colon transversal y expulsa rápidamente el contenido del intestino hacia el recto (Tortora y Derrickson, 2015).

Cuando el quimo permanece en el intestino grueso entre 3 y 10 horas se vuelve sólido o semisólido por la absorción activa de agua y se denomina entonces material fecal o heces. Su composición química es de agua, sales inorgánicas, células epiteliales descamadas de la descomposición bacteriana, sustancias digeridas, pero no absorbidas, y partes indigeribles de alimentos (Tortora y Derrickson, 2015).

2.1.2 La microbiota normal

El intestino humano es el hábitat natural de una población numerosa, diversa y dinámica de microorganismos, principalmente bacterias, que se han adaptado a la vida en las superficies mucosas o en la luz del intestino. La microbiota intestinal es el ecosistema microbiano del intestino; incluye especies nativas que colonizan el tracto gastrointestinal para siempre y un grupo variable de microorganismos vivos que se detectan por periodos. Las bacterias nativas se adquieren al nacer, durante el primer año de vida, mientras que las bacterias en tránsito se adquieren a través de los alimentos, bebidas u otras fuentes (Polanco, 2015; Zamudio y cols., 2017).

La población microbiana del intestino incluye unos 100 billones de bacterias de unas 500 a 1000 especies distintas. La presencia de ciertas bacterias como parte de la microbiota intestinal es necesaria para una correcta nutrición y desarrollo corporal, así como para un adecuado mantenimiento del sistema inmune. La homeostasis intestinal es crítica para la extracción eficiente de energía de los alimentos y la protección frente a los microorganismos patógenos (Polanco, 2015).

Por su enorme capacidad metabólica, se ha considerado a la microbiota como un «órgano» imprescindible para la vida y con influencia en la salud y la enfermedad. Su composición presenta particularidades y características propias de cada individuo, pudiendo variar en función de la base genética, la dieta y la interacción con el medio ambiente (Del Campo y cols., 2017).

2.1.2.1 Composición de la microbiota

La densidad microbiana va aumentando a medida que avanzamos por nuestro tracto gastrointestinal. Así, en el duodeno la densidad es de unas 10^3 células/mL (principalmente *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Escherichia* y *Corynebacterium*), en el yeyuno es de unas 10^5 células/mL y en el colon asciende hasta unas 10^{12} células/mL (predominando *Bacteroidetes* y *Firmicutes*). La presencia de determinados núcleos bacterianos (géneros y especies concretas), así como de sus determinadas funciones metabólicas, permite definir una microbiota saludable en cualquier parte del tracto gastrointestinal. Ejemplos de taxones bacterianos que se han asociado con la salud y un adecuado funcionamiento digestivo son *Bacteroides*, *Bifidobacterium* y *Clostridium* (García y cols., 2015).

En este complejo ecosistema deben existir tanto microorganismos potencialmente patógenos como microorganismos beneficiosos para la salud humana, de tal manera que es muy difícil indicar aquellas especies que ejercen un papel beneficioso y aquellas que deben ser eliminadas por resultar perjudiciales para la salud humana.

El grupo de los denominados patógenos oportunistas está constituido por una serie de especies tanto de bacterias como de hongos que en determinadas circunstancias pueden dar lugar a enfermedad en el hombre. Así, la ausencia de la microbiota normal cambia las condiciones microambientales del intestino, y favorece el establecimiento de estos microorganismos oportunistas, que habitualmente no crecen en el tracto gastrointestinal porque no son capaces de competir con la microbiota, debido a mecanismos de exclusión competitiva entre poblaciones patógenas y no patógenas. (García y cols., 2015).

El grupo de los patógenos oportunistas se encuentran en una proporción muy baja en nuestra microbiota y son varias las especies bacterianas incluidas en el mismo, como *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Clostridium difficile*, *Bacteroides fragilis*, y entre los hongos la especie más representativa es *Candida albicans* (Cameán y Repetto, 2012).

Una función que se ha atribuido a la microbiota intestinal es la de la "resistencia de colonización". La microbiota intestinal parece ser en gran parte refractaria a la colonización por especies "invasivas" adicionales. La administración de antibióticos suprime a los miembros de la microbiota, lo que permite la expansión de microorganismos

preexistentes como *C. difficile* (normalmente mantenido a niveles bajos) o la germinación y posterior expansión de esporas de *C. difficile* adquiridas del entorno hospitalario (Chang y cols., 2008).

El desarrollo de la infección por *C. difficile* podría representar la rotura de la resistencia a la colonización, ya que se ha observado que en el tratamiento antibiótico estándar con metronidazol o vancomicina (el cual suprime a *C. difficile*), permite la recuperación de la microbiota. Esta idea se ve reforzada tras el estudio de la diversidad de la microbiota intestinal normal en individuos que presentan *C. difficile* recurrente. En estos pacientes, se ha observado que la riqueza de *phyla* es reducida, y que *C. difficile* pasa a ser uno de los microorganismos predominantes (Chang y cols., 2008).

Conocer bien la microbiota intestinal es determinante para esclarecer el papel que tienen las alteraciones que ocurren a este nivel con la aparición de ciertas enfermedades. Son múltiples las enfermedades que tienen su origen en gran parte, en la existencia de un trastorno de la microbiota intestinal, como es el caso de la diarrea infecciosa o la asociada al empleo de antibióticos (Polanco, 2015).

2.2 Clostridium difficile

2.2.1 Historia

Los primeros reportes de *C. difficile* como causante de enfermedad se dieron en 1893, cuando Finney describió el caso de una mujer joven con diarrea hemorrágica y pseudomembranas a nivel del colon (Walter y Lina 2012).

En 1935, Hall y O'Toole aislaron un nuevo microorganismo en las heces de los recién nacidos. Fue considerado parte de la microbiota normal y se le dio el nombre *Bacillus difficilis*. En 1972, Danielson y cols. Estudiaron la respuesta inmune a una infección mixta en un paciente con un absceso perirrectal del que aislaron *Bacteroides fragilis* ssp. Y *Clostridium difficile*. Estos investigadores demostraron por inmunofluorescencia indirecta que el paciente tenía anticuerpos frente a *C. difficile*. Sin embargo y durante varios años, *Clostridium difficile* siguió siendo considerado como un microorganismo saprófito sin ningún papel en la patología humana, puesto que la toxina del microorganismo no fue estudiada con detalle hasta los años 70 (Bernabeu y Martín 1992).

En 1977, debido a la dificultad de aislar el bacilo, dado que su crecimiento es relativamente lento en comparación con la mayoría de los otros miembros del género *Clostridium*, fue renombrado como *Clostridium difficile*. Ese mismo año, Larson y cols., encontraron que la colitis inducida por antibióticos era causada por *C. difficile*, y posteriormente, en 1978, Bartlett y cols. Demostraron que era también un agente causal de la colitis pseudomembranosa (CPM) (Álvarez y cols., 2017).

En este estudio, encontraron que estos pacientes presentaban altos niveles de citotoxicidad en las muestras de materia fecal, atribuyéndole en un principio a un agente viral, *Mycoplasma*, o a la toxina de algún otro tipo de bacteria, sin poderlos aislar en el laboratorio. Utilizando un “pool” de antisueros para varios clostridios, se logró en los pacientes en estudio la neutralización de la actividad citotóxica con suero anti-*C. sordelli*, logrando aislar con posterioridad a *C. difficile* de la materia fecal de esos pacientes, y gracias a esto, hoy en día, se puede asociar con el 90 a 100% de los casos de CPM, donde la población más susceptible son los ancianos mayores de 65 años (Walter y Lina, 2012).

Finalmente, fue durante el siglo xx cuando se identificó que posterior a la administración de antibióticos como aureomicina, cloranfenicol y clindamicina se presentaban casos de CPM, estableciéndose una fuerte correlación entre ambas a través de los años siguientes (Álvarez y cols., 2017).

2.2.2 Características de *Clostridium difficile*

Clostridium difficile aparece generalmente como un bacilo largo Gram positivo, de 6 a 8 micras de longitud y de 0.5 a 1 micra de anchura. Aunque las células son uniformemente Gram positivas en cultivos jóvenes, a menudo pierden esta característica en cultivos de más de veinticuatro horas. Tras cuarenta y ocho horas de incubación, produce esporas largas y ovals que alargan ligeramente y apenas deforman el coma bacilar. Estas esporas son subterminales cuando se forman, ya que existe un extremo terminal de protoplasma, pero este extremo desaparece en cultivos más avanzados dejando la espora en posición inequívocamente terminal (Bernabeu y Martín, 1992).

Es un microorganismo anaerobio estricto, activamente móvil por flagelos peritricos de 0.5-1.9 x 3.0-6.9 micras, formando algunas cepas cadenas de dos a seis células. Su temperatura de crecimiento oscila entre 30 y 37°C, siendo la última su temperatura óptima, sin embargo, algunas cepas pueden crecer entre 25 y 45°C (Bernabeu y Martín, 1992).

Sus colonias en medio de agar-sangre tienen de 2 a 5 mm de diámetro, son circulares, opacas, blanco grisáceas, ligeramente mamelonadas y de margen continuo. En el medio CCFA (clincloserina-cefoxitina-fructosa-agar) selectivo para *Clostridium difficile* las colonias presentan un tamaño algo mayor (alrededor de 7.5mm. de diámetro) son de color amarillo-anaranjado, planas, de bordes irregulares y varían el color inicial del medio de naranja a amarillo en 2-3mm. alrededor de las colonias, presentando además fluorescencia amarilla (Bernabeu y Martín, 1992).

Las colonias presentan un olor característico que recuerda a las heces de los caballos (un olor “como un establo de caballos”). Las esporas de *C. difficile* son la forma de transmisión, contribuyen a la supervivencia del microorganismo en el hospedero y son las responsables de la enfermedad recurrente tras la terminación de la terapia. Como otras esporas bacterianas, son metabólicamente inertes y sobreviven largos períodos de tiempo resistiendo a condiciones ambientales extremas y a tratamientos químicos (Pérez y cols. 2013).

Se aloja en el intestino grueso del ser humano, donde permanece en un estado de latencia. También puede hallarse en fuentes ambientales y en particular en los hospitales. Puede recuperarse y cultivarse a partir de pisos, orinales, ropa de cama de las habitaciones de un paciente colonizado con el microorganismo, así como de las manos y de las batas del personal médico y enfermeras (Castro, 2014).

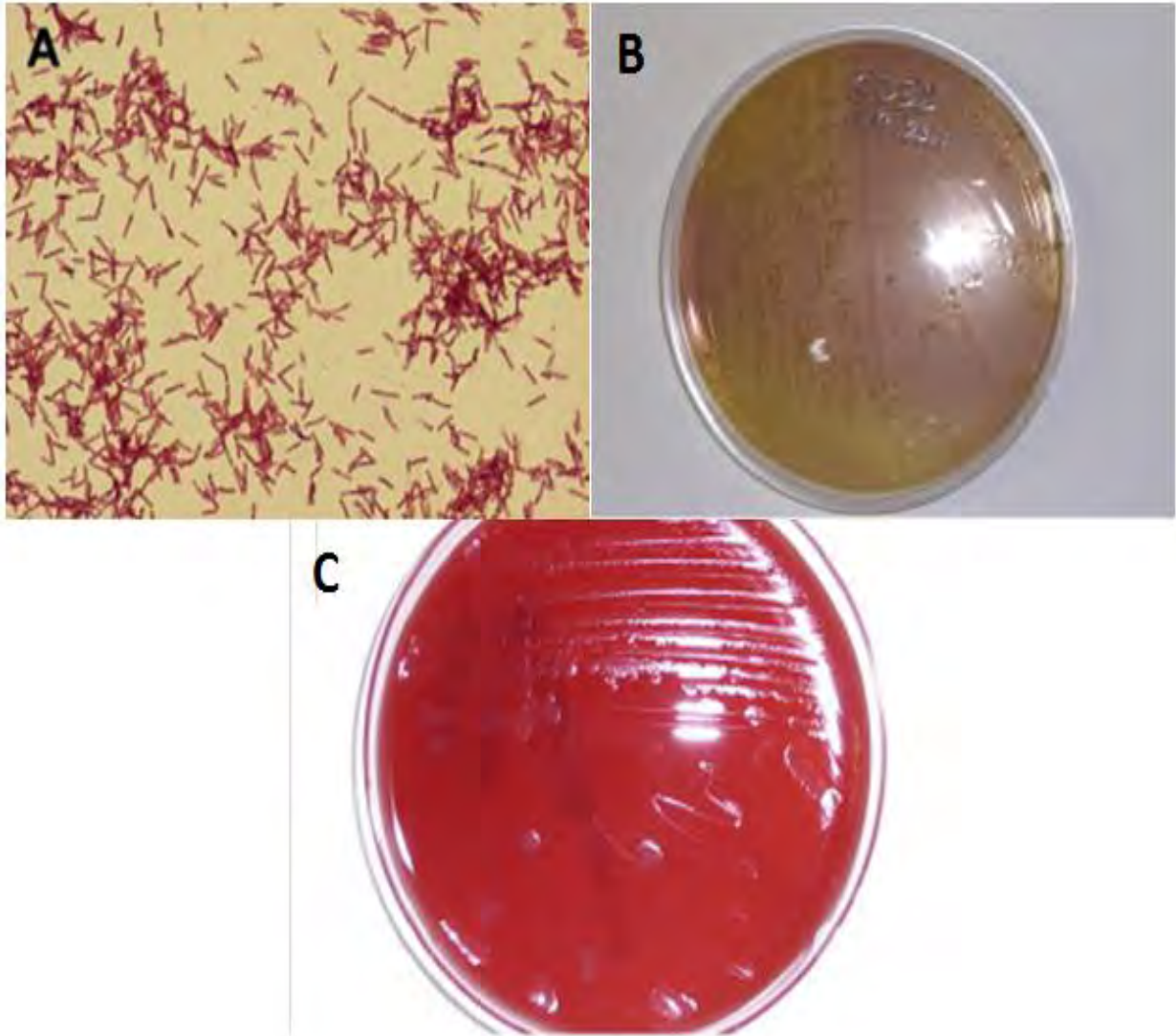


Figura 6 Características morfológicas de *Clostridium difficile*. (A) Tinción de Gram de *C. difficile* a partir de un crecimiento de 24 horas en agar soya tripticasa con un 5% de sangre de oveja. Los cuerpos celulares vegetativos a menudo son Gram negativos durante el crecimiento temprano; nótese la abundancia de endosporas subterminales que no engrosan la célula parental. (B) Un crecimiento de 48 horas de *C. difficile* en medio de agar selectivo típico, agar basal *C. difficile* con moxalactama y norfloxacin, CDMN, antibióticos selectivos para permitir el aislamiento primario de las muestras de heces. Otros medios usan combinaciones de cicloserina y cefoxitina como antibióticos selectivos (agar cicloserina cefoxitina fructosa). El rojo neutro se vuelve amarillo por el crecimiento de *C. difficile*. (C) Aspecto típico de colonias de *C. difficile* en agar tripticasa soja con 5% de sangre de oveja a las 48 horas. Las colonias no son hemolíticas (Curry, 2010).

2.2.3 Patogenia

C. difficile se propaga vía oral-fecal, pudiéndose ingerir en su forma vegetativa o en su forma esporulada, la cual puede sobrevivir largos periodos de tiempo en el entorno y atravesar el ambiente ácido estomacal (Álvarez y cols., 2017).

La acción patógena se desarrolla en el intestino del individuo. Las esporas de *C. difficile* toxigénico, previamente ingeridas por el individuo, germinan para dar lugar a las células vegetativas. (Beaugerie, 2004).

Pero *C. difficile* es un mal competidor, es decir, en condiciones normales, el TGI del humano posee una microbiota intestinal característica que le proporciona el equilibrio necesario para poder inhibir el crecimiento de ciertos patógenos para él, lo que se ha llamado “resistencia a la colonización”, por lo que *C. difficile* no es capaz de multiplicarse y por tanto secretar toxinas necesarias para producir algún tipo de patología, así que permanece en forma de spora hasta que las condiciones ambientales son adecuadas para su germinación (Walter y Lina, 2012; Alba, 2011).

Las patologías de carácter intestinal asociadas a *C. difficile* suelen estar ligadas a elementos que originan una disrupción en la microbiota intestinal y “vaciado” de nichos (Beaugerie, 2004), el más común es el tratamiento con antibióticos de amplio espectro, que puede ocasionar en el individuo una alteración de esta microbiota permitiendo que *C. difficile* aproveche este desequilibrio para replicarse en grandes cantidades y causar daño a través de la producción de sus toxinas que inician una serie de fenómenos que culminan con la pérdida de la función de barrera que poseen las células epiteliales, la aparición de diarrea y la formación de pseudomembranas (Walter y Lina, 2012; Rodríguez y cols., 2013).

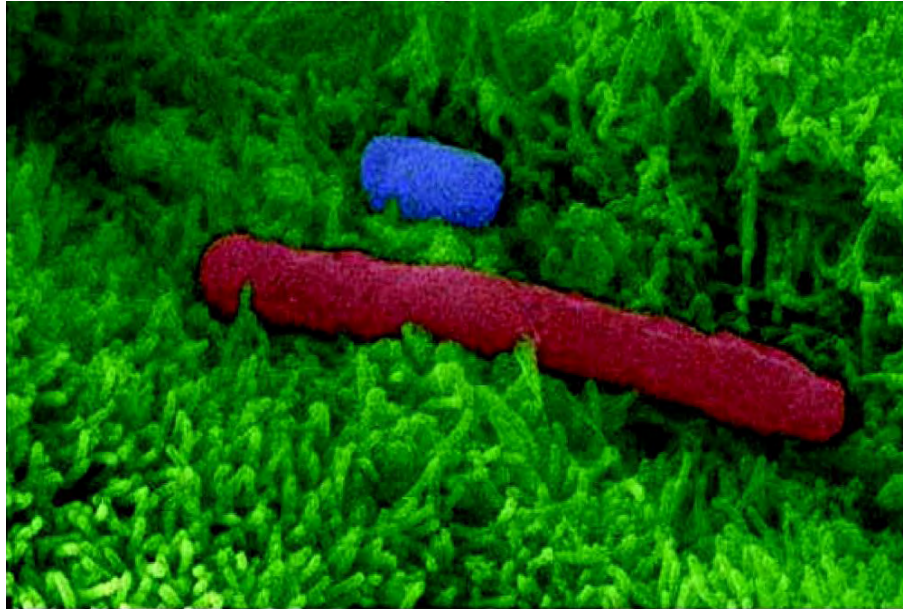


Figura 7. Las esporas y células vegetativas de *C. difficile* se adhieren al epitelio intestinal del hospedero. En la micrografía electrónica de barrido de alta resolución con color falso se observa una espora (Azul) y una célula vegetativa (roja) de *C. difficile* que se adhieren a las células epiteliales intestinales humanas (verde) crecidas en cultivo (Vedantam, 2012).

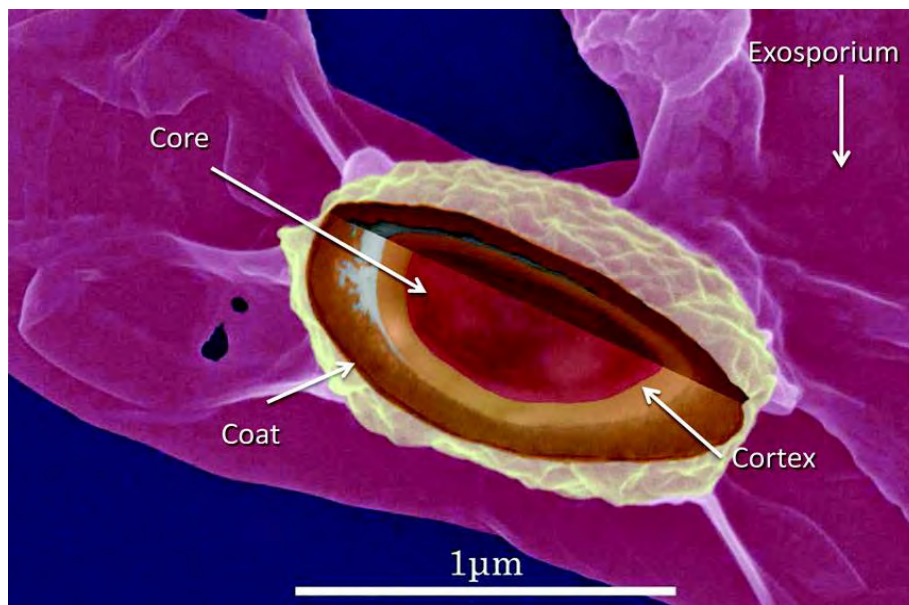


Figura 8. Superficie de esporas de los aislados clínicos de *C. difficile*. Se muestra una micrografía electrónica de barrido de alta resolución superpuesta con datos de una micrografía electrónica de transmisión de la morfología de las esporas de la cepa VP110463 de *C. difficile* inmobilizada en una superficie sólida. La disposición ordenada de los complejos de la proteína de la espora es claramente visible, al igual que una estructura exosporial (de forma difusa y que rodea la espora) (Vedantam, 2012).

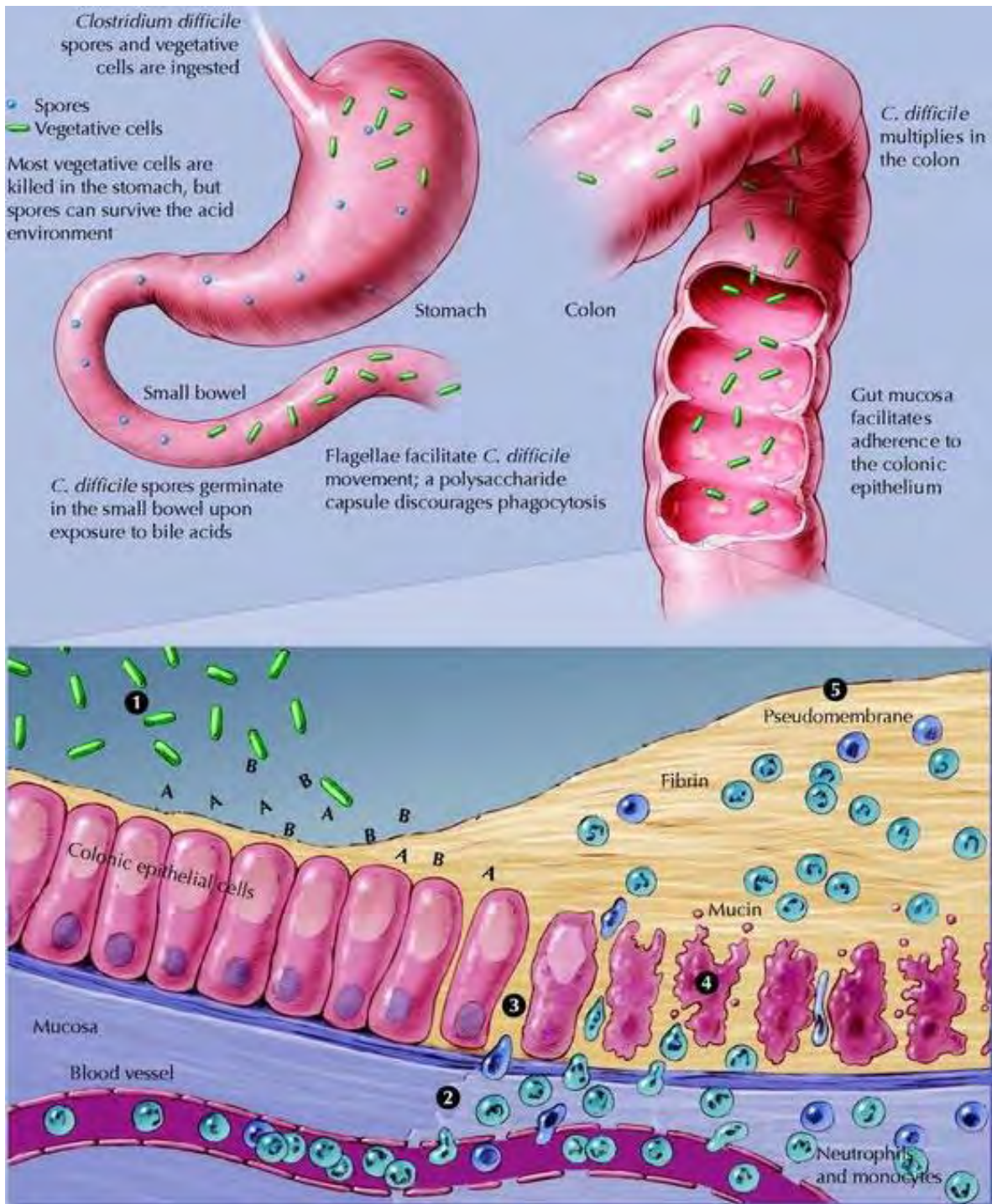


Figura 9. Patogenia de la infección por *Clostridium difficile*. Las formas vegetativas de *C. difficile* al llegar al colon producen toxinas A y B asociadas a enzimas hidrolíticas (1). Las toxinas A y B conllevan a la producción de citocinas proinflamatorias lo que provoca un aumento de la permeabilidad vascular y reclutamiento de neutrófilos y monocitos (2), con alteración de uniones intercelulares de la barrera epitelial (3) y la apoptosis de células epiteliales (4). La producción local de enzimas hidrolíticas lleva a la degradación del tejido conectivo con la formación de pseudomembranas (5) (Meyer, 2014. Modificado).

2.2.4 Factores de virulencia de *C. difficile*

2.2.4.1 Toxinas

a) Producción de Toxinas A y B

Al igual que ocurre con otras especies del género *Clostridium*, los principales factores de virulencia de *C. difficile* son toxinas de naturaleza proteica. Las principales toxinas que produce *C. difficile* son la toxina A o enterotoxina (308 kDa), la toxina B o citotoxina (270 kDa), y una tercer toxina denominada toxina binaria (CDT). La secreción de toxinas ha sido, sin duda, el factor de patogenicidad más estudiado (Alcalá y cols., 2017; Alba, 2011).

b) Locus de Patogenicidad

Todas las cepas de *C. difficile* toxigénico presentan un locus de patogenicidad (PaLoc) que mide unos 19,6 Kb. Este locus está formado por cinco genes (*tcdA*, *tcdB*, *tcdC*, *tcdE* y *tcdR*). Los genes *tcdA* y *tcdB* codifican dos toxinas, toxina A y B, respectivamente, ambas responsables de la patogenicidad de *C. difficile* (Rodríguez y cols., 2013).

El gen *tcdR* (o *tcdD*) que alcanza su expresión máxima en la fase estacionaria del crecimiento de *C. difficile*, es un factor sigma que se encuentra río arriba del gen *tcdB* (Alcalá y cols. 2017; Vega, 2008). Los factores sigmas son fragmentos de la cadena de DNA, con secuencias específicas que actúan como promotores de los genes *tcdA* y *tcdB*. De este modo, la RNA polimerasa, la enzima que sintetiza el RNA, se une a esta región como punto de partida para la síntesis del RNA mensajero para estas dos proteínas. Este gen se considera, por tanto, un regulador positivo de la síntesis de las toxinas A y B, ya que su bloqueo inhibiría las síntesis de las toxinas (Alba, 2011).

El gen *tcdC* que se encuentra río abajo del gen *tcdA* actúa como regulador negativo, evitando la expresión de todo el PaLoc (Vega, 2008). Este gen codifica para una proteína de 231 aminoácidos y se transcribe en dirección opuesta a los genes *tcdA* y *tcdB*, cuya expresión es máxima en la fase exponencial temprana, reduciéndose conforme la bacteria se va acercando a la fase estacionaria (Alcalá y cols., 2017).

Esta proteína parece asociarse a la membrana celular de la bacteria. Se ha observado que cepas mutantes para este gen tienen una mayor toxicidad, llegando a aumentar el poder tóxico 16 veces para la toxina A y 23 veces para la toxina B si la mutación fuera la delección de 18 pb, como ocurre en la cepa con ribotipo 027 (Alba, 2011).

Finalmente, el gen *tcdE* también llamado dominio de translocación-inserción a la membrana, es un ORF o región de lectura abierta (Open Reading Frame) de 501 pb situada entre los genes *tcdA* y *tcdB*, a 122 pb río abajo del codón de paro (stop) de *tcdB* y 727 pb río arriba del codón de inicio de *tcdA*. Este gen codifica una proteína putativa, teóricamente de 166 aminoácidos y 19 kDa, altamente hidrofóbica, lo que permite aumentar la permeabilidad de la membrana “blanco”. Este péptido presenta una estructura muy similar a las proteínas “holin” bacterianas que participan en el proceso de formar un “punto de salida” para metabolitos bacterianos, por lo cual se especula que el papel de esta proteína denominada “holina” está relacionado con la liberación de las toxinas A y B al espacio extracelular, ya que ninguna de las toxinas tienen un péptido señal para salir de la bacteria. Esta proteína se sintetiza si el marco de lectura comienza en el primer codón de inicio descrito; si la transcripción comenzara en otro de los dos codones descritos hasta la fecha se asume que se traducirían proteínas estructural y funcionalmente diferentes (Tan y cols., 2001; Alba, 2011).

La estructura de este locus ha cobrado importancia tras el hallazgo de cepas toxina A, toxina B, toxina binaria y de cepas hipervirulentas (001, 017, 027 y 078), por las implicaciones que han demostrado tener pequeñas mutaciones en el conjunto de los cinco genes en la virulencia del microorganismo. Cabe mencionar que en las cepas no toxigénicas el locus de patogenicidad está sustituido por un fragmento de DNA de 115 pb, que corresponden a una región no codificante (Alba, 2011; Vega, 2008).

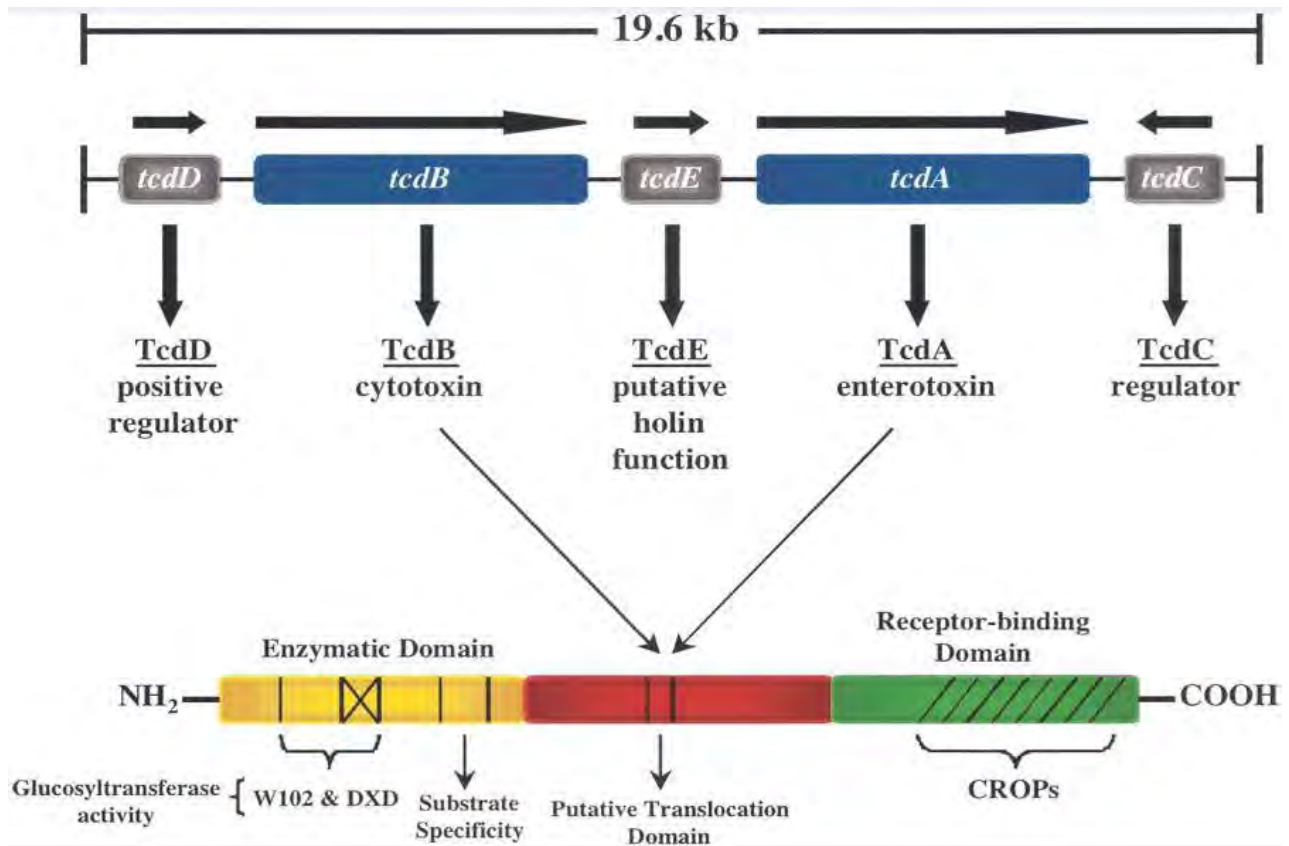


Figura 10. Disposición genética del locus de patogenicidad (PaLoc) en la que se localizan los genes de las toxinas A y B de *Clostridium difficile* y sus genes reguladores (Voth y Ballard, 2005).

c) Dominios funcionales

La toxina A, o enterotoxina se considera que es el principal contribuyente al daño intestinal causado por *C. difficile*. Está formada por tres dominios funcionales. El extremo N-terminal es el dominio que presenta la acción catalítica responsable de la toxicidad. Esta es la única región que penetra en la célula del hospedador, mediante autoproteólisis de la toxina (Qa'Dan, 2000; Rupnik, 2008).

La parte que se introduce en la célula diana es un péptido de 543 aminoácidos, muy similar a las glucosiltransferasas bacterianas de la familia de las GT-A. El extremo C-terminal es el responsable de la unión de la toxina al receptor de la célula diana. Está constituido por secuencias peptídicas repetidas, características de los clostridios, cuya estructura secundaria es de tipo horquilla β . La zona central, llamada dominio de translocación, abarca más del 50% del tamaño de la proteína. Contiene una secuencia hidrofóbica de anclaje de la proteína en la membrana celular del enterocito (Giessemann y cols., 2008; Alba, 2011).

La toxina B es la segunda de las toxinas que encontramos en el *locus* PaLoc; se considera que es la responsable de la intoxicación sistémica. Tiene una estructura funcional y secuencia de aminoácidos muy similar a la de la toxina A. El mecanismo de acción es prácticamente idéntico al de la toxina A. Se diferencia en los receptores celulares (Qa'Dan, 2000; Alba, 2011).

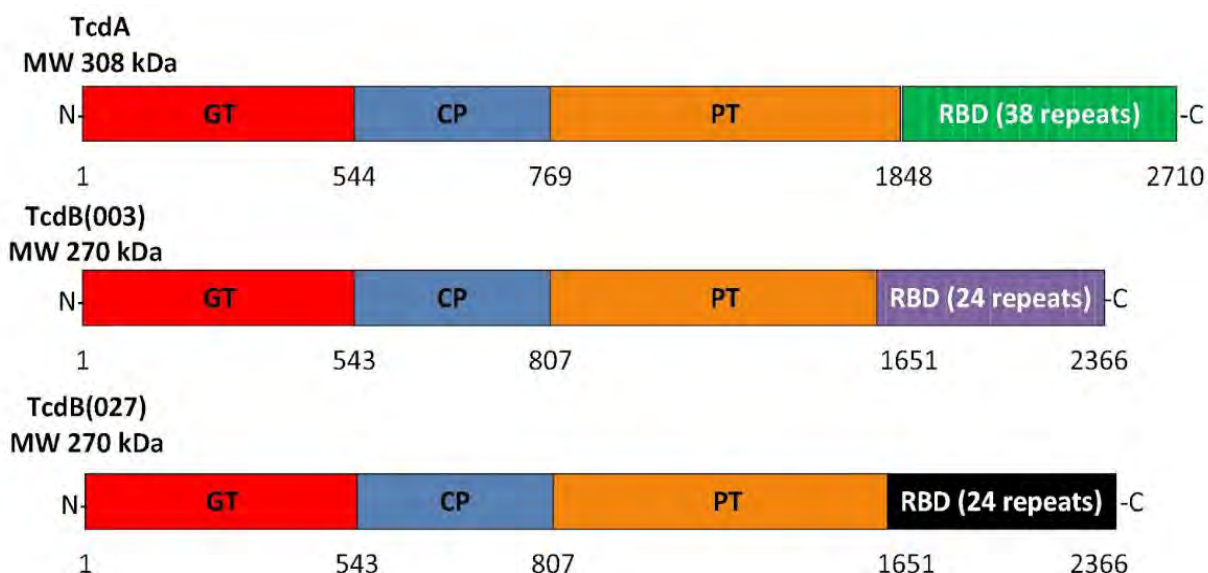


Figura 11. Dominios funcionales de *tcdA* y *tcdB* (Tian y cols., 2017).

d) Mecanismo de acción

Las toxinas A y B utilizan un mecanismo de acción bien definido para modular la fisiología celular y, en consecuencia, alterar el entorno del hospedero. Estas dos toxinas, junto con los otros miembros de la familia de toxinas clostridiales, pertenecen a la superfamilia Ras de pequeñas GTPasas para su modificación mediante glicosilación (Voth y Ballard, 2005).

Esta modificación irreversible inactiva estas pequeñas proteínas reguladoras, lo que lleva a la interrupción de las vías de señalización vitales en la célula. Sin embargo, además de la modificación enzimática de los objetivos, hay varios pasos importantes en la unión al receptor y la entrada de células que son importantes para la intoxicación. (Voth y Ballard, 2005)

- Receptores de *tcdA* y *tcdB* en la superficie celular

La unión al receptor significa el primer paso “clave” en el proceso de entrada de las toxinas a la célula “blanco”. En el caso de *tcdA*, su receptor es el disacárido Gal1-3Gal1-4GlcNac, el cual se encuentra en los antígenos del grupo sanguíneo Lewis I, X y Y presentes en un variedad de células y se ha demostrado que estos antígenos actúan como receptores para *tcdA* (Tucker y Wilkins, 1991).

Varias especies de animales susceptibles a *tcdA* pueden no mostrar necesariamente receptores idénticos. Por ejemplo, un estudio realizado por Krivan y cols., en 1986 señala que *tcdA* se une al sacárido Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc, sin embargo, este receptor no parece estar presente en las células humanas (Voth y Ballard, 2005).

Por otro lado, Pothoulakis y cols. en 1996, comprobaron en un estudio que el tratamiento de células “blanco” con la enzima galactosidasa reducía la unión de *tcdA* a sus receptores, debido quizá a que un posible receptor proteico, la sacarosa-isomaltasa, interfería en la interacción, cabe mencionar que esta enzima se encuentra en las células del íleon de conejo, pero está ausente en células del colon humano. Estas definiciones dejan ver con claridad que aún no se detecta con certeza al receptor proteico para la *tcdA*. Análogamente, el receptor de la *tcdB* no se ha logrado caracterizar, y hasta el momento, se acepta que la toxina afecta a un amplio rango de tipos celulares, lo cual sugiere que su receptor podría catalogarse como ubicuo (Voth y Ballard, 2005).

- Endocitosis mediada por receptor y translocación a la membrana

Una vez que las toxinas han reconocido a su receptor sufren autoproteólisis, y el extremo N-terminal es fagocitado por lo que inicia el proceso de entrada a la célula blanco, a través de endocitosis; es decir, tiene lugar una invaginación de la membrana citoplasmática para formar una vesícula denominada endosoma, que posteriormente se fusiona con el lisosoma para digerir el contenido endosómico (Alba, 2011; Vega, 2008).

Durante el evento, las toxinas suelen escapar del endosoma, debido a que el pH ácido en el interior de este comportamiento promueve que se generen cambios estructurales en ellas: se expone su dominio hidrofóbico *tcdE* y ello permite la salida de *tcdA* y *tcdB* al citosol (Qa'Dan, 2000).

- Blancos intracelulares de las toxinas de *C. difficile* y muerte celular

Después de la internalización al citosol por parte de *tcdA* y *tcdB*, ambas toxinas se dirigen a sus blancos específicos: la familia Rho de proteínas de unión a GTP de bajo peso molecular, que incluye: Rho, Rac y Cdc42 (Nusrat y cols., 2001). Estas proteínas constituyen una subfamilia de las proteínas Ras GTPasa. Las proteínas Rho están implicadas en los procesos de señalización celular, como por ejemplo la regulación del citoesqueleto de actina, por la polimerización y despolimerización de la actina (pasando de actina-G a actina-F), la adhesión, la migración, la polaridad celular, actividades enzimáticas, en la transcripción de genes e incluso en la apoptosis (Nusrat y cols., 2001; Voth y Ballard, 2005).

Las toxinas catalizan la glucosilación de la proteína Rho GTPasa, lo que bloquea su activación. De este modo inhibe su acción e impide su paso de la membrana al citosol. Esta actividad molecular se traduce en un redondeamiento de la célula por despolimerización de la actina-F, ruptura de uniones íntimas (“right junctions”) con las células vecinas del epitelio y muerte por apoptosis (Giessemann y cols., 2008).

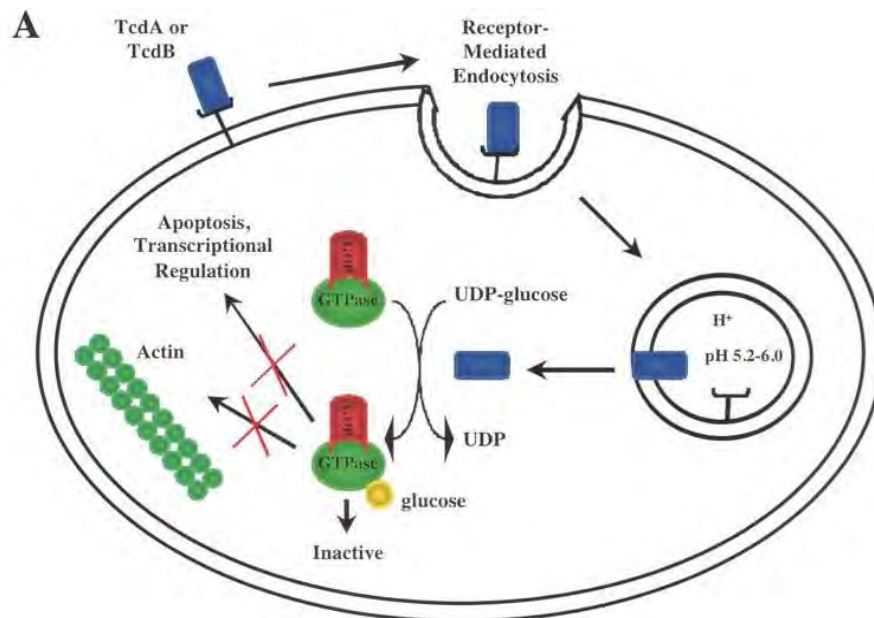


Figura 12. Visión general de las modificaciones intracelulares de *tcdA* y *tcdB*. Tanto *tcdA* como *tcdB* actúan como glucosiltransferasas, modificando e inactivando a Rho, Rac, y Cdc42. Los efectos resultantes incluyen la condensación de actina, la pérdida de la regulación transcripcional y la apoptosis (Voth y Ballard, 2005).

e) Papel de las toxinas en la enfermedad

En la colitis pseudomembranosa, uno de los efectos atribuidos a las dos toxinas consiste en la ruptura de las “right junctions”, lo que altera la integridad del epitelio entérico (Feltis et al, 2000). Dicho trastorno genera una vía de paso de los neutrófilos hacia el lumen del intestino, lo que contribuye notablemente a la formación de las características pseudomembranas sobre el epitelio (Voth y Ballard, 2005.)

La toxina A actúa como un potente proinflamatorio. En las células en las que penetra activa el NF- κ B, el cual favorece la síntesis y liberación de sustancias quimioatrayentes como las interleucinas (IL) o las prostaglandinas (PGs). Además, en cultivos celulares de monocitos, se ha comprobado que activa la liberación de IL-1, IL-6, TNF- α y de IL-8 (Pothoulakis y LaMont, 2001). El TNF- α y las interleucinas desencadenan una respuesta inmunitaria mayor, que deriva en la formación de la pseudomembrana. Estos efectos se han contrastado con estudios a nivel de órgano, en intestino de conejo, observándose que la toxina A provoca necrosis celular, así como un aumento de la permeabilidad intestinal (Voth y Ballard, 2005).

La toxina A activa el NF - κ B de todos los tipos celulares. En concreto, en los macrófagos de la lámina propia, el efecto de esta activación es la subsecuente activación de las rutas que conducen a la síntesis de ciclooxigenasa-2 (COX2). COX2 es una de las enzimas que participa en la ruta de la síntesis de las PGs, principalmente prostaglandina E2 (Alcántara y cols., 2001).

La activación de la prostaglandina E2 inhibe la absorción de cloruro sódico y agua por los enterocitos e induce la secreción de cloruro sódico, lo que conlleva a la salida masiva de agua de las células intestinales. La prostaglandina E2 también interviene en la vasodilatación, favoreciendo la salida de sangre a través de la mucosa intestinal. Como consecuencia, se daña el borde en cepillo de la membrana celular y el vello intestinal, pudiéndose erosionar la mucosa completamente. El síntoma visible es un fluido viscoso y sanguinolento (Alcántara y cols. 2001; Kim y cols., 2002).

Es importante señalar que varios estudios demuestran que muchos de los efectos inflamatorios y secretorios disminuyen con la administración de inhibidores del factor activador de plaquetas, de la fosfolipasa A2 y de la síntesis de PGs (Kim, 2002).

A nivel inflamatorio, la IL-8 liberada por los monocitos estimula la migración de neutrófilos desde la lámina propia hasta el lugar concreto donde se está produciendo la infección. La liberación de IL-8 se mantiene en el tiempo porque las toxinas pueden dañar a las mitocondrias, lo que implica una disminución de la concentración de ATP y un aumento de los radicales libres de oxígeno. La alta concentración de estos últimos activa el NF- κ B, que desencadena la liberación de IL-8 por el enterocito (He y cols., 2002).

La toxina A puede afectar el sistema nervioso. Por un lado estimula las neuronas sensoriales primarias y favorece la liberación de sustancia P por parte de estas. La sustancia P corresponde a un pequeño péptido que se encuentra en el tejido intestinal y en el sistema nervioso central, actúa como neurotransmisor y se le ha asociado con la diarrea inflamatoria, además, actúa como otra sustancia proinflamatoria más, determinante en la presentación clínica de la enfermedad. El mecanismo por el cual la toxina A modula la producción de la sustancia P aún se desconoce, pero se ha demostrado que la sustancia P inhibe la liberación de noradrenalina por las fibras nerviosas simpáticas postganglionares del intestino delgado. La falta de noradrenalina genera un estado de hiperestimulación de las neuronas secretomotoras entéricas, que se traduce en una mayor secreción de agua y sales a la luz intestinal por los enterocitos (Calderón y cols., 1998; Mantyh y cols., 1996; Pothoulaski, 1996; Alba, 2011).

Los efectos de la toxina A que contribuyen a la generación de la colitis pseudomembranosa se pueden resumir de la siguiente manera (Vega, 2008):

- Aumento de la permeabilidad epitelial
- Producción de citocinas y quimiocinas
- Infiltración de neutrófilos
- Activación de las neuronas de la submucosa
- Producción de intermediarios reactivos de oxígeno
- Activación de mastocitos, macrófagos y monocitos
- Producción de sustancia P
- Daño directo de la mucosa intestinal

Por otro lado, a nivel celular se ha comprobado que la toxina B tiene una citotoxicidad entre 10 y 10000 veces mayor que la toxina A. Diversos estudios habían establecido que la toxina B no causaba daño en el intestino a menos que la toxina A estuviera presente, e inclusive, se concluía que ambas toxinas actuaban de manera sinérgica (Keel y Songer, 2006). Sin embargo, estudios más recientes han rechazado esta hipótesis, ya que se ha venido incrementando el número de reportes sobre aislados clínicos de cepas de *Clostridium difficile* *tcdA* negativas (*tcdA*-) pero *tcdB* positivas (Drudy y cols., 2006), por lo que se demuestra que la actividad de las toxinas es independiente y que no es necesario que estén presentes ambas para provocar daños en el hospedador (Alba, 2011).

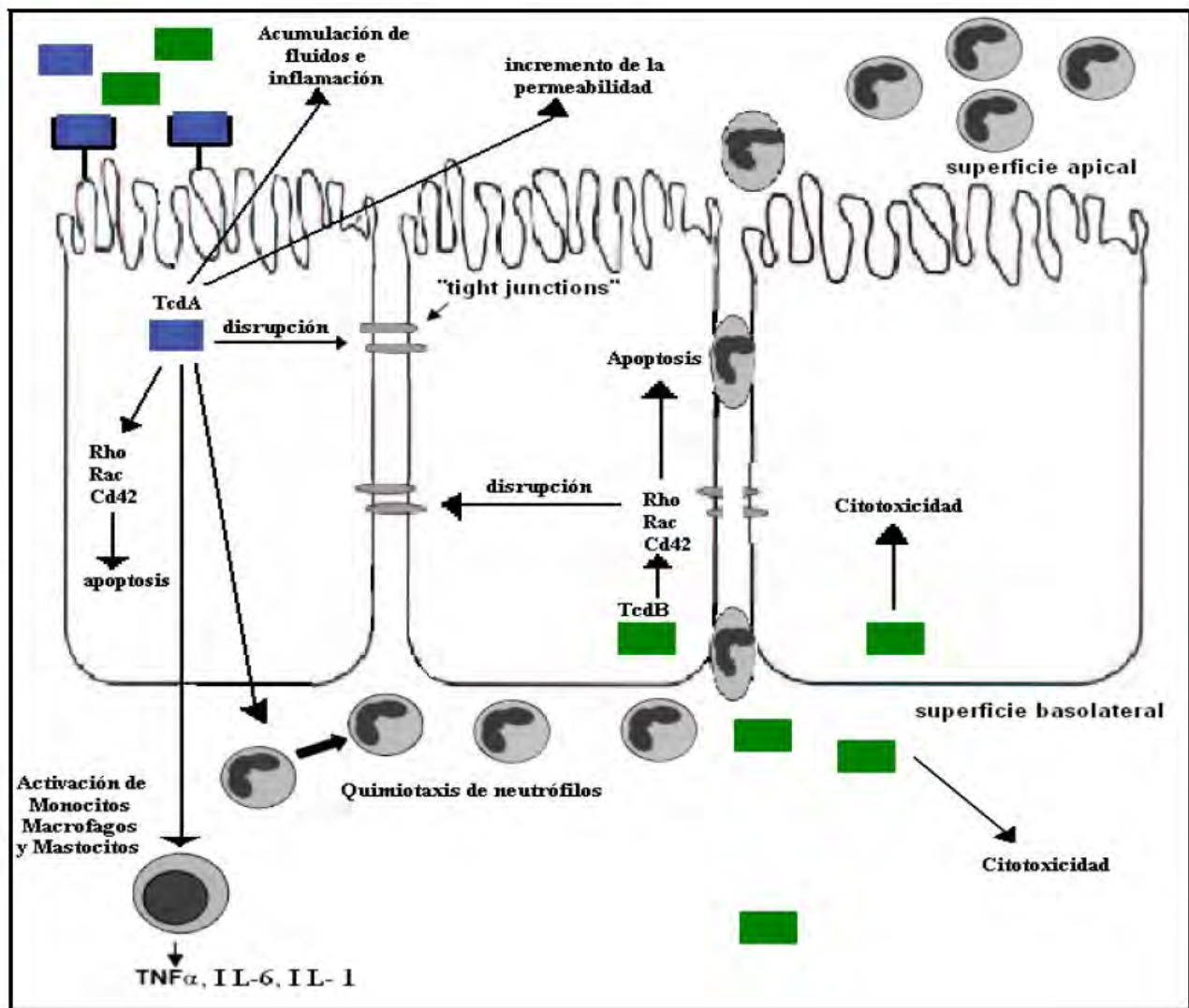


Figura 13. Efectos celulares de *tcdA* y *tcdB* en el epitelio intestinal (Voth y Ballard, 2005).

f) Toxina Binaria

Además de las dos grandes toxinas clostridiales (*tcdA* y *tcdB*), algunas cepas de *Clostridium difficile*, producen una ADP-ribosiltransferasa específica de actina, denominada toxina binaria (CDT por *Clostridium difficile* binary toxin), descrita por primera vez por Popoff y cols., en 1988. La frecuencia de las cepas que la sintetizan fluctúa entre 8.3% y 23.5%, habiéndose detectado la toxina en heces de humanos y de algunos equinos y caninos (Gonçalves et al., 2004; Rupnik, 2008).

La toxina binaria no está relacionada genética ni estructuralmente con las toxinas A y B y se cataloga dentro del grupo de las toxinas binarias clostridiales. Está formada por dos subunidades independientes, ambas imprescindibles para ejercer el efecto tóxico, *cdtA* y *cdtB*. La subunidad *cdtA* es un dominio enzimático de 48 kDa, la cual funciona como una ADP-ribosiltransferasa, siendo el componente que se introduce en las células y ejerce la acción tóxica. Por otro lado, *cdtB* es un dominio de unión de 99 kDa, es decir, es la parte que se une al receptor celular (Gonçalves et al., 2004; Considine y Simpson, 1991).

El componente de unión *cdtB* reconoce un receptor de la superficie celular, lo que resulta en la internalización del componente enzimático (*cdtA*) en el citosol, la región C-terminal de esta subunidad ejerce la acción tóxica al catalizar la ribosilación de la actina, con la consiguiente desorganización del citoesqueleto de la célula diana. En la célula afectada se observa un redondeamiento por la despolimerización de los filamentos de actina (Gonçalves et. al, 2004; Aktories y Wegner 1992).

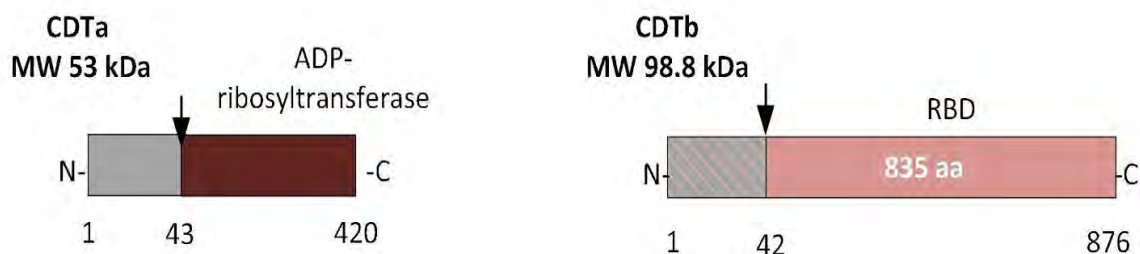


Figura 14. Dominios funcionales de la toxina binaria de *Clostridium difficile* (Tian y cols., 2017).

2.2.4.2. Adhesinas

La primera indicación de que *C. difficile* se adhiere al intestino humano se obtuvo en 1979 después de su recuperación de una muestra de biopsia de un paciente con CPM. La adhesión hospedero-bacteria requiere adhesinas bacterianas que son básicamente proteínas de la superficie. Varias adhesinas de *C. difficile* ahora se han caracterizado aunque su papel en la patogénesis de la ICD no está claro para algunas de ellas (Janoir, 2016).

a) *Proteínas de superficie de la capa y de la pared celular*

Algunos organismos Gram-positivos, incluyendo *C. difficile*, poseen una capa de superficie celular proteinácea, o capa-S, que ha sido implicado en la adhesión bacteriana a los tejidos del hospedero. La capa-S de *C. difficile* se compone de numerosas proteínas dispuestas en una red cristalina, con proteína de la superficie de la capa A (SlpA) siendo la especie predominante. SlpA y otras proteínas de la superficie de la capa (SLP) también son un subconjunto de una clase más amplia de moléculas conocidas como proteínas de la pared celular (CWP) (Vedantam y cols., 2012).

Estas últimas son las principales proteínas de superficie celular de *C. difficile* y entre ellos hay dos componentes de proteínas, las proteínas de bajo peso molecular (LMW-SLP) y las proteínas de alto peso molecular (HMW-SLP), que son componentes de la capa S. Pero hay otras proteínas, como Cwp66, Cwp84 y CwpV. Estas proteínas se consideran posibles factores de virulencia que rodean toda la superficie externa de la bacteria y juegan un papel clave en el contacto del patógeno y el sistema inmune del hospedero (Gonçalves y cols., 2017).

Calabi y cols., 2002, han demostrado que aunque la SLP en *C. difficile* no son el antígeno de superficie principal, este desempeña un papel en la patogénesis de ICD y es responsable para el reconocimiento de los enterocitos. Además, varias funciones se asignan a las SLP, incluyendo la absorción de nutrientes, la exclusión de sustancias nocivas, la actividad no fagocítica y la ayuda en la colonización (Gonçalves y cols., 2017).

b) *Proteínas de unión a fibronectina*

Las proteínas de superficie que utilizan muchas bacterias para reconocer moléculas de la matriz adhesiva de células hospederas tienen receptores que incluyen proteínas de superficie celular hospedera, tales como fibronectina, laminina, colágeno y fibrinógeno (Vedantam y cols., 2012).

La proteína Fbp68, asociada a la superficie, es capaz de unirse a la fibronectina soluble e inmovilizada. Por lo tanto la fibronectina podría actuar como un puente entre *C. difficile* y las células huésped. Sin embargo, estudios han revelado que la ausencia de esta proteína no tiene impacto en la tasa de adhesión de *C. difficile* a diversas líneas de células. Otros resultados sugieren que Fbp68 podría desempeñar un papel en el proceso de colonización (Janoir, 2016).

Se han identificado otras proteínas que funcionan como adhesinas como la proteína de unión CbpA la cual se une a colágeno, lipoproteína CD630 la proteína de choque térmico GroE; sin embargo, no se conocen con exactitud sus mecanismos de acción (Janoir, 2016).

2.2.4.3 Flagelos

Los flagelos son factores de colonización importantes para varias especies enteropatógenas, incluidas *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* y *Listeria monocytogenes*. Las cepas de *C. difficile* expresan flagelos peritrómicos (Figura 14), aunque la expresión flagelar y su fenotipo de motilidad asociada es variable entre las diferentes cepas (Vedantam y cols., 2012).

C. difficile es móvil gracias a la presencia de un aparato flagelar. En *C. difficile*, genes implicados en la motilidad se expresan en niveles altos durante la fase de crecimiento exponencial y se sugiere que los genes flagelares se expresan durante la fase de colonización muy temprana y podrían estar involucrados en el proceso de colonización. Además, la producción de anticuerpos anti-flagelina específicos en pacientes indica que los flagelos se expresan durante el curso de ICD en los seres humanos (Janoir, 2016).

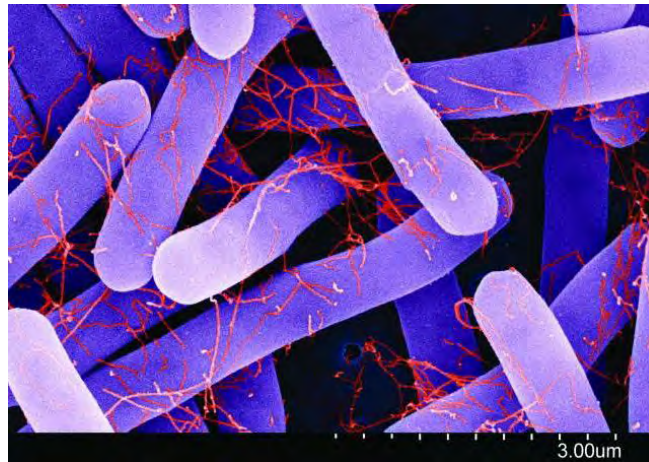


Figura 15. Los aislamientos clínicos de *C. difficile* producen flagelos. Micrografía de barrido electrónico de alta resolución y falso color de una cepa del ribotipo 001 de *C. difficile*. Los flagelos (rojos) son claramente visibles en las células vegetativas (violeta) después del crecimiento a la fase exponencial en el medio de infusión cerebro-corazón suplementado con levadura y cisteína. Las mediciones biofísicas indican que los flagelos tienen un diámetro de 17-22 nm, consistentes con los descritos en otras bacterias entéricas. (Vedantam y cols., 2012).

2.2.4.4 Fimbrias

Algunas cepas de *C. difficile* poseen fimbrias mientras que otros no lo hacen. Análisis han mostrado que no existe correlación entre la presencia de fimbrias y la capacidad de causar enfermedad en humanos o animales ya que un análisis más reciente ha identificado cepas que causan enfermedades humanas que no contienen fimbrias, lo que sugiere que las fimbrias pueden no ser importante en la patogénesis de la enfermedad de este organismo (Awad, 2014).

2.2.5 Toxinotipos de *Clostridium difficile*

Si bien, las investigaciones principales en *tcdA* y *tcdB* se han basado en la cepa de referencia VPI 10463, está claro que existen diversas variantes genéticas de estas toxinas en aislamientos clínicos. Algunas de estas variantes de toxina incluyen híbridos que se han producido debido al intercambio genético entre clostridios productores de grandes toxinas clostridiales. Más comúnmente, variaciones de sutiles secuencias, eliminaciones y duplicaciones dentro del locus de patogenicidad dan origen de varios toxinotipos de *C. difficile* (Voth y Ballard, 2005).

Con estas variaciones de secuencia, Rupnik y cols., desarrollaron un confiable sistema de tipificación, basado en el polimorfismo del PaLoc del microorganismo, que involucra deleciones e inserciones en los genes *tcdA*, *tcdB* y en los fragmentos accesorios *tcdR*, *tcdE* y *tcdC*. Hasta la fecha se han descrito 22 toxintipos de *C. difficile*, tomando como referencia a la cepa VPI 10463, la que por obvio corresponde al toxintipo 0 (Rupnik y cols., 1998; Voth y Ballard, 2005).

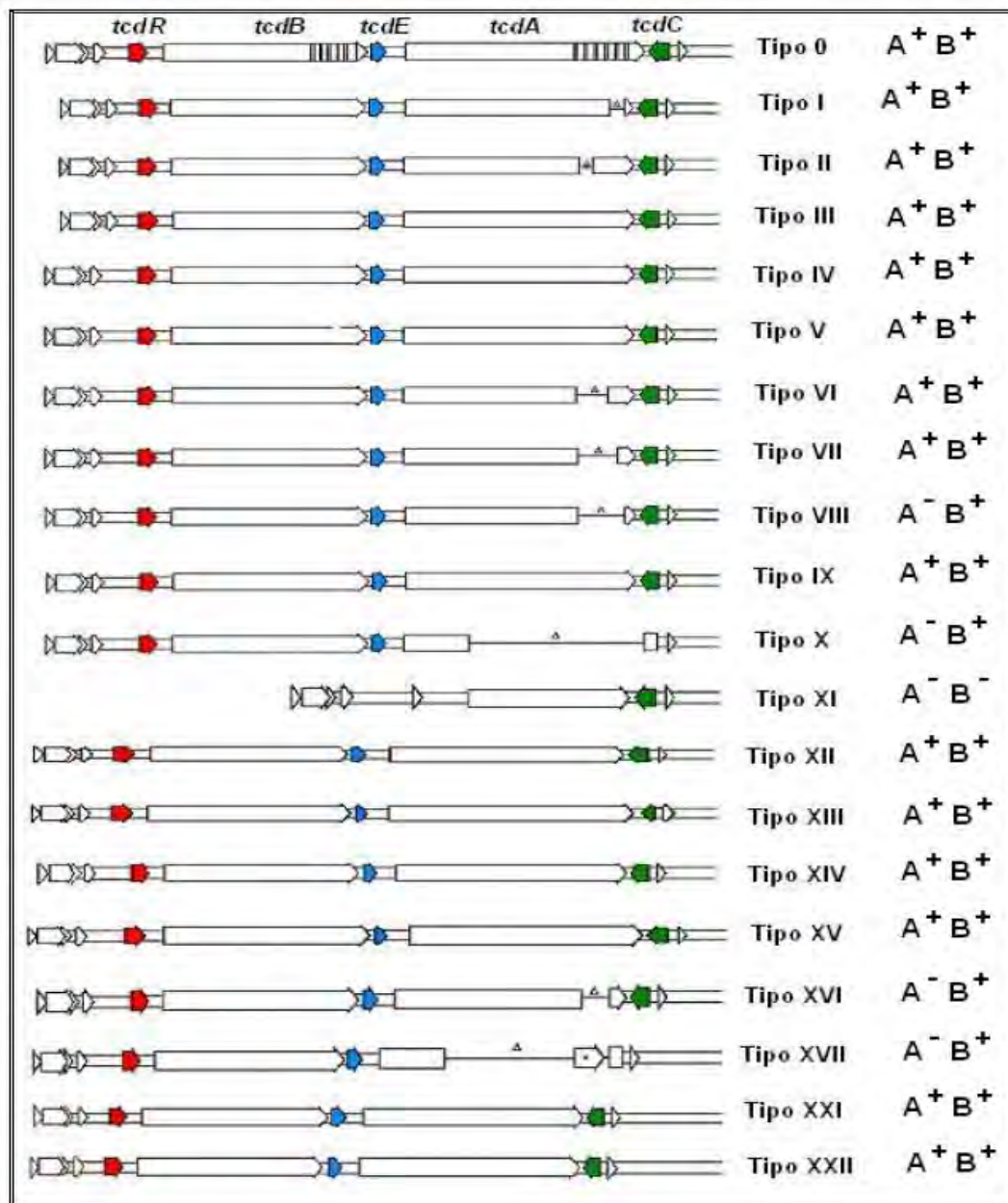


Figura 16. Toxintipos de *Clostridium difficile*. Las líneas verticales en los genes *tcdA* y *tcdB* del toxintipo 0 indican alguna homología entre ambos. Los triángulos indican deleciones en esa parte del gen. A⁺: producción de *tcdA*. A⁻: no produce *tcdA*. B⁺: producción de *tcdB*. B⁻: no produce *tcdB* (Rupnik y cols., 1998).

2.2.6 Epidemiología

Durante la última década se han presentado brotes intrahospitalarios graves en Norteamérica y Europa, alcanzando la ICD una incidencia de hasta 92 por 100.000 habitantes. En Estados Unidos la incidencia de diarrea por CD en pacientes adultos hospitalizados se dobló de 5,5 casos por 10.000 habitantes a 11,2 por 10.000 habitantes en 2005. La tasa de hospitalización por CD aumentó aproximadamente 23% por año entre 2000 y 2005, destacando un incremento entre las personas mayores de 65 años, con una incidencia cinco veces más alta en comparación a personas entre 45 y 64 años (Meyer, 2014).

C. difficile forma parte de la microbiota fecal normal en el 1-3% de los residentes de la comunidad y en más del 20% de los adultos hospitalizados. Se encuentra en las heces de pacientes sintomáticos y asintomáticos. Es común que los recién nacidos sanos sean portadores asintomáticos de *C. difficile* en heces, con tasas que rebasan el 50% en los 6 primeros meses de vida, pero es rara la enfermedad en esta población, probablemente porque su intestino no expresa los receptores para la toxina. *C. difficile* afecta especialmente a pacientes mayores de 65 años (tasas de incidencia de hasta 228 casos/100.000 habitantes) internados en hospitales y centros geriátricos, en quienes, debido a la coexistencia de diferentes comorbilidades, el consumo de antibióticos es muy elevado (Sánchez y cols., 2013).

Afecta hasta al 8% de los pacientes hospitalizados y es la causa de diarrea nosocomial más común a nivel mundial. Es el agente causal del 15-25% de los casos de diarrea asociada a antibióticos, del 50-75% de colitis asociada a antibióticos y del 90-100% de CPM asociada a antibióticos (Álvarez y cols., 2017).

En México hay muy poca información acerca de la situación epidemiológica de *Clostridium difficile*. Burgos (2015), diseñó un estudio descriptivo con el propósito de obtener la prevalencia de ICD en una población de pacientes hospitalizados en un hospital de tercer nivel de atención en la ciudad de México. Desgraciadamente contó con una población pequeña que no permite dar una cifra de prevalencia con todo el peso estadístico necesario. Sin embargo la frecuencia de ICD que reporta el estudio se encuentra en 71%, es decir, 34 pacientes de un total de 48.

Finalmente, mientras en otras partes del mundo es clara la situación emergente de la infección por *C. difficile*, y se avanza en el conocimiento molecular de este bacilo que incluso ha permitido la identificación de cepas hipervirulentas o se plantean nuevas opciones de tratamiento, como el uso de un antibiótico específico (fidaxomicina) o incluso el trasplante de materia fecal. En México desconocemos la prevalencia y el comportamiento real de esta infección. (Remes, 2012)

2.2.7 Manifestaciones clínicas

Las manifestaciones clínicas de la ICD son muy variadas, y abarcan desde un estado de portador asintomático, una diarrea leve a moderada, colitis pseudomembranosa fulminante y megacolon tóxico con riesgo vital (Rodríguez y cols., 2013; Meyer y cols., 2014; Alcalá y cols., 2015; Alcalá y cols., 2017).

El tipo de enfermedad y su gravedad dependerán tanto de factores del microorganismo como del paciente, principalmente de la virulencia de la cepa infectiva y de la respuesta inmune del hospedero (Alcalá y cols., 2015).

a) Portador asintomático

A pesar de la existencia de un porcentaje no bien establecido de portadores en la comunidad, *C. difficile* se contagia fundamentalmente en los hospitales. La gran mayoría de estos enfermos que se colonizan de forma nosocomial por *C. difficile* no desarrollan la enfermedad (García y Gomollón, 1998).

Se estima que en torno a 70% de los niños menores a un año de edad están colonizados por cepas toxigénicas de *C. difficile* y, a pesar de ello, estos niños son normalmente asintomáticos y no desarrollan ICD. Actualmente, no está claro por qué la infección no se manifiesta en estos niños aunque se cree que se debe a que los enterocitos de los niños menores de un año de edad no están completamente desarrollados y, por lo tanto, son deficientes en los carbohidratos que funcionan como receptores de superficie para las toxinas de *C. difficile* (Pérez y cols., 2013).

b) Diarrea asociada a antibióticos

La presentación más frecuente de la ICD es una diarrea similar a la producida por otras bacterias enteropatógenas y que, a veces, cesa simplemente con la retirada del antibiótico inductor o de forma espontánea (Alcalá y cols., 2017). La diarrea suele ser de leve a moderada, acuosa y fétida. Puede contener moco pero es infrecuente la presencia de sangre. Puede estar acompañada de dolor abdominal de localización hipogástrica y esporádicamente de febrícula (García y Gomollón, 1998).

O'Donnell y Heaton de la Universidad de Bristol en Inglaterra, validaron en 1988 una escala cuyo objetivo es evaluar de manera descriptiva la forma del contenido fecal, utilizando métodos gráficos que representan siete tipos de heces de acuerdo con su forma y consistencia. La innovación de esta escala es que ella presenta las imágenes que ilustran las heces, juntamente con descripciones necesarias en cuanto a la forma y consistencia, recurriendo a ejemplos fácilmente reconocibles (Martínez y Azevedo, 2012). Los pacientes con ICD suelen presentar heces que pueden variar desde el tipo 5 al tipo 7.

Tipo 1		Heces en forma de bolas duras y separadas que pasan con dificultad
Tipo 2		Heces en forma de salchicha compuesta por fragmentos
Tipo 3		Heces con forma de salchicha con grietas en la superficie
Tipo 4		Heces como una salchicha o serpiente, lisa y suave
Tipo 5		Bolas blandas con los bordes definidos, que son defecados fácilmente
Tipo 6		Trozos blandos y esponjosos, con bordes irregulares y consistencia pastosa
Tipo 7		Acuosa, sin trozos sólidos, totalmente líquida

Figura 17. Escala de Bristol de consistencia de heces (Verger, 2017).

c) Colitis por CD sin pseudomembranas

Algunos enfermos padecen un cuadro clínico más grave, con diarrea severa, dolor y distensión abdominal y presencia de síntomas sistémicos como fiebre, náuseas, vómitos, leucocitosis y deshidratación. Las heces suelen contener leucocitos y sangrado microscópico pero la presencia de sangre macroscópicamente es infrecuente. En la colonoscopia se observa afectación inflamatoria difusa o parcheada de la mucosa del colon con o sin formación de pseudomembranas (García y Gomollón, 1998).



Figura 18. Colitis con cambios mínimos. “Mucosa eritematosa”. Imagen obtenida por colonoscopia (Alcalá, 2017).

d) Colitis pseudomembranosa

En una pequeña proporción de pacientes con ICD se desarrolla una colitis pseudomembranosa en donde generalmente, la diarrea, el dolor y distensión abdominal, y los síntomas sistémicos están más marcados. Se caracteriza por lesiones con eritema, edema, pérdida del patrón vascular y sangrado. La pseudomembranas consistentes en placas blanco-amarillentas de 2-20 mm de diámetro en la luz del colon son fácilmente observables mediante colonoscopia (Walter y Lina, 2012; Alcalá y cols., 2017).

En un estudio realizado por Martín y cols., en el 2007, sobre la asociación de la toxina A de *C. difficile* y el daño histopatológico causado en los pacientes, se clasificaron los resultados de las biopsias colónicas y se dividieron en 3 tipos de lesiones:

Tipo I: Se pueden apreciar acumulaciones focales de polimorfonucleares con áreas de necrosis epitelial parcheada y exudación de fibrina y neutrófilos en la luz colónica.

Tipo II: Presenta un exudado más prominente que se origina de un área de ulceración epitelial, manteniéndose intacta la mucosa circundante.

Tipo III: Consiste en la necrosis epitelial difusa (no focal como sucedía en los tipos anteriores), cubierta por una pseudomembrana formada por polimorfonucleares, fibrina y detritus celulares.

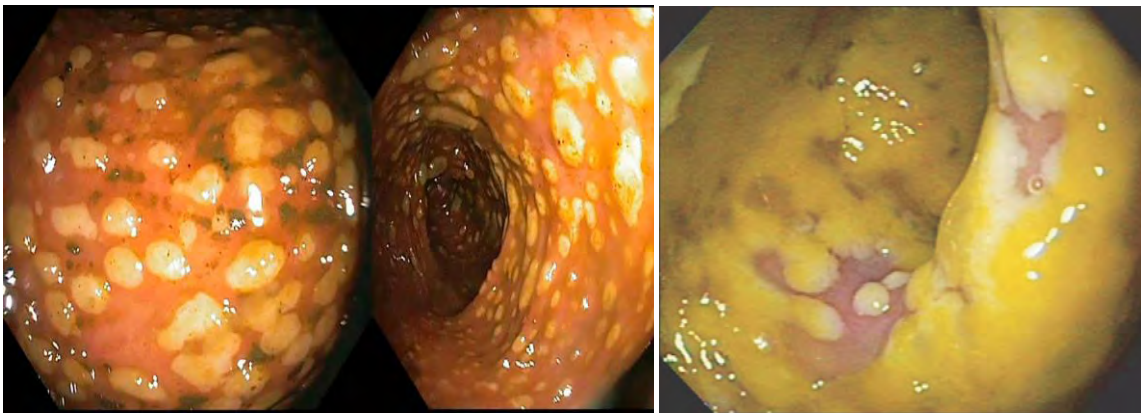


Figura 19. Colitis pseudomembranosa. Imágenes de colonoscopias realizadas a pacientes con ICD. Se observan las pseudomembranas presentes a lo largo de todo el colon (Arámburu, 2017; Burke y Lamont, 2014).

e) *Colitis fulminante (ileo paralítico, megacolon tóxico, perforación)*

Una de la presentación clínica más grave y altamente letal de la ICD es una colitis fulminante acompañada de un aumento súbito del recuento leucocitario de hasta 50,000 leucocitos/ μ l denominado reacción leucemoide. Se estima que la ICD grave que se acompaña de una reacción leucemoide, aunque poco frecuente, tiene una mortalidad cercana al 50% (García y Gomollón, 1997; Alcalá y cols., 2017).

Se presenta como un cuadro fulminante con afectación importante del estado general del individuo, con presencia de síntomas sistémicos graves, acompañado por letargo, diarrea abundante, fiebre, acidosis láctica, falla multiorgánica, taquicardia, calambres, tono muscular ausente, dolor abdominal severo y distensión en el que la afectación inflamatoria transmural del intestino ocasione una paresia del mismo y conduzca a la dilatación del colon e íleo parálítico con la desaparición de la diarrea que puede evolucionar a megacolon tóxico con perforación intestinal y peritonitis que puede llevar a sepsis, shock e inclusive la muerte (García y Gomollón, 1997; Walter y Lina, 2012; Alcalá y cols., 2015; Pérez y cols., 2013; Rodríguez y cols., 2013; Alcalá y cols., 2017).

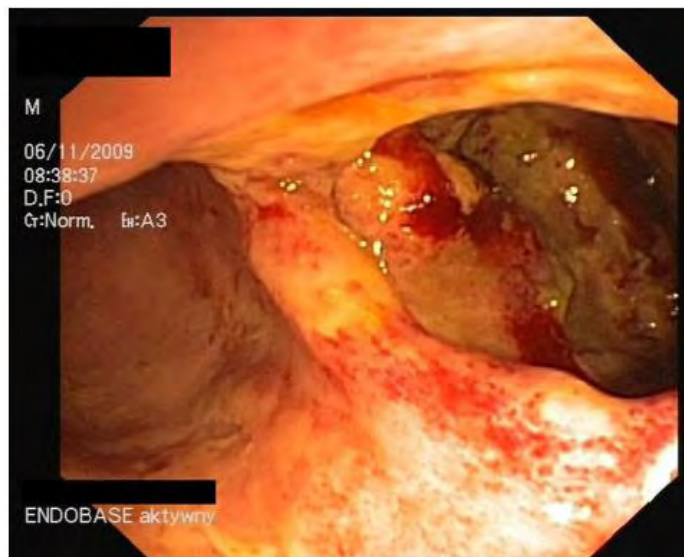


Figura 20. Perforación colónica (Alcalá, 2017).

f) Recurrencias de diarrea

Una de las principales complicaciones de la ICD son las recurrencias, definidas como la aparición de un nuevo episodio de ICD dentro de las 8 semanas posteriores a un primer episodio que ha sido tratado y cuyos síntomas han sido inicialmente resueltos (Alcalá y cols., 2017).

Las recurrencias son descritas aproximadamente entre un 15 y un 25% de los episodios y se pueden deber, además de las constantes alteraciones de la microbiota a nivel del TGI, a la posible presencia de esporas de la bacteria no erradicadas por el tratamiento y a que la inmunidad que se genera a partir de la primera exposición no es específica, ya que

estas reinfecciones pueden ser por cepas diferentes a la inicial. Tras la primera recurrencia el paciente tiene un 35-50% de posibilidades de presentar recaídas de nuevo y esa proporción va manteniéndose como riesgo de recurrencias subsiguientes (Walter y Lina, 2012; Pérez y cols., 2013).

g) Infecciones extraintestinales

C. difficile solo se aísla en muy contadas ocasiones en muestras extraintestinales; se han descrito casos de bacteriemias, peritonitis, osteomielitis, abscesos viscerales y cerebrales, infección en piel y tejidos, entre otros. Sin embargo, dicha presencia debe interpretarse con mucha precaución, ya que seguramente refleja el origen intestinal del proceso, por lo que no requiere un tratamiento distinto del que se aplicaría en las mismas circunstancias con la presencia de cualquier otro clostridio (Alcalá y cols., 2017; Walter y Lina, 2012; Stuart y cols., 2010).

Se han registrado casos de artritis reactiva en pacientes con enterocolitis documentada por *C. difficile*. Se produce afectación de rodillas y muñecas en 50% de los casos. La artritis comienza una media de 11 días tras el inicio de la diarrea y la resolución puede producirse dos meses más tarde. El mecanismo por el cual se produce no está del todo aclarado (Pérez y cols., 2013).

2.2.8 Clasificación de la ICD

La ICD de origen intestinal se clasifica según diferentes criterios de gravedad (tabla 1) con el fin de poder valorar la necesidad de tratamiento, el tipo de terapia antimicrobiana o la necesidad de cirugía o ingreso en una unidad de cuidados intensivos. Los síntomas, por lo general, comienzan poco después de la colonización, con un tiempo promedio de inicio de 2 a 3 días (Stuart y cols., 2010).

Tabla 1 Clasificación de la infección por *Clostridium difficile* (ICD) según la gravedad de la enfermedad.

Categoría de la ICD	Signos clínicos y de laboratorio
Leve a moderada	<ul style="list-style-type: none"> • Diarrea (Menos de 6 deposiciones al día) sin signos sistémicos de infección • Recuentos leucocitarios < 15,000/μL • Creatinina sérica < 1.5 veces el nivel basal
Grave	<ul style="list-style-type: none"> • Diarrea profusa (>6 deposiciones al día) • Signos sistémicos de infección y/o: • Recuentos leucocitarios de \geq15,000/μL • Creatinina sérica \geq1.5 veces el nivel basal • Dolor abdominal (No abdomen agudo) • Hipoalbuminemia (albumina <3g/dL)
Grave, complicada	<ul style="list-style-type: none"> • Signos sistémicos de infección incluyendo: • Shock • Hipotensión • Megacolon • Fiebre >38.5 °C • Íleo • Compromiso de conciencia • Leucocitosis >35,000/μL ó <2,000/μL • Lactato >2.2mmol/L • Cualquier evidencia de falla orgánica.
Recurrente	Reurrencia en las 8 semanas tras haber completado el tratamiento para ICD correctamente.

(Modificado de: Alcalá y cols., 2015; Meyer y cols., 2014.).

2.2.9 Factores de riesgo

Los principales factores de riesgo para adquirir una ICD son la toma previa de antibióticos (60-90% de los casos), la estancia hospitalaria prolongada y la edad avanzada (Alcalá y cols., 2017). Becerra y cols., 2011; Rodríguez y cols., 2017; Monge y cols., 2011, reportan en sus estudios que la edad en la que más comúnmente se presenta una ICD es en pacientes mayores de 65 años. Esto está probablemente relacionado con alteraciones asociadas con el proceso de envejecimiento, como malnutrición proteico-calórica así como a las enfermedades concomitantes que en su mayoría presentaban los pacientes como lo son: diabetes mellitus, insuficiencia renal crónica, inmunosupresión y enfermedades oncológicas. De igual forma los pacientes con ICD tenían el antecedente

de haber estado hospitalizados o en la unidad de cuidados intensivos en las seis semanas previas. Un dato más en común es el tratamiento con inmunosupresores, inhibidores de la bomba de protones y antibióticos en los que destacan los carbapenémicos, penicilinas, cefalosporinas y quinolonas.

Tanto la cantidad de antibióticos recibidos como el número de días recibéndolos se asociaron con gran fuerza a un mayor riesgo de infección por *C. difficile*, y esta mayor exposición a los antibióticos se ha identificado como uno de los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de ICD. Además, la exposición a los antibióticos más frecuentemente recibidos por los casos también se asoció con fuerza a un mayor riesgo de infección. Es probable que la utilización de antibióticos de amplio espectro como las cefalosporinas y las quinolonas durante períodos suficientes de tiempo alteren el ecosistema intestinal facilitando la infección por las formas vegetativas de *C. difficile* que hubieran sido capaces de alcanzar la mucosa intestinal (Monge y cols., 2011).

Tabla 2. Principales factores de riesgo de la infección por *Clostridium difficile* asociada a centros sanitarios

Tipo de episodio	Factor de riesgo
Primer episodio	<ul style="list-style-type: none"> • Antibióticos (clindamicina, betalactámicos, fluoroquinolonas y otros) durante 6-8 semanas previas • Estancia hospitalaria prolongada • Edad avanzada, consecuencia de mayor número de enfermedades de base y bajo nivel de anticuerpos protectores • Enfermedades oncológicas • Inmunosupresión • Malnutrición • Trasplante de órgano sólido • Infección por VIH
Recurrencia	<ul style="list-style-type: none"> • Edad avanzada • Mantenimiento antimicrobianos tras el episodio de ICD • Bajos niveles de albúmina • Estancia hospitalaria prolongada • Admisión en unidad de cuidados intensivos • Enfermedad de base grave • Alta carga de toxina en heces

(Alcalá y cols., 2017)

2.2.10 Diagnóstico

El diagnóstico de una ICD en un tiempo corto y de manera certera es fundamental tanto en el manejo del paciente como en la toma de medidas de aislamiento, limitando el riesgo de un brote nosocomial (Meyer y cols., 2014).

Este diagnóstico debe estar basado en la combinación de hallazgos clínicos, de laboratorio y de gabinete, y, requiere del cumplimiento de 2 condiciones: por una parte, la existencia, sin otra causa aparente, de síntomas compatibles con la infección, como es, generalmente, la presencia de diarrea (3 o más deposiciones no formes en las últimas 24 horas) y, por otra, la detección de las toxinas A y/o B de *C. difficile* toxigénico en la muestra, o bien, la detección de pseudomembranas en el colon del paciente mediante endoscopia, en el muñón de una colostomía o ileostomía en la autopsia (Rodríguez y cols., 2013; Walter y Lina, 2012; Alcalá y cols., 2017). Los hallazgos clínicos deben orientar a la decisión de realizar las pruebas de laboratorio, ya que éstas por sí solas no son capaces de identificar entre un portador asintomático y una ICD (Rodríguez y cols., 2013; Álvarez y cols., 2017).

2.2.10.1 Tipo de muestra, transporte y conservación

La muestra adecuada para el diagnóstico de ICD son heces acuosas, sueltas o no formes. Se recomienda recoger una sola muestra de heces durante el curso de un mismo episodio de ICD, ya que la detección rutinaria de múltiples muestras apenas aumenta el rendimiento y puede generar falsos positivos. Únicamente en aquellos casos en los que no sea posible obtener muestra de heces (íleo paralítico, megacolon tóxico o distensión abdominal sin diarrea) se pueden aceptar muestras rectales (Alcalá y cols., 2017).

Las muestras de heces deben transportarse en recipientes estériles, de cierre hermético y sin medio de transporte. También son aceptables las muestras recogidas en recipientes con medio de transporte para enteropatógenos aerobios como, por ejemplo, el medio Cary-Blair. Las muestras transportadas en medios esporicidas, como algunos medios de transporte para parásitos que contienen formaldehído, deben ser rechazadas. El transporte de las muestras debe realizarse lo antes posible al laboratorio de microbiología. En general, se recomienda conservar la muestra en frío (2-8 °C) durante las primeras

48-72 h o congelada (de -60 a -80 °C) si no se va a procesar la muestra durante las 72 h posteriores a su recogida. La congelación a -20 °C no se recomienda, ya que la actividad citotóxica disminuye dramáticamente. La congelación evita la desnaturalización y, por tanto la pérdida de las toxinas, ya que estas son muy lábiles (Alcalá y cols., 2015; Vega, 2008).

Las muestras deben procesarse lo antes posible. Dado que existe un importante infradiagnóstico clínico de la ICD, especialmente en aquellos pacientes sin ningún factor de riesgo tradicional, se recomienda procesar para diagnóstico de ICD todas las muestras de pacientes procedentes de pacientes con diarrea independientemente de su edad (salvo menores de 2 años), su origen (hospitalizado o no) o la petición microbiológica del clínico demandante. Las muestras de heces deben filtrarse mediante un filtro de membrana en caso de que se vaya a realizar el ensayo directo de citotoxicidad. Si se va a realizar un cultivo de las muestras puede realizarse optativamente un pretratamiento de las heces mediante shock con etanol absoluto homogeneizando volúmenes iguales de muestra durante 5 min (son tan eficaces como 60 min), o mediante choque térmico (15 min/80 °C) con el fin de incrementar la selectividad de la siembra (Alcalá y cols., 2015).

2.2.10.2 Métodos de Diagnóstico de laboratorio

En la actualidad existen diversas pruebas de laboratorio con distinta sensibilidad y especificidad, cuyo objetivo es la demostración de las toxinas o el aislamiento de *C. difficile* toxigénico, como lo son (Walter y Lina, 2012; Álvarez y cols., 2017):

- Cultivo toxigénico
- Ensayo de citotoxicidad celular
- Ensayos inmunoenzimáticos: Prueba para antígeno común glutamato deshidrogenasa (GDH), Inmunoensayo enzimático (EIA) de *tcdA* y *tcdB*
- Técnicas moleculares

a) *Detección de toxinas*

- Cultivo toxigénico

El cultivo toxigénico consiste en el cultivo de las muestras de heces en medios selectivos, y diferenciales incubados en anaerobiosis seguido de la detección de toxinas *in vitro*, con el fin de determinar la toxigenicidad de las cepas aisladas (Alcalá y cols., 2015).

Existen diferentes medios selectivos para el aislamiento de *C. difficile* a partir de muestras de heces. El medio más ampliamente utilizado es el CCFA (agar cicloserina, cefoxitina, fructosa), descrito por primera vez por George y cols., en 1979. Esta técnica permite el aislamiento de la colonia y su posterior manipulación para utilizarla en la identificación de fenotipos, y el estudio de su perfil de resistencia (Walter y Lina, 2012).

La identificación confirmatoria se puede realizar mediante las pruebas de indol negativo, L-prolina-aminopeptidasa positiva y métodos comerciales. Sin embargo, esta técnica puede ser ineficaz para fines diagnósticos debido a la dificultad para que este tipo de bacterias crezcan, desarrollo de cepas no toxigénicas o que no expresen la toxina *in vitro* (Walter y Lina, 2012).

También se han utilizado otros medios de cultivo para el aislamiento de *C. difficile*: agar cicloserina manitol, agar sangre manitol cicloserina, agar cefoxitina cicloserina con suplementos de sangre, entre otros. En estos medios con sangre y tras 48 h de incubación, las colonias de *C. difficile* presentan un aspecto de color grisáceo, no beta-hemolíticas, planas, mate e irregulares con apariencia de vidrio esmerilado y con un halo blanquecino en el centro; además, muestran fluorescencia bajo luz UV (Alcalá y cols., 2015). Cabe mencionar, que en un estudio realizado por Mundy y cols., (1995), se comparó el agar CCFA con el agar sangre manitol cicloserina, donde este último presentó menos inhibición de la flora normal presente en la materia fecal, siendo el agar CCFA el más indicado para el aislamiento de *C. difficile* (Walter y Lina, 2012).

Una vez confirmado el crecimiento de las colonias de *C. difficile* debe procederse a la detección de las toxinas *in vitro*, directamente de la colonia. El cultivo toxigénico es una técnica muy sensible y con alta especificidad, sin embargo, es lenta (1-3 días), laboriosa y requiere personal preparado (Alcalá y cols., 2015).

- Ensayo de citotoxicidad celular

El ensayo de citotoxicidad celular, consiste en la detección de la actividad citotóxica de la muestra de heces en una monocapa celular mediante la observación de lisis celular y la neutralización de esta actividad mediante antitoxinas específicas (Alcalá y cols., 2017). Consiste en inocular un filtrado de las heces en diferentes líneas celulares, siendo la más utilizada la de fibroblastos humanos (MRC5). Si en las heces --y por lo tanto en el filtrado-- hay toxinas (principalmente *tcdB*), a las 48 o 72 h se observara un efecto citopático en las células (Rodríguez y cols., 2013).

El efecto citopático inducido por toxina B en muestras fecales en cultivo de fibroblastos presenta como un halo característico alrededor de la célula, posteriormente se realiza la neutralización de este efecto con antisueros. Para su realización es necesaria la utilización de una antitoxina frente a la toxina B de *C. difficile* para neutralizar los efectos citopáticos inespecíficos. Sus principales inconvenientes son que posee una baja sensibilidad, cercana al 60%, y que obliga al uso de cultivos celulares, lo que conlleva un importante retraso diagnóstico (24-48 h) tras la llegada de la muestra (Meyer y cols., 2014; Alcalá y cols., 2015).

Por mucho tiempo este método diagnóstico fue considerado el estándar de oro para el diagnóstico de CD. La insuficiente sensibilidad para la detección de cepas productoras de toxinas es debido a la degradación de la toxina en el tiempo (Meyer y cols., 2014).

- Ensayos inmunoenzimáticos: Prueba para antígeno común (GDH), Ensayo inmunoenzimático (EIA) de *tcdA* y *tcdB*

La GDH es una enzima metabólica que se produce en grandes cantidades y se encuentra altamente conservada en las cepas de *C. difficile*. Su sensibilidad diagnóstica es > 90%, pero su especificidad es baja (Alcalá y cols., 2015).

La utilidad de diagnóstico se basa en GDH como un marcador de selección, seguido de pruebas confirmatorias tales como ensayos de toxina o pruebas moleculares que detectan la presencia de *tcdA* o *tcdB*, los genes que codifican las toxinas A y B, respectivamente (Carman y cols., 2012).

Se propuso como método de *screening* sensible, pero no específico de CD en deposiciones. Los kits comerciales de GDH demoran entre 15 y 45 minutos en estar listos, por lo que se usa en múltiples laboratorios. Tiene un alto valor predictivo negativo, lo que la convierte en útil para detección rápida, si se combina con otro método que detecte toxinas (Meyer y cols., 2014).

Por otro lado, la detección rápida de las toxinas A y/o B se lleva a cabo mediante técnicas de inmunoanálisis (IA) como, por ejemplo, técnicas inmunocromatográficas basadas en flujo lateral o técnicas de enzimo-inmunoanálisis basadas en una lectura final mediante espectrofotometría o quimioluminiscencia (Alcalá y cols., 2015).

Existen pruebas de EIA disponibles comercialmente que detectan ya sea únicamente la toxina A o ambas toxinas, A y B. Se trata de técnicas muy sencillas y rápidas que, además, tienen la ventaja de ser baratas (Meyer y cols., 2014; Alcalá y cols., 2017).

Los inmunoensayos enzimáticos para el diagnóstico de *C. difficile* utilizan anticuerpos monoclonales o policlonales dirigidos contra las toxinas de *C. difficile*. Hasta muy recientemente, las EIA para la detección de toxinas han sido los ensayos más utilizados en los laboratorios clínicos para la detección de *C. difficile* (Burnham y Carroll, 2013).

La principal desventaja de estas técnicas es su falta de sensibilidad, con valores del 40-60% cuando se comparan con el cultivo toxigénico. Por el contrario, la especificidad de los IA suele ser superior al 90%. El comportamiento de estas técnicas puede dar lugar a un importante número de falsos positivos y falsos negativos. Los falsos positivos pueden conducir a tratamientos innecesarios de la ICD, a la retirada de otros antibióticos y al aislamiento inadecuado del paciente que, a veces, puede compartir habitación con un verdadero caso de ICD. Por otra parte, los falsos negativos pueden impedir el tratamiento de los pacientes con ICD y favorecer la diseminación del patógeno en el medio hospitalario (Alcalá y cols., 2015).

Para el diagnóstico de *C. difficile*, ambas técnicas se utilizan siguiendo el algoritmo de dos pasos el cual se basa en la detección de GDH, que es el primer paso. Un resultado negativo se considera negativo para el patógeno, pero un resultado positivo requiere de análisis posterior para determinar si la cepa de CD es toxigénica. La prueba de

confirmación ha sido EIA de toxina A y B o cultivo con prueba de citotoxina en cultivo celular como prueba de confirmación (Meyer y cols., 2014). Sin embargo, la utilización de este algoritmo se ha puesto en duda debido a la baja especificidad de la GDH.

b) Técnicas moleculares

- Detección mediante amplificación de ácido nucleico (AAN)

Estas pruebas requieren de 45 minutos a tres horas y varían de complejidad, desde tres a 13 pasos. Este método es superior a la detección de toxinas por EIA y al algoritmo de dos pasos con GDH y posterior toxina por EIA, por ende pese a que no está disponible en todos los centros, es el método diagnóstico de elección. La detección mediante AAN representa un problema en pacientes colonizados, en que un resultado positivo puede llevar a tratar pacientes que no lo requieran. Es por esto que este método de detección se debe reservar para pacientes con cuadro clínico sugerente (Meyer, 2014).

Existen dos tipos:

Ensayos moleculares por LAMP (loop mediated isothermal amplification): Consiste en una reacción isotérmica de AAN. Los kit comerciales detectan el gen *tcdA* del locus de patogenicidad. Tiene alta sensibilidad y especificidad, pero es controversial el hecho de que detecte *tcdA* ya que existen cepas toxina A negativas. Faltan estudios para avalar su uso (Meyer, 2014).

Ensayos moleculares por Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR) para detección de toxinas: Permite detectar el fragmento del gen que codifica la toxina A y/o B. Esta prueba es más sensible y específica que el EIA y se lleva a cabo en menos de 24 h, siendo actualmente recomendado como método diagnóstico (Bujanda y Cosme, 2009). El 2008 la FDA aprobó el primer kit comercial para PCR en tiempo real para detección de las toxinas de CD. La mayoría de las cepas variantes muestran mutación de los genes *tcdA* y *tcdB*. Los kit de PCR disponibles comercialmente detectan correctamente la mayoría de las cepas variantes de CD y están diseñados para detectar una región conservada de *tcdB* (Meyer, 2014).

2.2.10.3 Caracterización molecular de *C. difficile*

Las cepas de *C. difficile* son prácticamente indistinguibles fenotípicamente, por lo que, para su diferenciación, son necesarios estudios moleculares que permitan detectar brotes de la enfermedad, reconocer la diseminación de cepas de alta virulencia o transmisibilidad, establecer las cadenas de transmisión y diferenciar si una recurrencia es una recidiva causada por la misma cepa o si se debe a una reinfección con una cepa distinta (Alcalá y cols., 2015). Las técnicas de tipificación para *C. difficile* que se utilizan con más frecuencia clínicamente o para investigaciones de brotes se describen a continuación.

a) *La electroforesis en campo pulsado en gel (PFGE)*

La PFGE se considera el estándar en América del Norte. PFGE implica digestión de DNA genómico con una enzima de restricción que es un “cortador raro”, o con poca frecuencia corta el DNA genómico, se han utilizado enzimas de restricción como la *Sma-I* o *Sac-II*. Estos fragmentos son separados en un gel de poliacrilamida que es sometido a un campo eléctrico, lo que permite a los fragmentos migrar a través del gel de acuerdo con su tamaño y ser analizados visualmente o a través de un *software*. Los fragmentos de DNA resultantes se separaron al usar un campo eléctrico que se conmuta repetidamente en tres direcciones diferentes durante este proceso (campo pulsado). Los patrones de bandas resultantes se conocen como “campo pulsado de América del Norte” (NAP) tipos. Patrones de banda con una similaridad $\geq 80\%$ les permite clasificar como un solo pulsotipo; en Norteamérica, cada pulsotipo se designa NAP y el número del tipo (por ejemplo, NAP1, NAP2, etc.) (Alcalá y cols., 2015; Bunham y Carrol, 2013).

b) *Análisis con endonucleasas de restricción (REA)*

El REA, al igual que en PFGE, utiliza enzimas específicas que cortan el ADN bacteriano en muchos más fragmentos que son separados por electroforesis en un gel de agarosa. La enzima más utilizada es la *Hind-III*, una enzima “cortadora” de 6 pb con numerosos sitios de restricción en el genoma. Este método arroja resultados bastante discriminatorios, pero el patrón de bandas obtenido es más difícil de interpretar y de

reproducir comparado con la PFGE. Los aislamientos que muestran 6 o menos diferencias visibles en las bandas de restricción son nombrados con el mismo grupo y designados por letras, mientras que los patrones idénticos de restricción son nombrados con números (por ejemplo, CF1, CF2) (Walter y Lina, 2012).

c) *Toxinotipificación*

La toxinotipificación es un método basado en PCR en el cual las cepas de *C. difficile*, de acuerdo con la longitud y patrones de restricción de 2 fragmentos (el B1 y A3) del *PaLoc*, son clasificadas en toxinotipos. Rupnik y cols., (1998), estudiaron en 219 aislamientos de 22 serogrupos de *C. difficile* los cambios en los genes que codifican para la producción de toxinas. Comparando los genes de las cepas problema con la cepa de referencia para *C. difficile* VPI 10463, y utilizando polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs), se reconocieron 5 patrones diferentes en *tcdB* y 2 en *tcdA*. De acuerdo con los cambios y deleciones encontradas en los genes, las cepas fueron divididas en 10 grupos, del toxinotipo del I al X. Actualmente, se conocen 27 toxinotipos diferentes (del I al XXVII) (Walter y Lina, 2012).

d) *Análisis de repeticiones en tándem de número variable en locus múltiples (MLVA)*

El análisis de repeticiones en tándem de MLVA consiste en la amplificación mediante PCR de varias regiones de DNA (multilocus) en las que hay secuencias cortas repetidas en tándem denominadas microsatélites. El número de las repeticiones que hay en cada uno de los locus es variable en las distintas cepas de *C. difficile*. El método consiste en la amplificación de cada locus mediante PCR, usando iniciadores marcados con fluorescencia, seguido del análisis del tamaño de los amplicones obtenidos mediante electroforesis capilar en secuenciador de ácidos nucleicos. El número de repeticiones que una determinada cepa tiene en cada locus se determina relacionando el tamaño del fragmento amplificado con el tamaño que tendría el locus con una sola repetición y considerando los pares de bases de cada repetición (Alcalá y cols., 2015).

Las relaciones filogenéticas que existen entre las cepas analizadas se estudian mediante la construcción de un diagrama de similitud, que mide la distancia genética entre los distintos aislados, utilizando la diferencia entre las sumas de las repeticiones en tándem de todos los *loci* analizados (*Summed Tandem Repeats Difference* o STRD) y el número de *loci* variantes (Alcalá y cols., 2015). La técnica es un método que permite la detección de brotes de *C. difficile* y contribuye en el estudio de la epidemiología de la transmisión nosocomial.

e) Ribotipificación

Es el método de tipificación molecular universal de bacterias, utilizada para la discriminación de los diferentes serotipos bacterianos. El ribotipo se define como un grupo de cepas con idénticas bandas patrones, donde una diferencia en una sola banda representa un nuevo ribotipo. Esta técnica se basa en la amplificación, por medio de *primers* específicos, de la región espaciadora interna transcrita que se encuentra entre el rRNA 16S y 23S. El resultado de estas amplificaciones son bandas entre 200 y 700 pb visualizadas, normalmente, sobre un gel de agarosa o también a través de un *software* (Walter y Lina, 2012).

f) Análisis de secuencias de locus múltiples (MLST)

El MLST es una técnica muy similar al MLVA, que permite el estudio de la epidemiología y filogenia de *C. difficile*. Esta técnica permite el estudio de la relación entre especies de bacterias, a través de la amplificación y secuenciación de aproximadamente 450–500 pb de fragmentos internos del genoma de, generalmente, 5 a 7 genes *housekeeping*. La diferencia encontrada en la secuencia de cada *housekeeping* se considera un alelo diferente, y cada alelo define un tipo de secuencia.

La comparación de los ST de cada cepa se realiza de forma sencilla y objetiva a través de bases de datos públicas depositadas en Internet, en las que actualmente hay descritos 295 ST para *C. difficile* (Walter y Lina, 2012; Alcalá y cols., 2015).

2.2.10.4 Algoritmo Diagnóstico para la identificación de *Clostridium difficile*

En general, todos los algoritmos propuestos en la literatura, incluidos los recomendados por 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 escalones.

En una primera instancia se determina la presencia de GDH mediante EIA. Ésta se puede realizar a la vez que la detección de *tcdA* y/o *tcdB* mediante EIA, o bien realizar la detección de toxina en una segunda fase. 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. Finalmente, en las positivas solo para GDH o para las toxinas se debe realizar un test confirmatorio. Este test puede ser el cultivo y/o el estudio de citotoxicidad. Dado que esta confirmación es laboriosa y lenta, se ha sugerido aplicar técnicas moleculares como confirmatorias (Rodríguez y cols., 2013).

Alternativamente se puede hacer la determinación de la GDH y confirmar la prueba positiva con técnicas moleculares o estudiar directamente las heces con técnicas moleculares. Las técnicas moleculares, además de aportar rapidez y sensibilidad al diagnóstico de la infección por *Clostridium difficile*, nos permiten realizar estudios epidemiológicos, como se mencionó anteriormente. Estos adquirieron cierta relevancia al detectarse determinadas cepas de *C. difficile* con mayor virulencia, como son las pertenecientes al ribotipo 027 (Rodríguez y cols., 2013; Alcalá y cols., 2015).

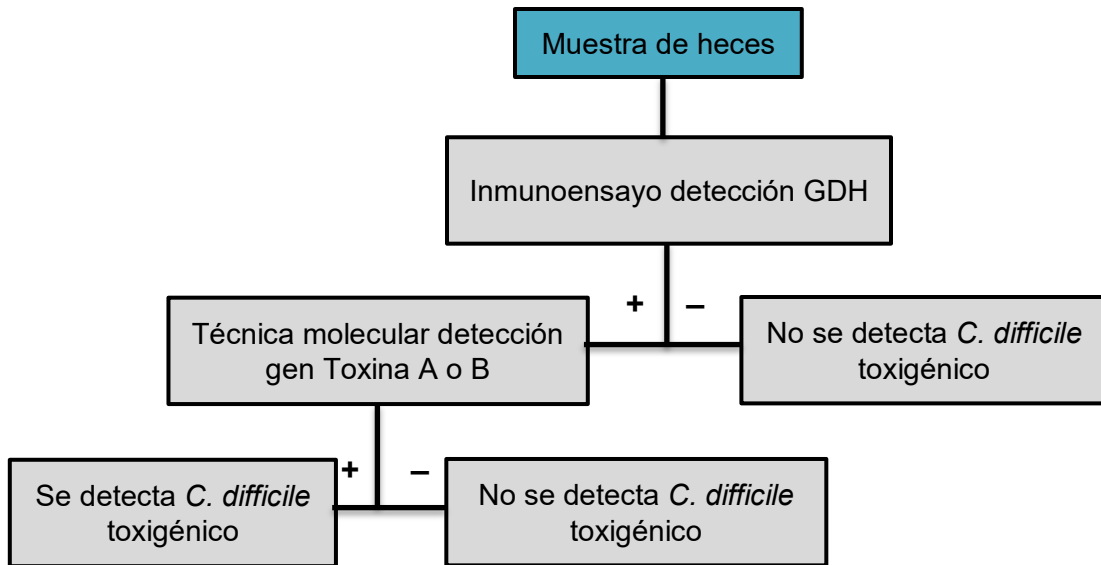


Figura 21. Algoritmo diagnóstico de 2 pasos para la confirmación de la infección por *Clostridium difficile* (Alcalá y cols., 2015; Alcalá y cols., 2017).

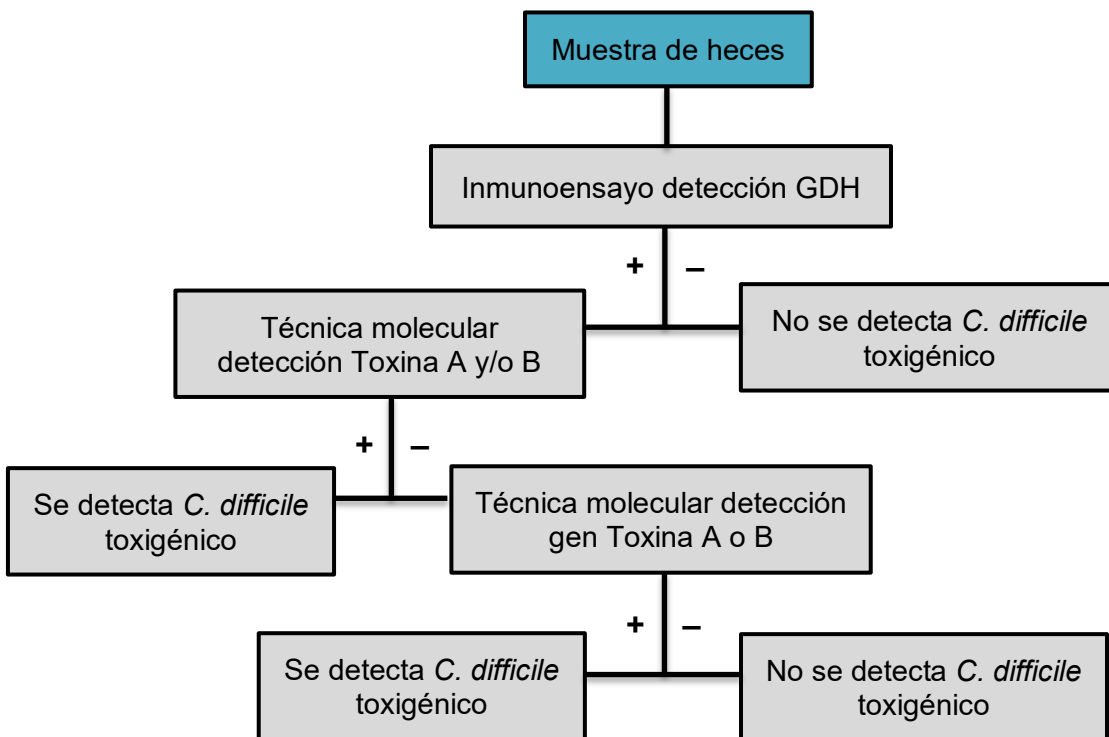


Figura 22. Algoritmo diagnóstico de 3 pasos para la confirmación de la infección por *Clostridium difficile* (Alcalá y cols., 2015; Alcalá y cols., 2017).

2.2.11 Tratamiento

Se deben considerar varios puntos ya que el tratamiento depende de factores dependientes tanto del paciente como del tipo de infección, por ello la Sociedad Europea de Microbiología Clínica (ESCMID, por sus siglas en inglés) publicó en 2009 la primera guía de orientación para el tratamiento de la ICD.

Una vez que se diagnostica la ICD en un paciente, la aplicación inmediata de las medidas de control de infecciones es obligatoria para evitar una mayor propagación en el interior del hospital. Estos incluyen el diagnóstico precoz de la ICD, vigilancia, formación del personal, el uso apropiado de las precauciones de aislamiento, higiene de las manos, la ropa de protección, saneamiento ambiental y limpieza de equipos médicos, la buena administración de antibióticos y medidas específicas durante los brotes (Debast y cols., 2014).

El portador asintomático no requiere tratamiento, y no está indicado someter a pruebas diagnósticas a individuos asintomáticos excepto con fines epidemiológicos. Siempre que sea posible, se recomienda suprimir el antibiótico desencadenante o sustituirlo por otro con menor efecto anaerobicida como primer paso del tratamiento.

Otras medidas básicas del tratamiento de la ICD incluyen la hidratación del paciente y evitar el empleo de opiáceos y de fármacos inhibidores del peristaltismo intestinal, los cuales ocultan los síntomas y pueden empeorar la enfermedad (Rodríguez y cols., 2013).

En las guías terapéuticas de la ESCMID se agrupan las ICD en 5 grupos terapéuticos: ICD inicial no grave, ICD inicial grave, ICD con primera recurrencia (o riesgo de ella), ICD con múltiples recurrencias e ICD en pacientes sin posibilidad de tratamiento oral (Alcalá y cols., 2017).

A continuación, en la siguiente tabla se describen los tipos de tratamiento de acuerdo al tipo de infección que pueden presentar los pacientes:

Tabla 3. Tratamiento de la infección por *Clostridium difficile*

Tipo de infección	Tipo de tratamiento	Tratamiento
Enfermedad no grave	Tratamiento antibiótico oral	<ul style="list-style-type: none"> • Metronidazol oral 500mg /8h/10 días (A-I) • Vancomicina oral 125mg /6h/10 días (B-I) • Fidaxomicina oral 200mg /12h/10 días (B-I)
	Sin tratamiento antibiótico	<ul style="list-style-type: none"> • Retirada de antibióticos inductores + observación clínica 48 h (C-II) • Inmunoterapia con Ac. Monoclonales humanos (C-I) o suero inmune (C-II) • Probióticos (D-I) • Unión a toxinas (D-I)
Primera recurrencia o riesgo de ella	Tratamiento antibiótico oral	<ul style="list-style-type: none"> • Vancomicina oral 125mg /6h/10 días (B-I) • Fidaxomicina oral 200mg /12h/10 días (B-I) • Metronidazol oral 500mg /8h/10 días (C-I)
Múltiples recurrencias	Tratamiento antibiótico oral	<ul style="list-style-type: none"> • Vancomicina oral en régimen de reducción gradual y/o en dosis interrumpidas (B-II) • Fidaxomicina oral 200mg /12h/10 días (B-II) • Vancomicina oral 500 mg /6h/10 días (C-II) • Metronidazol oral 500mg /8h/10 días (D-II)
	Sin tratamiento antibiótico	<ul style="list-style-type: none"> • Trasplante fecal(combinao con antibioterapia oral) (A-I) • Probióticos (D-I) • Inmunoterapia pasiva con suero inmune (D-I)
Enfermedad grave o curso complicado	Tratamiento antibiótico oral	<ul style="list-style-type: none"> • Vancomicina oral 125mg /6h/10 días (A-I) o vancomicina oral 500mg/6h/10 días (B-III) • Fidaxomicina oral 200mg /12h/10 días (B-I) • Metronidazol oral 500mg /8h/10 días (D-I)
Sin posibilidad de tratamiento oral		<ul style="list-style-type: none"> • Metronidazol IV 500mg /8h/10 días (enfermedad no grave) (A-II) • Metronidazol IV 500mg /8h/10 días (A-II) + vancomicina enteral 500 mg/6h/10 días (enfermedad grave) (B-III) • Tigeciclina IV 50mg/12 h/14 días (enfermedad grave) (C-III)

Grado de fuerza de recomendación: A, recomienda fuertemente su utilización; B, recomienda moderadamente su utilización; C, recomienda marginalmente su utilización; D, recomienda su no utilización. Calidad de la evidencia: I, evidencia de, al menos, un ensayo clínico controlado, aleatorizado y correctamente diseñado; II, evidencia de, al menos, un ensayo clínico bien diseñado sin aleatorización, de estudios analíticos de cohortes o de casos y controles preferiblemente de más de un centro), de múltiples *time series* o de resultados irrefutables de estudios experimentales no controlados; III evidencia de opiniones de expertos basados en su experiencia clínica, de estudios de casos descriptivos o de informes de comités de expertos.

(Alcalá y cols., 2017).

La cirugía está indicada cuando hay sepsis con afectación de otros órganos, perforación, megacolon tóxico o evolución fulminante. La técnica es la colectomía con preservación del recto y la ileostomía. La cirugía precoz se ha asociado a mejoría en la sobrevida sin embargo, puede haber resistencia inicial a este tratamiento por parte del médico tratante, paciente y/o sus familiares, debido a la morbimortalidad asociada, considerando que los pacientes que sobreviven a la cirugía muchas veces requerirán de una ileostomía en forma permanente (Bujanda y Cosme, 2009; Meyer y cols., 2014).

Después del tratamiento inicial exitoso con metronidazol o vancomicina, cerca del 30% de los pacientes experimentan otro episodio de enfermedad (primera recurrencia), para lo cual se recomienda el mismo tratamiento que se dio durante el primer episodio, estratificándose de acuerdo a la gravedad del mismo (Álvarez y cols., 2017).

2.2.11.1 Trasplante de microbiota fecal (TMF)

En caso de que aparezca una segunda recurrencia el tratamiento que se ha mostrado más eficaz es el trasplante fecal, tras preparación durante unos días con vancomicina oral. El trasplante fecal consiste en trasvasar al colon del paciente una muestra de heces de un donante sano mediante colonoscopia, sonda nasoduodenal o con material fecal encapsulado. La recolonización del colon con las bacterias trasplantadas ayuda a eliminar a *C. difficile* y prevenir así nuevos episodios (Alcalá y cols., 2017).

En cuanto a los intentos de restaurar la microbiota del colon alterada de los pacientes con infección por *C. difficile*, los métodos utilizados, además del trasplante fecal, incluyen la administración de vancomicina seguida de la utilización de la levadura *Saccharomyces boulardii*, o la colonización intencional del paciente con una cepa no productora de toxinas de *C. difficile*, método todavía en estudio (Rodríguez y cols., 2013).

En el trasplante para el tratamiento de la enfermedad por *C. difficile* se ha descrito que la microbiota colónica pretrasplante era deficiente en bacterias de las familias *Firmicutes* y *Bacteroidetes*; el TMF tuvo un notable impacto en la composición de la microbiota. A los 14 días, la microbiota del paciente era muy similar a la del donante y estaba dominada por componentes de la familia *Bacteroides* spp., siendo este cambio paralelo a la resolución de los síntomas (García y cols., 2015).

El TMF como tratamiento de la infección por *C. difficile* se ha utilizado en más de 600 pacientes, con una tasa de curación que ronda el 90%. La curación, definida como ausencia de diarrea, dolor abdominal y estudios microbiológicos para *C. difficile* negativos, suele aparecer en los primeros días. La respuesta clínica parece ser duradera, ya que se ha observado que algunos de estos pacientes han precisado antibióticos posteriormente por otras causas, sin objetivarse recidiva de infección (García y cols. 2015).

2.2.11.2 Resinas

Otra estrategia terapéutica estudiada se basa en favorecer la eliminación de la toxinas de *C. difficile* mediante la utilización de resinas de intercambio iónico como colestiramina o mediante la utilización de un polímero aniónico llamado tolevamer que, pese a haber demostrado menor eficacia en cuanto a respuesta, puede aportar beneficio en cuanto a la reducción de las recidivas (Rodríguez y cols., 2013).

Las resinas no se deben administrar con la vancomicina, ya que se unen al antibiótico neutralizando su actividad. Por este motivo, en caso de administrar resinas y vancomicina, las resinas deben tomarse al menos 2 o 3 h antes que la vancomicina (Bujanda y Cosme, 2009).

2.2.11.3 Probióticos

Los probióticos previenen las infecciones por CD. Entre las cepas que tienen efecto beneficioso están *Saccharomyces boulardii* y *Lactobacillus rhamnosus* GG. En un estudio se constata que los pacientes que ingresan en un hospital y son tratados con antibióticos se benefician de la administración cada 12 h de una bebida (97 mL) que contiene *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*. El riesgo de DACD se redujo en un 17%. Los probióticos actúan restableciendo la microflora. Algunos autores recomiendan la administración de *Lactobacillus casei* o *Lactobacillus acidophilus* o *Saccharmyces boulardii* de forma continua durante al menos un mes tras realizar el tratamiento agudo del primer episodio (Bujanda y Cosme, 2009).

Sin embargo, no existe evidencia sólida que avale el uso de probióticos en el tratamiento de la ICD inicial o severa ni su recurrencia. Hay casos publicados de fungemia por *Saccharomyces boulardii* en pacientes con catéter venoso central, por ende su uso en UCI o en pacientes inmunocomprometidos no se recomienda (Meyer y cols., 2014).

2.2.11.4 Vacuna

Una estrategia prometedora se basa en favorecer la respuesta inmune del individuo ya sea mediante inmunización pasiva o activa. Se hallan en estudios fase III la utilización de un anticuerpo monoclonal frente a la toxina A y B y la elaboración de una vacuna con toxoide de *C. difficile* (Rodríguez y cols., 2013).

Se ha probado en voluntarios sanos una vacuna que contenía toxina A y B, registrando niveles de IgG contra la toxina A más altos que los presentados posterior a la infección. Están en desarrollo una variedad de vacunas que podrían representar una estrategia costo-efectiva en la prevención de la ICD (Meyer y cols., 2014).

Actualmente están en desarrollo varias vacunas frente a la ICD, entre las que se encuentran algunas inactivadas con diversas sustancias como el formol, y otras vivas que expresan en mayor o menor medida formas atenuadas de la toxina A y/o de la toxina B. Un estudio realizado en el año 2005 muestra que la vacunación con toxina A y B de *C. difficile* inactivada induce respuesta inmunitaria en pacientes con múltiples episodios de ICD. Además dicha administración se asocia con una resolución de los cuadros de diarrea. Sin embargo, dicho estudio presenta un escaso número de pacientes incluidos, por lo que la confirmación de dichos resultados necesita la puesta en marcha de dichos ensayos clínicos ya que todavía no existe una vacuna comercializada que pueda utilizarse selectivamente en grupos de riesgo (Pérez y cols., 2013; Alcalá y cols., 2017).

2.2.11.5. Anticuerpos monoclonales contra *Clostridium difficile*

Un nuevo enfoque para la prevención de la infección recurrente por *C. difficile* es la administración de anticuerpos monoclonales contra las toxinas de este microorganismo (además de la terapia con antibióticos) como una forma de inmunidad pasiva. Se han

realizado diversos estudios en donde se hace uso de dos anticuerpos monoclonales administrados por vía intravenosa contra toxinas A y B. (Lisa, M. y cols., 2018; Gerding, D. y Johnson, S., 2010; Lowy, I y cols., 2010).

Actoxumab (CDA1) y bezlotoxumab (CDB1) son anticuerpos monoclonales completamente humanos que se unen y neutralizan las toxinas A y B de *C. difficile*, respectivamente. Wilcox, M., Gerding, D. y cols., 2017 demostraron en un estudio realizado con pacientes que estaban recibiendo metronidazol o vancomicina para la infección por *C. difficile*, que una sola infusión intravenosa de actoxumab-bezlotoxumab se asoció con una tasa significativamente menor de infección recurrente que el placebo, mientras que el tratamiento coadyuvante solo con actoxumab, no lo fue. El bezlotoxumab tiene un nuevo mecanismo de acción que reduce la probabilidad de infección recurrente por *C. difficile*, sobre todo entre los pacientes que tienen un mayor riesgo de un resultado desfavorable.

2.2.12 Medidas de prevención y control de la infección

Las medidas preventivas de la ICD deben ir encaminadas a evitar tanto la colonización de los pacientes por *C. difficile* como el sobrecrecimiento posterior del microorganismo en la luz del colon del paciente colonizado, factores habitualmente necesarios para que se produzca un nuevo caso de ICD (Alcalá y cols., 2017; García y Gomollón, 1997).

Los programas de control de infección en los hospitales van dirigidos a la interrupción del mecanismo de transmisión: *C. difficile* frecuentemente se transmite de paciente a paciente a través de las manos del personal sanitario contaminadas tras la atención sanitaria de paciente sintomático o a través de superficies/dispositivos médicos contaminados por esporas bacterianas. El principal factor que dificulta el control de *C. difficile* es la alta capacidad de dicha bacteria de producir esporas altamente resistentes, así como la elevada supervivencia de las esporas en el ambiente (alcanzando en ocasiones varios meses) (Pérez y cols., 2013). Las medidas a considerar referente a la prevención de la colonización son las siguientes:

a) Detección precoz de los pacientes con ICD

Es fundamental evitar la diseminación de las esporas provenientes del paciente con ICD y, para ello, es importante un diagnóstico rápido y eficaz de la ICD, además de una transmisión rápida por parte del laboratorio de los resultados positivos (e idealmente de los negativos) para poner en marcha cuanto antes el tratamiento adecuado del episodio y medidas efectivas de aislamiento del paciente (Pérez y cols., 2013; Alcalá y cols., 2017).

b) Aislamiento de contacto de todo paciente con ICD, confirmado o sospechoso

La gran parte de los problemas se plantean en los hospitales y en las residencias, donde la prevención de casos secundarios se basará en la aplicación de las normas generales de control de las infecciones nosocomiales de transmisión por contacto. Estas consisten en colocar a estos pacientes en habitaciones individuales; la utilización de equipamiento exclusivo para estos pacientes; el uso de bata y de guantes desechables, y el lavado de las manos con agua y jabón tras el contacto con los pacientes, tanto por parte del personal sanitario como por sus visitas, como lo recomienda la SHEA/IDSA (Rodríguez y cols., 2013; Alcalá y cols., 2017).

Aunque el paciente continúa eliminando el microorganismo hasta siete días tras el cese de la diarrea, la evidencia científica no recomienda mantener dichas medidas de aislamiento de contacto más allá de la duración de la enfermedad. No es necesario cultivos negativos para decidir no continuar con las medidas de aislamiento (Pérez y cols., 2013).

c) Limpieza y desinfección ambiental

La limpieza y desinfección de superficies y dispositivos médicos contaminados es una medida fundamental en el control de la ICD, ya que *C. difficile* presenta una relativa resistencia a un amplio rango de desinfectantes. Así se ha encontrado contaminación ambiental en cómodas, baños, suelos y en dispositivos médicos utilizados en pacientes con la infección., por lo que la limpieza debe de realizarse de forma periódica y exhaustiva, prestando especial atención a las superficies con mayor probabilidad de estar contaminadas con heces o esporas (Pérez y cols., 2013).

La desinfección tras el alta del paciente debe realizarse con agentes que contengan hipoclorito sódico (1.000 ppm) y actividad esporicida tipo lejía. Un reciente estudio muestra que el uso de peróxido de hidrógeno en vapor reduce los niveles de contaminación ambiental por *C. difficile*, por lo que es considerado un buen agente esporicida, sin embargo, presenta una serie de limitaciones que impide su uso rutinario, como la necesidad de aplicación del peróxido de hidrógeno en ausencia de pacientes y trabajadores, así como el elevado coste que presenta (Alcalá y cols., 2017; Pérez y cols., 2013).

Con respecto a la prevención del sobrecrecimiento de *C. difficile* en los pacientes colonizados es esencial:

d) Uso racional de antimicrobianos e inhibidores de la bomba de protones

Dado que el uso de la terapia antimicrobiana es el factor de riesgo aislado más importante, se debe alentar el uso racional de antibióticos de amplio espectro y durante periodos cortos de tiempo, así como el uso de inhibidores de la bomba de protones, evitando su prescripción innecesaria que cada vez se realiza con mayor frecuencia (Álvarez y cols., 2017).

2.3 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

La identificación de un aislamiento bacteriano requiere el análisis de la información obtenida por las pruebas de laboratorio que describen los perfiles característicos de las bacterias. Existen esquemas de identificación que se basan en las características genotípicas de las bacterias. Las técnicas de identificación genotípica implican la caracterización de alguna porción del genoma bacteriano por medio de técnicas moleculares para el análisis del DNA o RNA. Esto por lo general determina la presencia de un gen o de una parte de él o de un producto del RNA que es específico de determinado microorganismo. En principio, la presencia de un gen específico o de una secuencia particular del ácido nucleico se interpreta como una identificación definitiva del microorganismo (Forbes y cols., 2009).

Al analizar cualquier secuencia de DNA, su cantidad se vuelve limitante. Un problema importante al trabajar en el nivel molecular es que cada gen es una fracción diminuta del DNA celular total. Como cada gen es único, se lo debe aislar y amplificar antes de poder estudiarlo (Pierce, 2014). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica que permite amplificar rápidamente muestras pequeñas de DNA, es decir, aumentar su cantidad a modo que sea suficiente para poder analizarlas. Si se comienza con un fragmento de DNA del tamaño de un gen, la PCR puede utilizarse para formar literalmente miles de millones de copias en sólo unas horas (Tortora cols., 2007).

La PCR, descrita por Kary Mullis en 1983, aplica la bioquímica básica de la replicación del DNA, catalizada por una DNA Polimerasa. En este caso, la replicación tiene dos requerimientos esenciales: un molde de DNA a partir del cual se pueda copiar una nueva cadena de DNA y un par de cebadores (o primers) con un grupo 3' OH⁻ al que puedan añadirse nuevos nucleótidos.

Como la molécula de DNA consiste en dos cadenas nucleotídicas, cada una de las cuales puede servir de molde, la cantidad de DNA se duplica con cada evento de replicación. Los cebadores usados en la PCR son fragmentos cortos de DNA, en general de 17 a 25 nucleótidos de longitud que son complementarios de secuencias conocidas del molde (Pierce, 2014).

La mezcla de PCR consta del DNA diana para la amplificación y la mezcla maestra. Ésta a su vez se compone de cebadores de oligonucleótidos de DNA, los cuatro nucleótidos trifosfato, DNA Polimerasa termoestable, cloruro de magnesio y agua o una solución reguladora.

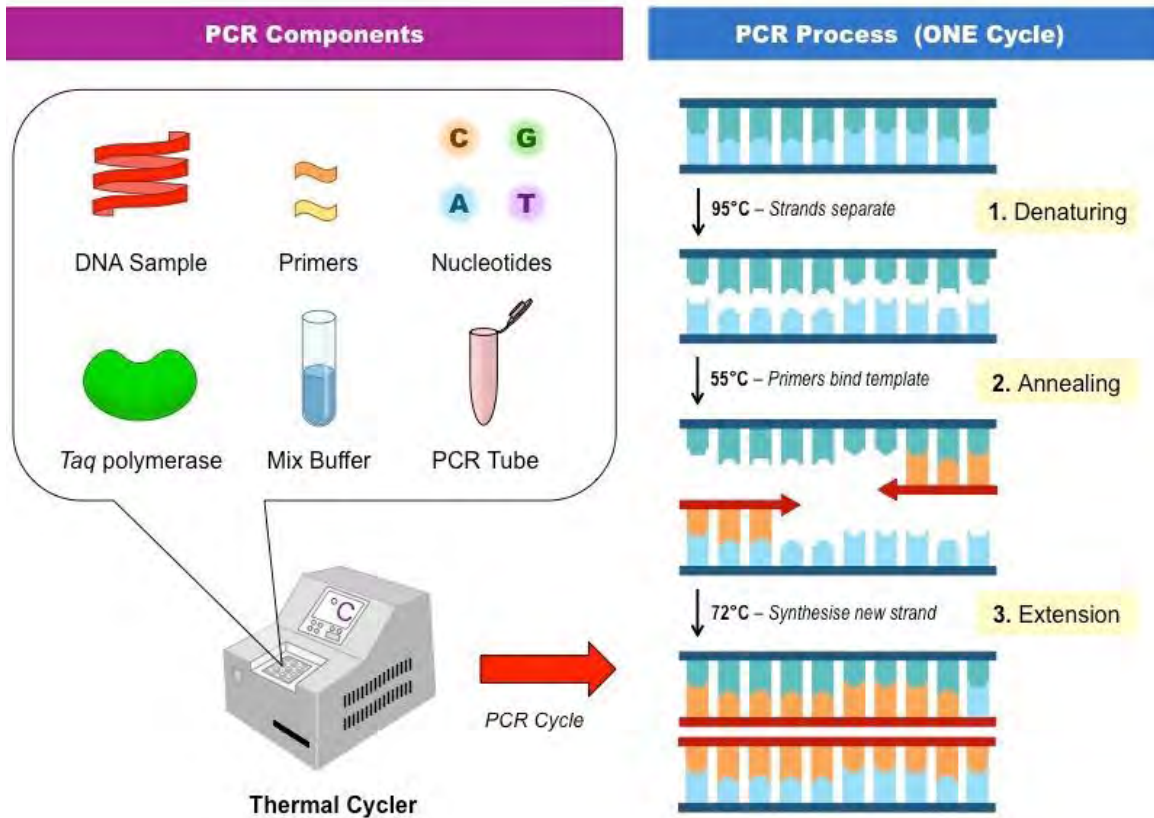


Figura 23. Componentes de la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) (Biostang, 2017).

La PCR consiste en tres fases repetitivas, lo que constituye la base de la porción “Reacción en cadena” del nombre. Estas tres fases son:

1. **Desnaturalización** del DNA (o la separación de las dos hebras de DNA),
2. **Hibridación** del cebador
3. **Extensión** del cebador (la porción de la reacción donde sucede la síntesis de DNA) (Koneman y cols., 2008).

En la primera etapa de la PCR, es decir, la desnaturalización de la molécula de DNA molde, se acompaña por la elevación de la temperatura de la mezcla de reacción hasta aproximadamente 95° C. A esta temperatura el DNA bicatenario se separa en dos hebras simples. Esto sucede porque la energía térmica rompe los puentes de hidrógeno que mantienen las dos hebras de DNA juntas a temperaturas más bajas. La mezcla de reacción se mantiene a esta temperatura solo durante uno o dos minutos. En el paso 2, se enfría con rapidez la solución de DNA hasta 30-65° C y se mantiene a esta temperatura durante un minuto o menos (Koneman y cols., 2008; Pierce, 2014).

La próxima etapa de la PCR, la hibridación del cebador, comienza cuando la mezcla de reacción se enfría y los cebadores oligonucleótidos, que se encuentran a los lados de la zona por amplificar, se hibridan con las hebras simples de la molécula de DNA molde. Un cebador tiene el mismo sentido que la hebra superior de DNA y se denomina cebador directo (*forward*), mientras que el otro es del mismo sentido que la hebra opuesta de DNA y se llama cebador inverso (*reverse*) (Koneman y cols., 2008).

En el paso 3, la solución se calienta un minuto o menos hasta 72 °C La síntesis de una hebra nueva de DNA complementaria a la hebra madre de DNA se lleva a cabo por la acción de la DNA polimerasa después de que se completa la hibridación del cebador. Una vez transcurrido el tiempo necesario para permitir la extensión completa del amplicón, la mezcla reacción se vuelve a ciclar a 95°C para otro ciclo de la PCR. Así la porción diana de una molécula de DNA se amplifica exponencialmente para formar millones de amplicones (Koneman y cols., 2008; Pierce, 2014).

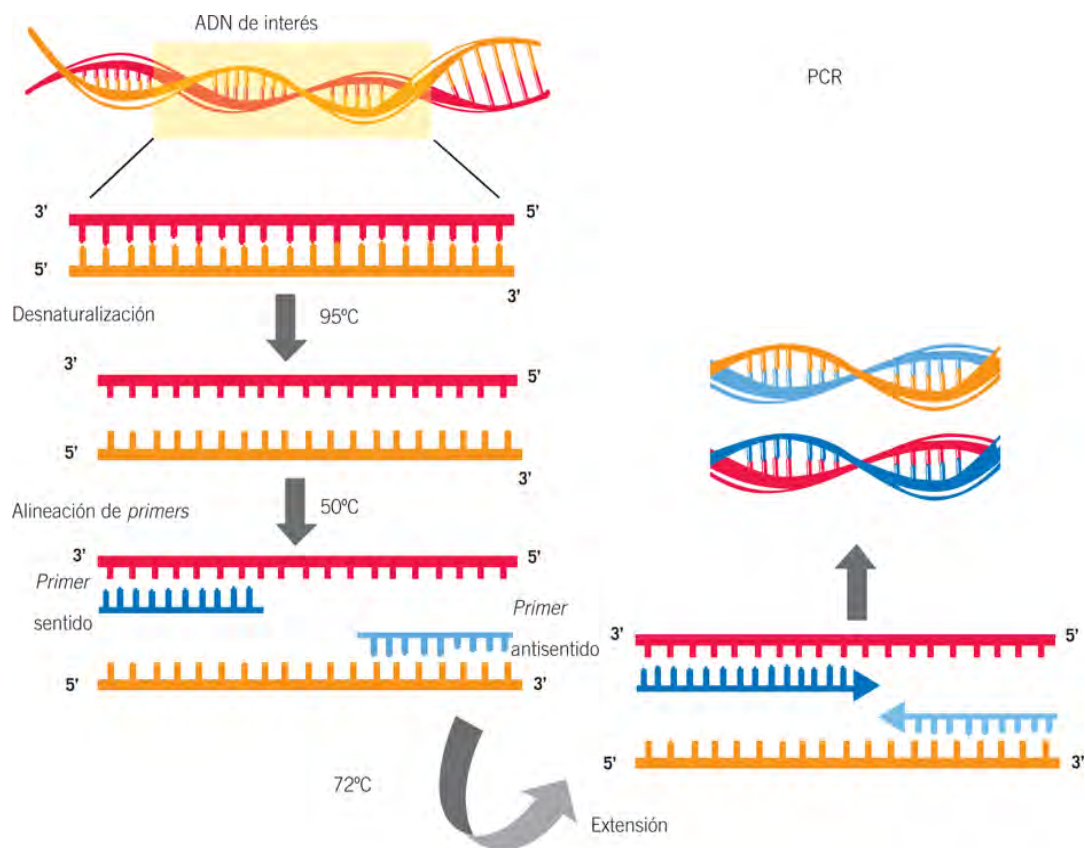


Figura 24. Esquema convencional de una PCR. Los ciclos de la PCR constan de los pasos de desnaturalización, alineación y extensión. Estos pasos se realizan mediante el cambio automático de temperaturas en un termociclador (Armendáriz y cols., 2013).

2.3.1 Tipos de PCR

Se han hecho ciertas modificaciones para estandarizar la PCR, que expandieron el uso de esta técnica ampliando el espectro de microorganismos que pueden detectarse usando estos métodos moleculares. Muchas de estas modificaciones están bien estandarizadas y se han incorporado como técnicas habituales en el laboratorio clínico (Koneman y cols., 2008).

Según la utilidad y la finalidad que se busque, se puede trabajar con diferentes variantes de la técnica de PCR, algunas de las cuales se enlistan a continuación:

a) *PCR convencional*

Se basa en la detección del producto de amplificación mediante una electroforesis en gel de agarosa o acrilamida. El producto amplificado se visualiza mediante una banda. La intensidad de la banda se considera proporcional a la cantidad de producto amplificado y su longitud se verifica interpolando contra un marcador de peso molecular comercial de longitudes conocidas. El análisis de imagen de la banda del producto de PCR permite medir su intensidad mediante *software* y realizar una medición semicuantitativa de las bandas de los productos de PCR obtenidos en diversas muestras (Armendáriz y cols., 2013).

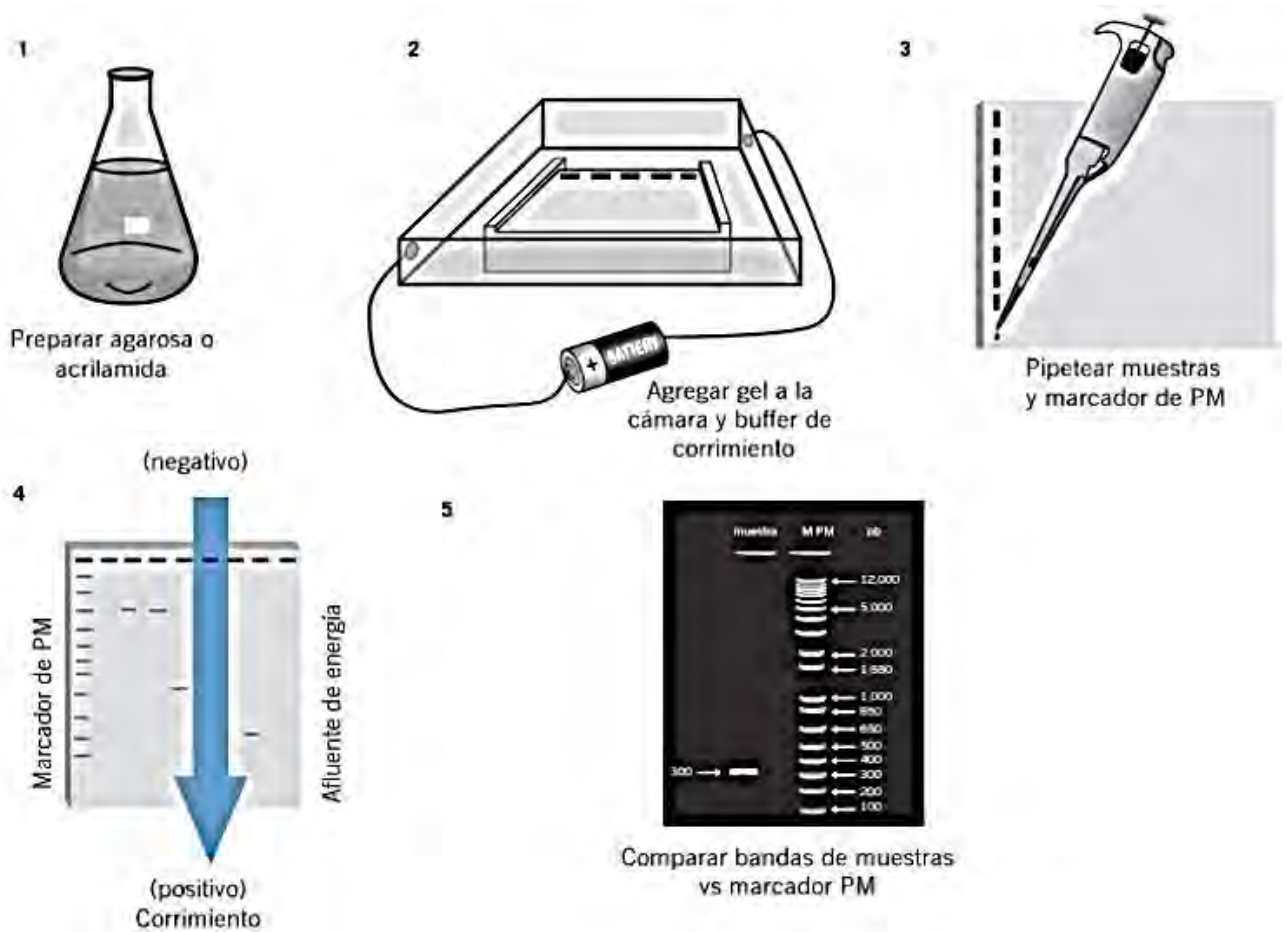


Figura 25. Visualización del producto de PCR mediante electroforesis en gel. La detección del producto de amplificación mediante una electroforesis en gel de agarosa se observa como una banda. La intensidad de la banda se considera proporcional a la cantidad de producto amplificado. En este gel el carril marcado MPM corresponde al marcador de peso molecular de 1Kb *plus DNA ladder*, los valores correspondientes a las bandas se observan en la columna pb (pares de bases). La muestra corresponde a un producto de aproximadamente 300 pb, como se puede apreciar en el carril de muestra (Armendáriz y cols., 2013).

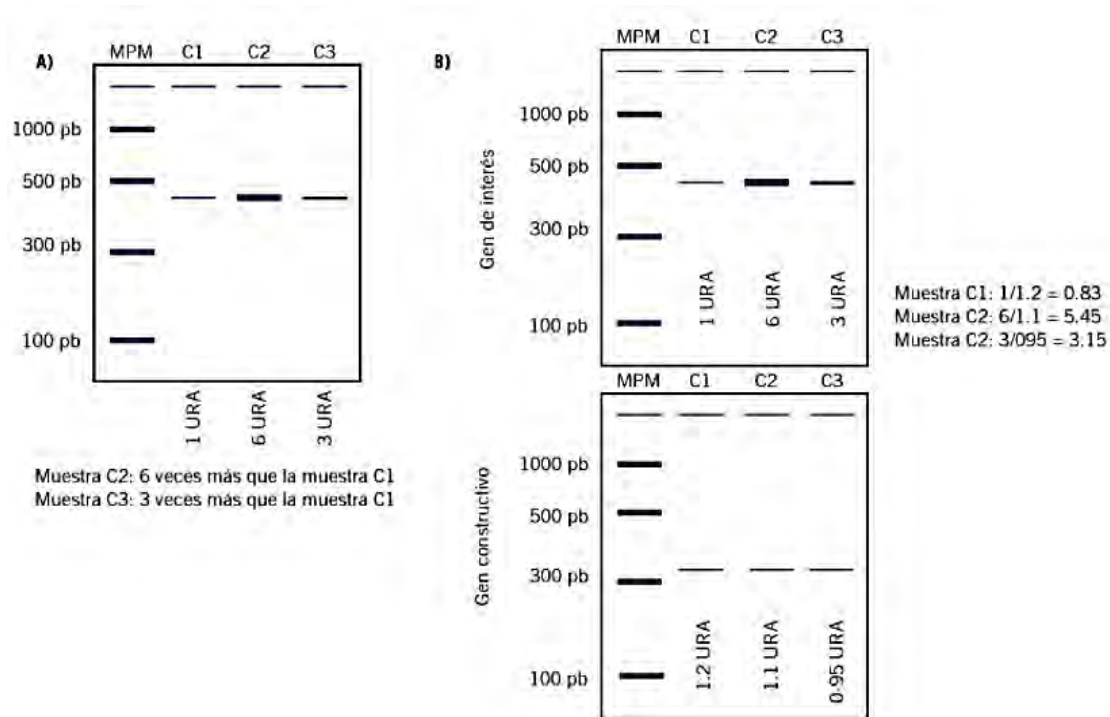


Figura 26. Análisis de imagen de la banda del producto de PCR. La intensidad de la banda del producto de la PCR se mide mediante un software. A) Análisis semicuantitativo respecto a una muestra, en el cual las bandas de los productos de PCR obtenidos de varias muestras se comparan respecto a cualquiera de las muestras contenidas en el gel, como en la imagen donde el carril 3 muestra una banda tres veces más intensa que la banda del carril 1, pero la mitad de intensa que la banda de la muestra del carril 2. B) Semicuantificación respecto a un gen constitutivo, es aquella en la cual se mide la intensidad relativa de la banda del producto de PCR del gen de interés y de un gen constitutivo para cada una de las muestras, se determina la relación gen de interés/gen constitutivo para cada muestra, y dicha relación se compran entre muestras indicando cuál de ellas expresa más o menos el gen de interés normalizado contra el gen constitutivo. (Armendáriz y cols., 2013)

b) PCR múltiplex

Consisten en la amplificación simultánea de varios fragmentos de DNA en la misma PCR. Se trata de una PCR convencional a la que se añaden varias parejas de cebadores. Esta metodología se puede usar con tres objetivos:

- Detección de distintas mutaciones a la vez
- Detección de deleciones al amplificar varios exones de un gen
- Análisis por Polimorfismo de Conformación de Cadena Simple (SSCP) de diferentes fragmentos de PCR, etc.

Esta técnica permite reducir el tiempo y los costos en el análisis de los ácidos nucleicos (Mota y cols., 2016).

c) *RT-PCR (retrotranscriptasa reversa)*

La retrotranscripción es una reacción para la conversión del RNA en cDNA y en general se lleva a cabo antes de una PCR, cuando se pretende analizar secuencias de RNA. La realización consecutiva de una retrotranscripción y una PCR se conoce como RT-PCR. Esta técnica es una variante de la técnica convencional de PCR, con el objetivo de amplificar un RNA específico para evaluar su expresión o presencia. Esta técnica es más sensible y rápida que otras técnicas de análisis de la expresión de genes (Armendáriz y cols., 2013).

El agregado de una etapa RT anterior a la PCR hace posible amplificar y detectar RNA. Esto puede suceder en una reacción tanto de una como de dos etapas. En la reacción RT-PCR de dos etapas se usa una enzima RT separada antes del agregado de la DNA polimerasa, mientras que en la reacción de una sola etapa se usa una única DNA polimerasa termoestable que también tiene actividad RT. El cDNA creado por la transcriptasa inversa puede formarse usando cebadores oligonucleótidos específicos o hexámeros de oligonucleótidos al azar. Luego se realiza la PCR como ya se describió anteriormente (Koneman y cols., 2008).

La RT-PCR es muy útil para detectar virus de RNA, pero también puede usarse para detectar otros microorganismos por señalización del RNA ribosómico. La detección de mRNA es valiosa para estudiar la expresión genética tanto de los microorganismos como de las células hospedadoras humanas (Koneman y cols., 2008).

d) *PCR anidada*

Esta variante de la PCR convencional proporciona mayor sensibilidad a la técnica, al amplificar las secuencias de DNA en dos rondas de amplificación con distintos pares de iniciadores o *primers* en cada una. Esto es, primero se realiza una PCR con un par de iniciadores externos para amplificar una región de DNA extensa, que contiene el segmento diana que se desea amplificar. Después, este producto de amplificación sirve de molde para una segunda PCR con otro par de iniciadores internos (*primers* anidados) para amplificar una región más pequeña (interna). Por lo tanto, la longitud del producto de amplificación de la segunda PCR o PCR anidada, será menor que la del primer producto de PCR (Armendáriz et al, 2013; Koneman et al, 2008).

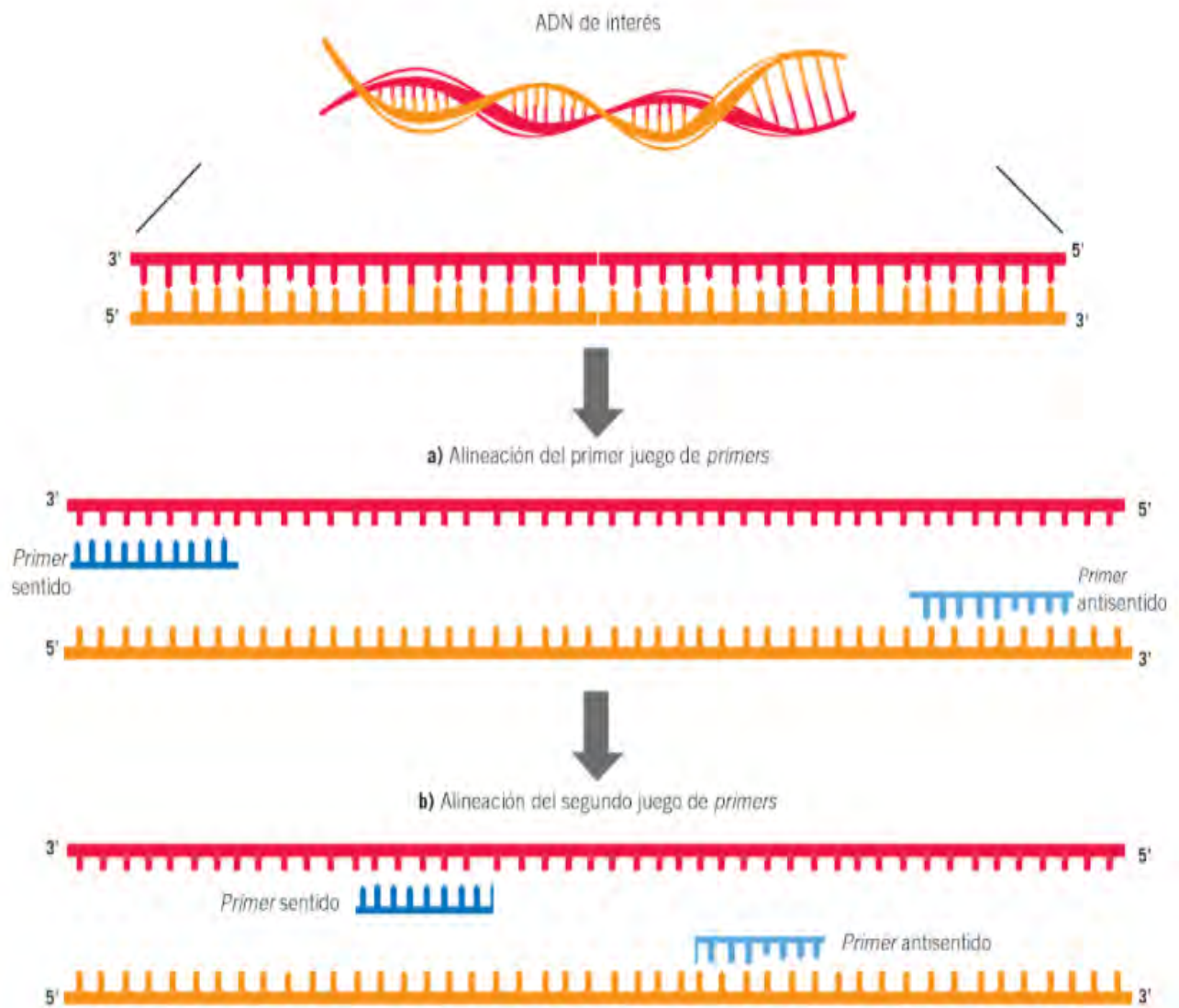


Figura 27. PCR anidada. Esta variante de la PCR fue diseñada para aumentar la sensibilidad de la reacción del ensayo ya que amplifica el DNA en dos rondas de amplificación con distintos pares de cebadores en cada una (Armendáriz y cols., 2013).

e) *PCR en tiempo real*

Se caracteriza porque la amplificación y la detección del producto amplificado se realizan de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de análisis posterior, Además, tiene otra importante ventaja que se pueden cuantificar los productos de amplificación generados durante cada ciclo de la reacción en cadena de la polimerasa, simultáneamente y durante la PCR, mediante la detección por fluorescencia que mide cada espacio de tiempo la cantidad de amplificado. La emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado. Para este proceso se han diseñado nuevos termocicladores que incorporan un lector de fluorescencia y pueden medir en cualquier momento la misma. (González, 2006).

Desde el punto de vista metodológico la PCR en tiempo real tiene tres aplicaciones básicas:

1. ***Detección de mutaciones:*** Está diseñada para identificar mutaciones específicas o genes mutantes, es decir, genotipificar productos de PCR.
2. ***Caracterización de productos:*** Debido a su rapidez es muy útil en la identificación de microorganismos patógenos y en productos específicos.
3. ***Cuantificación:*** Para cuantificación rutinaria de DNA o RNA existen dos métodos generales:

Cuantificación absoluta: determina el número de copia exacta del templado relacionado con la señal de fluorescencia con una curva estándar.

Cuantificación relativa: determina el cambio de la expresión génica en relación con otra muestra que funciona como control. No requiere curva estándar, por lo que consume menos tiempo que la cuantificación absoluta (González, 2006).

3. JUSTIFICACIÓN

Actualmente la infección nosocomial por *Clostridium difficile* se considera un problema grave de salud pública, ya que representa entre un 20 y 30% de los casos de diarrea asociados al uso de antimicrobianos, y es la causa más común de diarrea infecciosa en el ambiente hospitalario. *Clostridium difficile* suele afectar a individuos que tienen como principal factor de riesgo el haber estado bajo tratamiento con antimicrobianos así como pacientes inmunocomprometidos, de edad avanzada o que han permanecido varios días hospitalizados.

En el Hospital de Especialidades “Bernardo Sepúlveda” del Centro Médico Nacional siglo XXI, debido a que se trata de un hospital de tercer nivel, se atiende diariamente a un gran número de pacientes que presentan alguno o varios de los factores de riesgo asociados a la ICD lo cual hace de *Clostridium difficile* un patógeno importante para la salud y con alto potencial epidémico.

Puesto que *Clostridium difficile* es un microorganismo del cual se dificulta su aislamiento y por lo tanto su diagnóstico, para evitar el fatal desenlace al que puede llevar una ICD y debido al aumento de los casos presentados en dicho hospital, es necesario contar con las técnicas diagnósticas apropiadas que permitan la detección certera y oportuna del microorganismo.

En este caso, la implementación de una técnica molecular como lo es la PCR multiplex, permite obtener resultados certeros y en el menor tiempo posible. Al hacer un diagnóstico rápido y preciso de *Clostridium difficile* se permite al médico el otorgar al paciente el tratamiento adecuado, lo que impide agravar el cuadro de infección y la diseminación del patógeno a otros pacientes.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Implementar la técnica de PCR multiplex para la identificación de los genes *tcdA*, *tcdB*, *cdtB*, *tpi* y *tcdC* en muestras de heces diarreicas de pacientes con sospecha clínica de infección por *Clostridium difficile*.

4.2 Objetivos específicos

- Seleccionar un método de extracción de DNA adecuado para la determinación de *C. difficile*
- Identificar mediante PCR multiplex la presencia de las toxinas A, B y binaria en las muestras de heces para la confirmación del diagnóstico.
- Estudiar la prevalencia y la importancia del diagnóstico oportuno de este microorganismo en pacientes comprometidos.
- Evaluar la importancia de la evolución en la ICD y determinar los factores de riesgo que permiten predecir la misma clínicamente.
- Conocer la patogénesis y estrategias terapéuticas sobre el manejo de la infección por este patógeno.

5. HIPÓTESIS

La ausencia de la amplificación del gen *tpi* en las muestras analizadas nos indicará un resultado negativo para *Clostridium difficile*; por otra parte, aquellas muestras analizadas en donde se identifique la presencia del gen *tpi* y de alguno de los genes *tcdA*, *tcdB*, *cdtB*, y/o *tcdC* nos indicará un resultado positivo para *Clostridium difficile* toxigénico; mientras que aquellas muestras en donde se identifique la presencia del gen *tpi*, pero, la ausencia de los genes *tcdA*, *tcdB*, *cdtB*, y *tcdC* nos indicará un resultado positivo para *Clostridium difficile* no toxigénico.

6. METODOLOGÍA

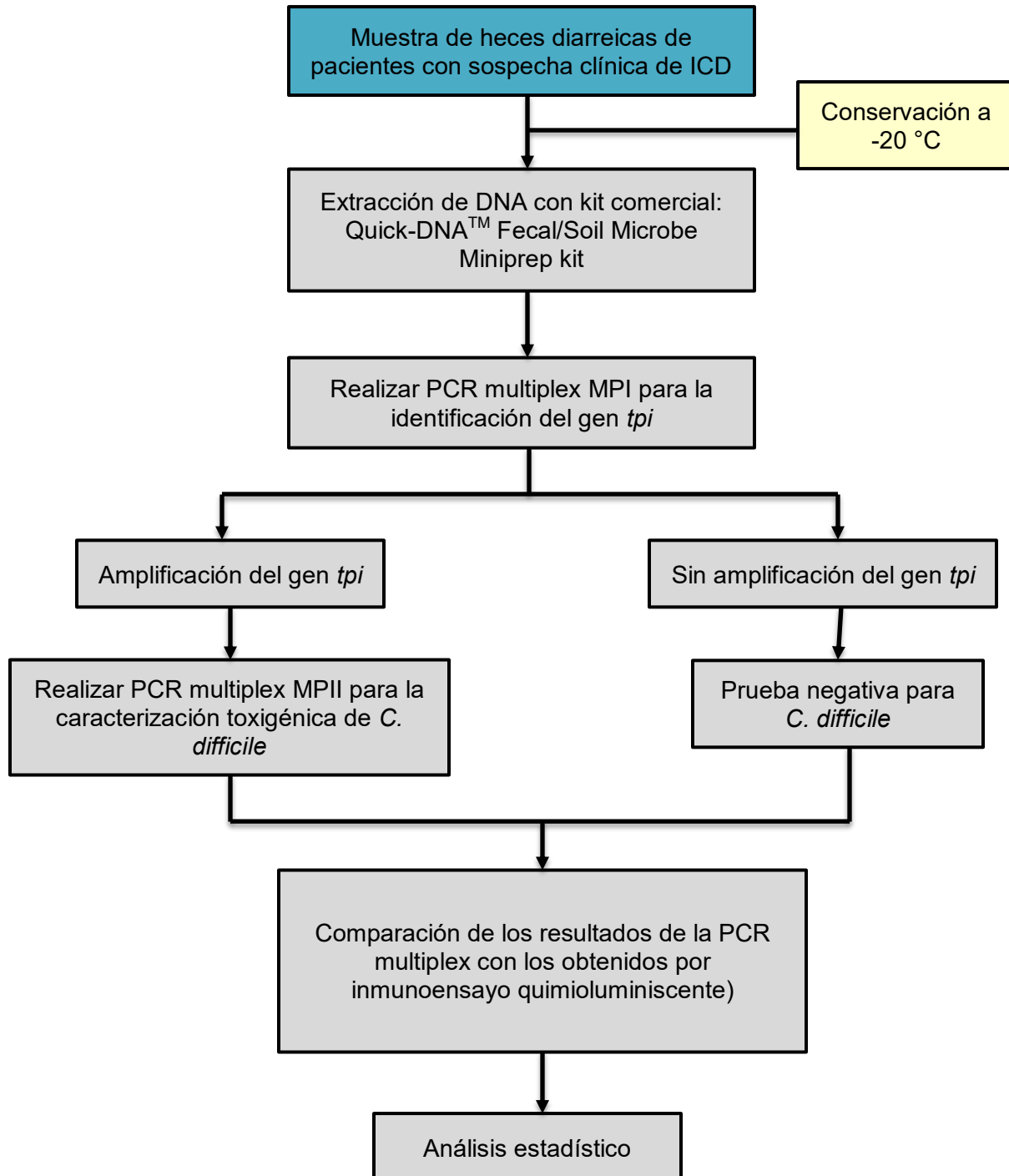


Figura 28. Diagrama de trabajo

6.1 Pacientes y muestras

El estudio se llevó a cabo en el Hospital de Especialidades “Bernardo Sepúlveda” del Centro Médico Nacional Siglo XXI ubicado en la Ciudad de México. Se obtuvieron un total de 36 muestras de heces líquidas o blandas enviadas a la sección de Bacteriología del laboratorio Central para la prueba de *Clostridium difficile* en el periodo comprendido entre el 18 de enero y el de 9 de abril de 2018. Entre estos, solo se utilizó la primera muestra obtenida de cada paciente único.

El criterio para procesar las muestras por las diferentes pruebas fue la presencia de diarrea infecciosa. Las muestras fueron enviadas a temperatura ambiente sin un medio de transporte, en un recipiente con tapa de rosca. Las muestras con solicitud de diagnóstico de CD fueron divididas: una porción posteriormente enviada al laboratorio de maquila y otra porción al diagnóstico molecular. De esas muestras se obtuvieron pequeñas alícuotas que fueron almacenadas en tubos con tapa de rosca e identificados con la etiqueta con código de barras correspondiente a los datos del paciente. Posteriormente fueron almacenadas a -20°C hasta el momento de su análisis. El criterio de inclusión por edad fue de pacientes mayores de 18 años. Todas las pruebas de PCR se realizaron cegadas a los resultados del ensayo de quimioluminiscencia realizado en el laboratorio de maquila.



Figura 29. Muestras de heces diarreicas de pacientes con sospecha clínica de ICD. Las muestras son identificadas con la etiqueta con código de barra además se muestra Nombre, Folio, Número de seguridad Social, Fecha y Cama.

6.2 Controles

Se utilizaron como controles positivos, alícuotas a partir del cultivo de la Cepa ribotipo 027, así como una muestra de DNA de CD ribotipo 027 proporcionado por la UIMEIP del Hospital de Pediatría del CMN S. XXI. Además se utilizaron como controles negativos, una cepa de *E. coli*, *Candida albicans*, de los cuales se hicieron alícuotas. Todos los controles se almacenaron a -20°C. Una muestra de tierra fue inoculada e incubada en anaerobiosis a 37°C por 7 días en el medio “Cooked meat” para la obtención de otros Clostridios. Como control negativo se utilizó agua grado molecular.

6.3 Preparación de muestras

Las muestras y alícuotas de los controles se descongelaron a temperatura ambiente. Del cultivo del medio “cooked meat” se obtuvo una alícuota para realizar la extracción de DNA.

6.4 Materiales, equipos y reactivos

Tabla 4. *Material, Equipos y reactivos a utilizar.*

Materiales	Equipos	Reactivos
Tubos Eppendorf de 1.5mL, 0.6 mL, 0.2 mL.	Vortex	Agua destilada
Aplicadores de madera	Balanza	TAE 0.5X
Micropipeta de 0.2-2µL, 2-20µL, 100-1000µL	Centrífuga	Buffer de Carga*
Puntas para micropipeta (blancas, amarillas y azules)	Cámara para electroforesis	Bromuro de etidio
Matraz Erlenmeyer de 125mL	Eppendorf® Termociclador	Agarosa
	Fotodocumentador Gel	Marcador de Peso molecular*
	Doc™ EZ System	Master Mix*

Todas las soluciones y materiales de trabajo deben ser nuevos, estériles y estar libres de DNasas, RNasas y Proteasas.

*Especificaciones en Anexos

6.5 Extracción del DNA

La extracción del DNA de las muestras se llevó a cabo mediante el uso del kit comercial Quick-DNA™ Fecal/Soil Microbe Miniprep Kit, llevando a cabo la siguiente metodología con cada muestra recolectada:

- Etiquetar todos los tubos a utilizar con el número de muestra correspondiente.
- Colocar aproximadamente 150 mg de materia fecal en un tubo de lisis y agregar 750 µL de buffer de lisis al tubo.
- Mezclar en vortex por 3 min.
- Centrifugar cada tubo de lisis en una microcentrífuga a 10000 rpm/1 min.
- Transferir 400 µL de sobrenadante a un filtro Zymo-Spin III-F en un tubo de recolección y centrifugar a 10000 rpm/1 min.
- Añadir 1200 µL de buffer de lisis genómico al filtrado en el tubo de recolección anterior.
- Transferir 800 µL de la mezcla del paso anterior a una columna Zymo-Spin IIC en un tubo de recolección y centrifugar a 10000 rpm/1 min.
- Descartar el sobrenadante y repetir el paso anterior.
- Adicionar 200 µL de buffer de prelavado de DNA a la columna Zymo-Spin IIC en un tubo de recolección nuevo y centrifugar a 10000 rpm/1 min.
- Añadir 500 µL de buffer de lavado de DNA a la columna y centrifugar a 10000 rpm/1 min.
- Transferir la columna Zymo-Spin IIC a un tubo eppendorf de 1.5 mL y adicionar 100 µL de buffer de elución directamente en la columna. Centrifugar a 10000 rpm/ 30 s
- Colocar un filtro Zymo-Spin III-HRC en un tubo de recolección limpio y añadir 600µL de solución de preparación. Centrifugar a 8000 rpm/3 min
- Transferir el DNA eluido al filtro preparado en tubo eppendorf limpio de 1.5 mL y centrifugar a 12000 rpm/ 3 min.
- El DNA filtrado se almacena a 4 °C

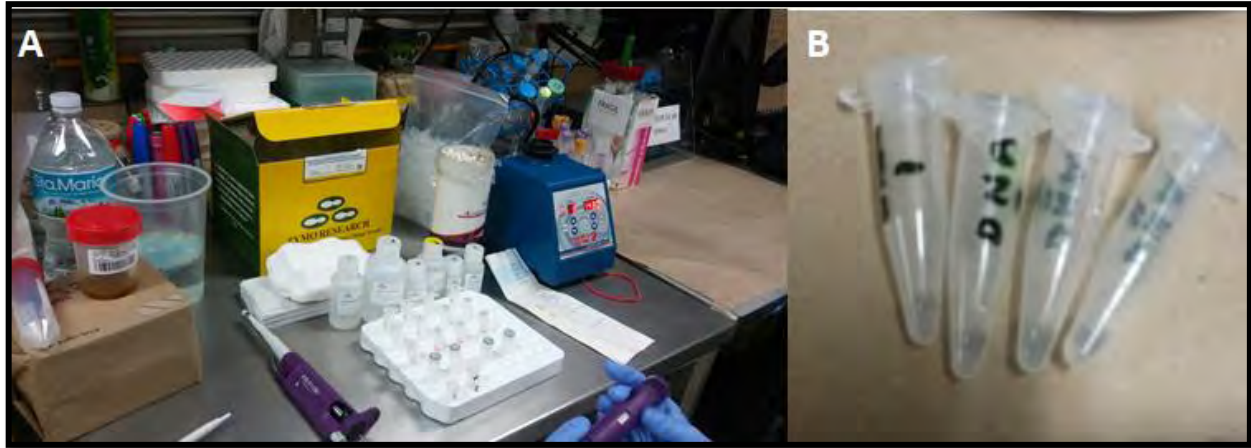


Figura 30. Extracción de DNA. A). Se muestra el montaje del kit comercial Quick-DNA™ Fecal/Soil Microbe Miniprep Kit, y el material a utilizar (vortex, pipeta, aplicadores de madera, bote para residuos). B) DNA extraído

6.6 Amplificación del DNA por PCR multiplex

6.6.1 Oligonucleótidos

Se realizaron dos PCR multiplex, MPI para la confirmación de la especie de *Clostridium difficile*, y, MPII para la detección de los genes que codifican para las toxinas A, B y Binaria.

Se utilizaron 5 pares de oligonucleótidos complementarios a distintas secuencias de DNA específicas para la identificación de los genes del PaLoc de *C. difficile*. Los oligonucleótidos utilizados fueron de la marca comercial IDT (Integrated DNA Technologies). La concentración utilizada de cada uno fue de 10 μ M. La preparación de los oligonucleótidos se explica detalladamente en anexos

A continuación, en la siguiente tabla se muestran las características de los oligonucleótidos utilizados en la PCR multiplex.

Tabla 5. Características de los oligonucleótidos utilizados para la identificación de *C. difficile*.

Nombre	Secuencia	Tm (°C)	Gen	Tamaño producto (pb)	Descripción
cdtB-F1 cdtB-F2	5'-TGGACAGGAAGAATAATTCCTTC-3' 5'-TGCAACTAACGGATCTCTTGC-3'	68.2 68.9	<i>cdtB</i>	582	Subunidad B Toxina Binaria
tcdA-F tcdA-RA3B	5'-AGATTCCTATATTTACATGACAATAT-3' 5'-ACCATCAATCTCGAAAAGTCCAC-3'	65.0 70.0	<i>tcdA</i>	420	Toxina A
tcdB-F3 tcdB-F4	5'-AATGCATTTTTGATAAACACATTG-3' 5'-AAGTTTCTAACATCATTCCAC-3'	63.9 63.9	<i>tcdB</i>	329	Toxina B
tpi-F tpi-R	5'-AAAGAAGCTACTAAGGGTACAAA-3' 5'-CATAATATTGGGTCTATTCCCTAC-3'	66.4 66.4	<i>tpi</i>	230	Triosa fosfato isomerasa*
Pal-F15 Pal-F16	5'-TCTCTACAGCTATCCCTGGT-3' 5'-AAAAATGAGGGTAACGATTT-3'	68.2 61.1	<i>tcdC</i>	673	Regulador negativo del PaLoc

En esta tabla se observa la secuencia “forward” y “reverse” de cada cebador, así como la temperatura de fusión, el tamaño de producto y el gen que amplifica cada uno de ellos.

*Específica de *C. difficile*

6.6.2 Preparación de la mezcla de reacción

Se trabajó con el DNA extraído directamente de las heces fecales de pacientes con sospecha clínica de la infección y con el DNA extraído de las cepas de los controles negativos (*E. coli*, *Candida albicans*, *Clostridium difficile* ribotipo 027 y otros Clostridios en medio “Cooked meat”).

En la siguiente tabla se muestran los componentes de cada mezcla de reacción utilizada para la amplificación del DNA.

Tabla 6. Componentes de la mezcla de reacción.

MPI		MPII	
Componente	Volumen (µL)	Componente	Volumen (µL)
2X Master Mix *	12.5	2X Master Mix*	12.5
<i>tpi</i> F/R (10µM)	0.50	<i>cdtB</i> F1/R1 (10 µM)	0.75
<i>tcdC</i> F-15/R-16 (10µM)	0.75	<i>tcdA</i> F/R-A3B (10 µM)	0.75
		<i>tcdB</i> F3/R4 (10 µM)	0.75
Agua grado molecular	9.50	Agua grado molecular	8.50
DNA	2.00	DNA	2.00

En la presente tabla podemos observar el volumen requerido de cada componente

*Especificaciones en anexos

6.6.3 Condiciones de la reacción

La amplificación del DNA se realizó en el Eppendorf® Termociclador bajo las siguientes condiciones:

Tabla 7. Condiciones de la reacción de PCR multiplex.

Desnaturalización del DNA:	1 ciclo: 95°C / 15 min
Reacción de amplificación:	30 ciclos: 94°C / 30 seg. 57°C / 90 seg. 72°C / 60 seg.
Extensión final:	1 ciclo: 72°C / 7 min.

* Las reacciones se mantuvieron a 4°C

6.6.4 Electroforesis en gel de agarosa

1. Preparación de gel de agarosa al 1.5% en buffer TBE 0.5X con 2 μL de bromuro de etidio.
2. Se mezclar 10 μL de producto de reacción con 1 μL de buffer de carga.
3. Cargar la mezcla en cada pocillo del gel.
4. Cargar el marcador de peso molecular de 100pb (DNA Ladder) en cada extremo del gel.
5. Correr aplicando un voltaje de 100V por 90 minutos.
6. Visualizar las bandas del gel de agarosa y capturar la imagen mediante el fotodocumentador Gel Doc™ EZ System.
7. Comparar el tamaño de los fragmentos con el marcador de peso molecular.

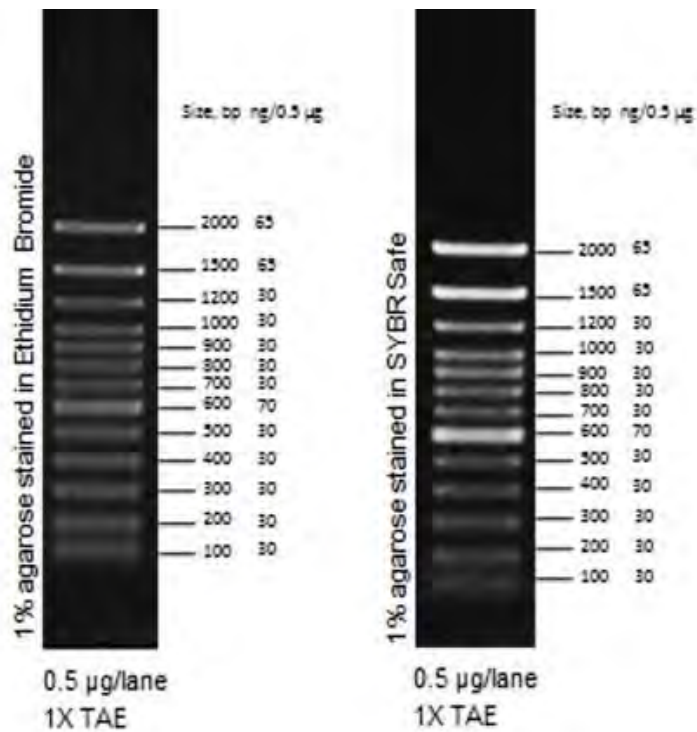


Figura 31. Marcador de peso molecular de 100pb DNA Ladder.

6.7 Identificación de las toxinas A y B por Quimioluminiscencia

El laboratorio de maquila utiliza el ensayo LIAISON® *C. difficile* Toxins A&B de Diasorin. Es un inmunoensayo quimioluminiscente (QL) indicado para la determinación cualitativa de toxinas A y B de *Clostridium difficile* en heces humanas. Se trata de un ensayo modificado de dos fases y dos anticuerpos de tipos sándwich para la detección de la toxina A y la toxina B.

En el ensayo se utiliza 1 anticuerpo monoclonal de captura y 1 anticuerpo policlonal de detección de la molécula de la toxina A, además de 1 anticuerpo policlonal para captura y detección de la molécula de la toxina B: El ensayo utiliza 200 µL de muestra formada por una mezcla de diluyente de muestras y toxinas A y B extraídas de las heces e incubadas con anticuerpos de isoluminol conjugado para la toxina A y toxina B.

Tras la incubación, se añaden a la reacción partículas paramagnéticas revestidas con anticuerpos de captura para la toxina A y la toxina B, y se vuelve a incubar. Tras la segunda incubación, el material libre se elimina en un ciclo de lavado. A continuación se agregan los reactivos iniciadores y tiene lugar una reacción quimioluminiscente rápida.

La señal luminosa se mide en unidades lumínicas relativas (ULR) con un fotomultiplicador y es proporcional a la concentración de toxina A y toxina B presente en los calibradores, controles o muestras. (DiaSorin, 2012)

Los resultados del paciente deben interpretarse como se indica a continuación:

Tabla 8. Interpretación de los resultados de Quimioluminiscencia para el diagnóstico de CD

Índice	Resultado	Interpretación
< 0.90	Negativo	Indica la ausencia de toxinas A y/o B, (o bien que el nivel de toxina es inferior al que puede detectar el ensayo.)
≥ 0.90 y < 1.10	Dudoso	Las muestras con resultado dudoso deben analizarse de nuevo con una nueva extracción de la muestra original a fin de confirmar el resultado inicial. Las muestras que dan positivo (≥ 1.10) en el segundo ensayo deben considerarse como positivas. Las muestras que dan negativo (< 0.90) en el segundo ensayo deben considerarse como negativas. Para muestras con resultado dudoso en el ensayo repetido, será necesario recoger y procesar muestras nuevas.
≥ 1.10	Positivo	Indica la presencia de toxinas A y/o B de <i>C. difficile</i> detectables.

7. RESULTADOS

A continuación se muestran los resultados obtenidos de la PCR multiplex:

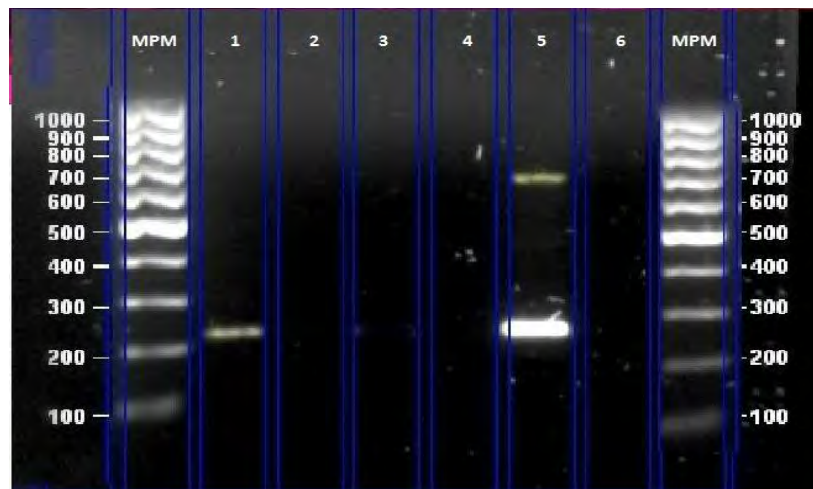


Figura 32. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, de la PCR multiplex MPI para la amplificación del fragmento correspondiente al gen *tpi* y al gen *tcdC* en los controles. El tamaño del fragmento de *tpi* es de 230 pb y el del *tcdC* de 673 pb. **MPM:** Marcador de peso molecular (100 pb DNA Ladder). **Carril 1:** DNA extraído de la cepa de *Clostridium difficile*, **Carril 2:** DNA de *Escherichia coli.*, **Carril 3:** DNA extraído a partir de la alícuota tomada del medio Cooked meat, **Carril 4:** DNA de *Candida albicans*, **Carril 5:** DNA puro de *Clostridium difficile*, **Carril 6:** Control Negativo.



Figura 33. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de la PCR multiplex MPII para la amplificación del fragmento correspondiente a los genes *cdtB* (Toxina binaria), *tcdA* (Toxina A) y *tcdB* (Toxina B) en los controles. El tamaño del fragmento de la toxina Binaria es de 582 pb, el de la Toxina A es de 420 pb y el de la Toxina B de 329 pb. **MPM:** Marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder). **Carril 1:** DNA extraído de la cepa de *Clostridium difficile*, **Carril 2:** DNA de *Escherichia coli.*, **Carril 3:** DNA extraído a partir de la alícuota tomada del medio Cooked meat, **Carril 4:** DNA de *Candida albicans*, **Carril 5:** DNA puro de *Clostridium difficile*, **Carril 6:** Control Negativo.

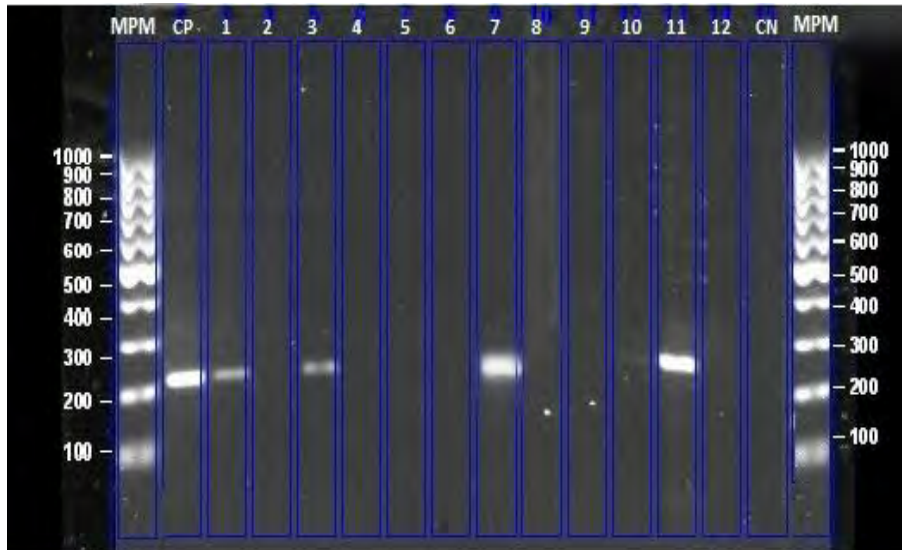


Figura 34. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de la PCR multiplex MPI para la amplificación del fragmento correspondiente al gen *tpi* en las muestras de los pacientes 1-12. El tamaño del fragmento de *tpi* es de 230 pb. **MPM**: Marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder). **CP**: Control positivo (DNA puro de *Clostridium difficile*), **Carriles del 1 al 12**: muestras de pacientes, **CN**: Control Negativo. Las muestras positivas presentan una banda que se ubica en un tamaño alrededor de 200pb. La ausencia de bandas indica un resultado negativo.

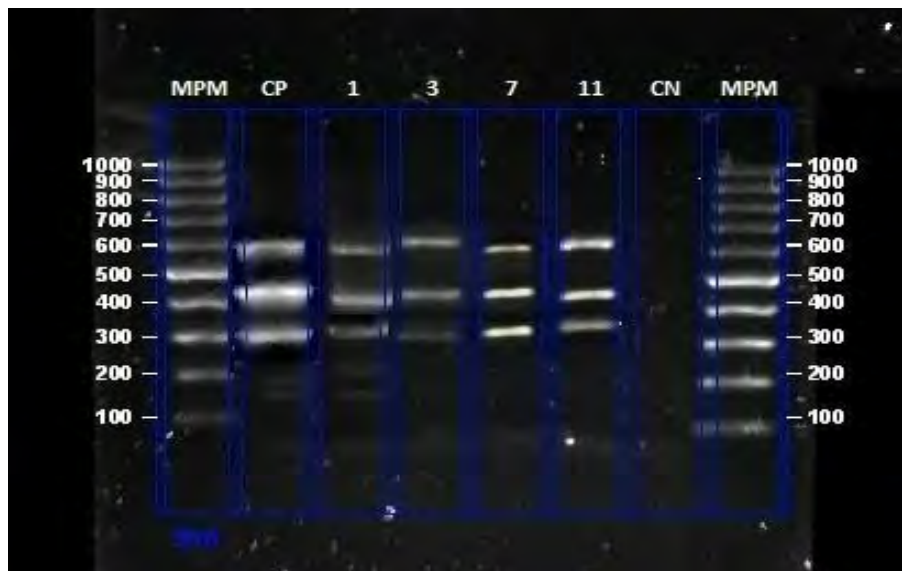


Figura 35. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de la PCR multiplex MPII para la amplificación del fragmento correspondiente a los genes *cdtB* (Toxina binaria), *tcdA* (Toxina A) y *tcdB* (Toxina B) en las muestras de los pacientes 1, 3, 7 y 11. El tamaño del fragmento de la toxina Binaria es de 582 pb, el de la Toxina A es de 420 pb y el de la Toxina B de 329 pb. **MPM**: Marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder). **CP**: Control positivo (DNA puro de *Clostridium difficile*), **Carriles 1, 3, 7 y 11**: muestras de los pacientes 1, 3, 7 y 11, **CN**: Control Negativo. La ausencia de bandas indica un resultado negativo.

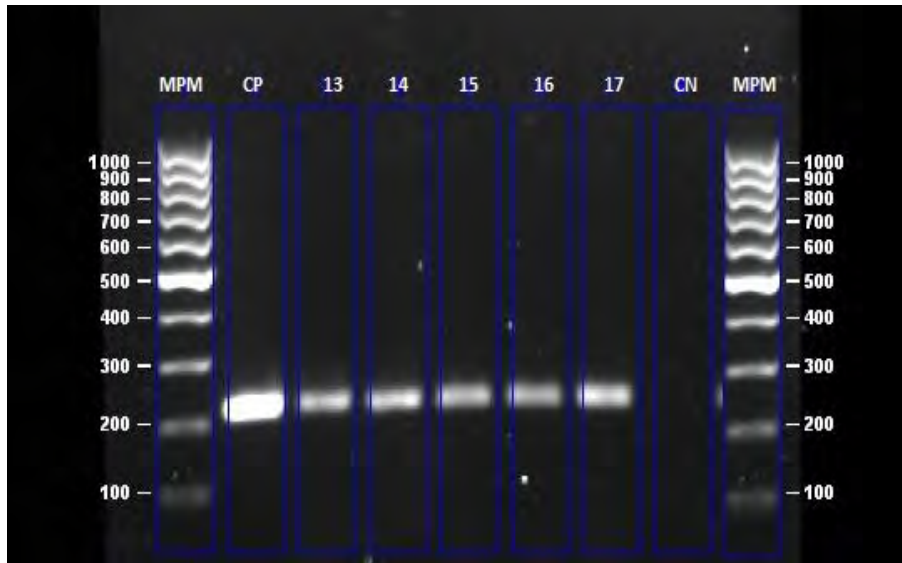


Figura 36. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de la PCR multiplex MPI para la amplificación del fragmento correspondiente al gen *tpi* en las muestras de los pacientes 13-17. El tamaño del fragmento de la *tpi* es de 230 pb. **MPM**: Marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder). **CP**: Control positivo (DNA puro de *Clostridium difficile*), **Carriles del 13 al 17**: muestras de los pacientes 13 al 17, **CN**: Control Negativo. Las muestras positivas presentan una banda que se ubica en un tamaño alrededor de 200pb. La ausencia de bandas indica un resultado negativo.

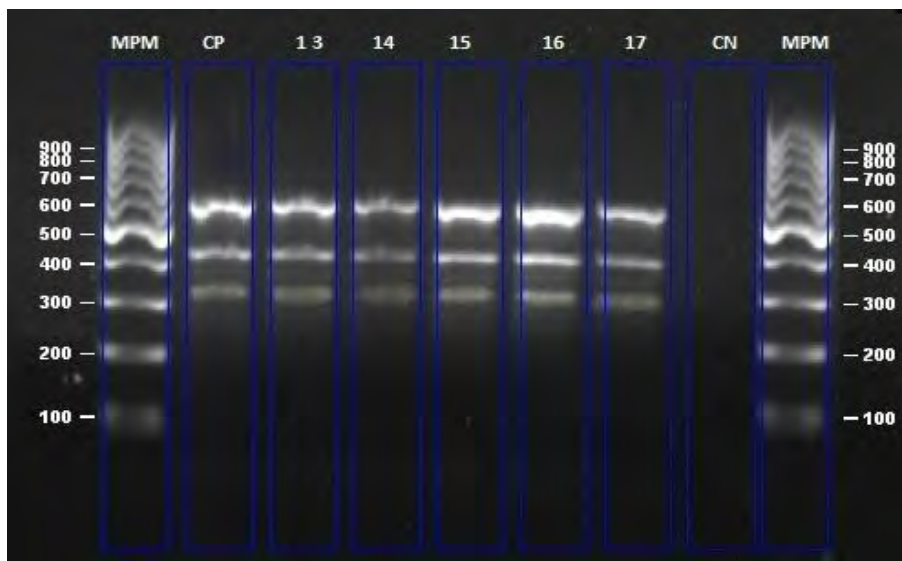


Figura 37. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de la PCR multiplex MPII para la amplificación del fragmento correspondiente a los genes *cdtB* (Toxina binaria), *tcdA* (Toxina A) y *tcdB* (Toxina B) en las muestras de los pacientes 13-17. El tamaño del fragmento de la toxina Binaria es de 582 pb, el de la Toxina A es de 420 pb y el de la Toxina B de 329 pb. **MPM**: Marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder). **CP**: Control positivo (DNA puro de *Clostridium difficile*), **Carriles del 13 al 17**: muestras de los pacientes 13 al 17, **CN**: Control Negativo. La ausencia de bandas indica un resultado negativo.

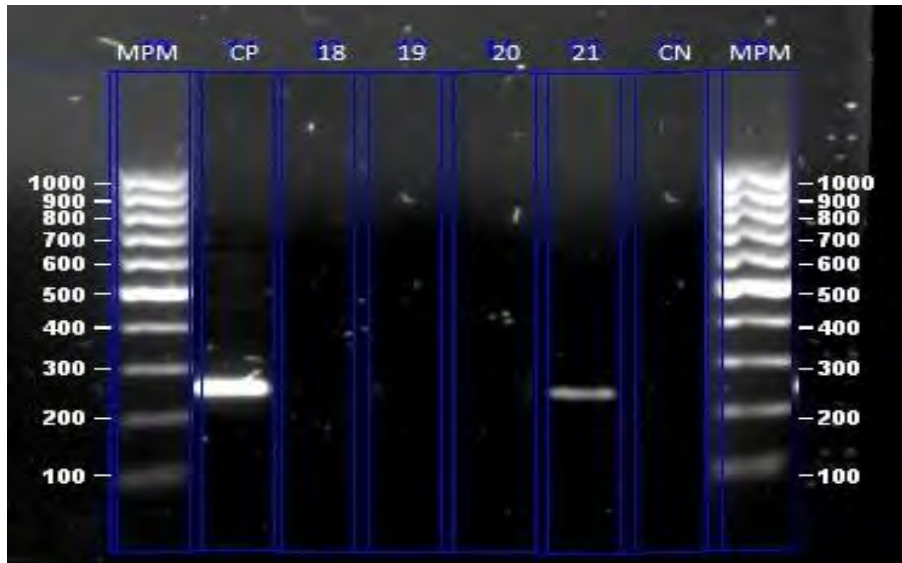


Figura 38. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de la PCR multiplex MPI para la amplificación del fragmento correspondiente al gen *tpi* en las muestras de los pacientes 18-21. El tamaño del fragmento de *tpi* es de 230 pb. **MPM**: Marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder). **CP**: Control positivo (DNA puro de *Clostridium difficile*), **Carriles del 18 al 21**: muestras de los pacientes 18 al 21, **CN**: Control Negativo. Las muestras positivas presentan una banda que se ubica en un tamaño alrededor de 200pb. La ausencia de bandas indica un resultado negativo.

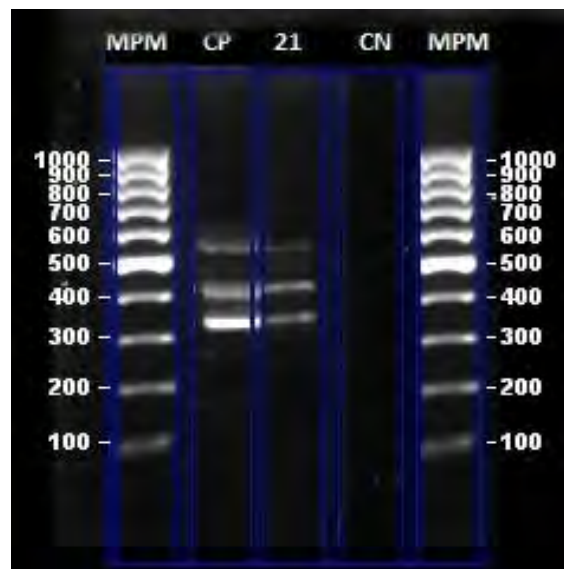


Figura 39. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de la PCR multiplex MPII para la amplificación del fragmento correspondiente a los genes *cdtB* (Toxina binaria), *tcdA* (Toxina A) y *tcdB* (Toxina B) en las muestras del paciente 21. El tamaño del fragmento de la toxina Binaria es de 582 pb, el de la Toxina A es de 420 pb y el de la Toxina B de 329 pb. **MPM**: Marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder). **CP**: Control positivo (DNA puro de *Clostridium difficile*), **Carril 21**: muestras del paciente 21, **CN**: Control Negativo. La ausencia de bandas indica un resultado negativo.

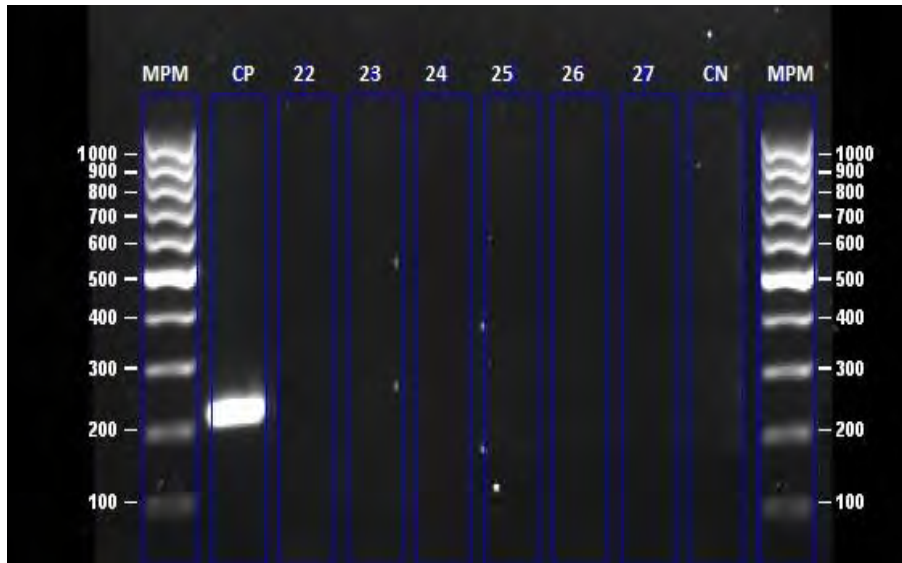


Figura 40. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de la PCR multiplex MPI para la amplificación del fragmento correspondiente al gen *tpi* en las muestras de los pacientes 22-27. El tamaño del fragmento de *tpi* es de 230 pb. **MPM**: Marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder). **CP**: Control positivo (DNA puro de *Clostridium difficile*), **Carriles del 22 al 27**: muestras de los pacientes 22 al 27, **CN**: Control Negativo. Las muestras positivas presentan una banda que se ubica en un tamaño alrededor de 200pb. La ausencia de bandas indica un resultado negativo.

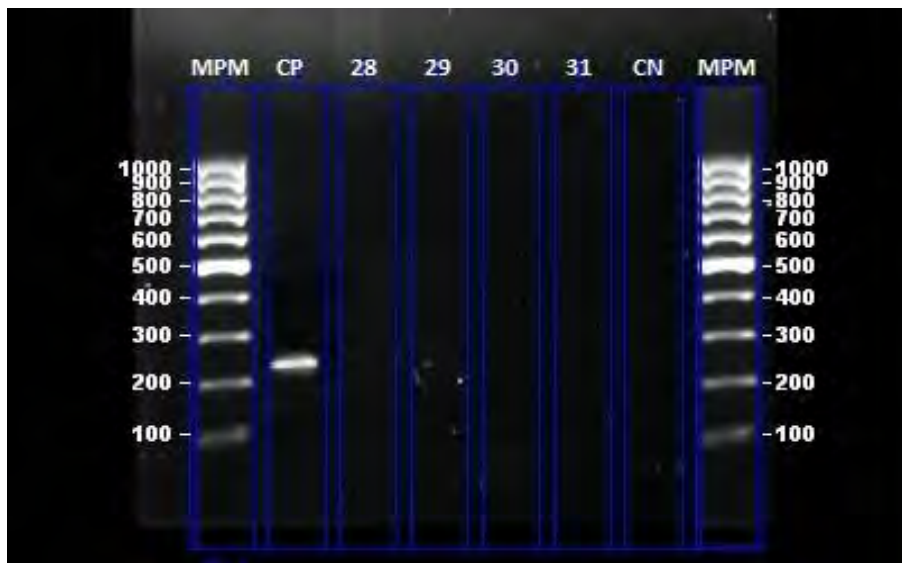


Figura 41. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de la PCR multiplex MPI para la amplificación del fragmento correspondiente al gen *tpi* en las muestras de los pacientes 28-31. El tamaño del fragmento de *tpi* es de 230 pb. **MPM**: Marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder). **CP**: Control positivo (DNA puro de *Clostridium difficile*), **Carriles del 28 al 31**: muestras de los pacientes 28 al 31, **CN**: Control Negativo. Las muestras positivas presentan una banda que se ubica en un tamaño alrededor de 200pb. La ausencia de bandas indica un resultado negativo.

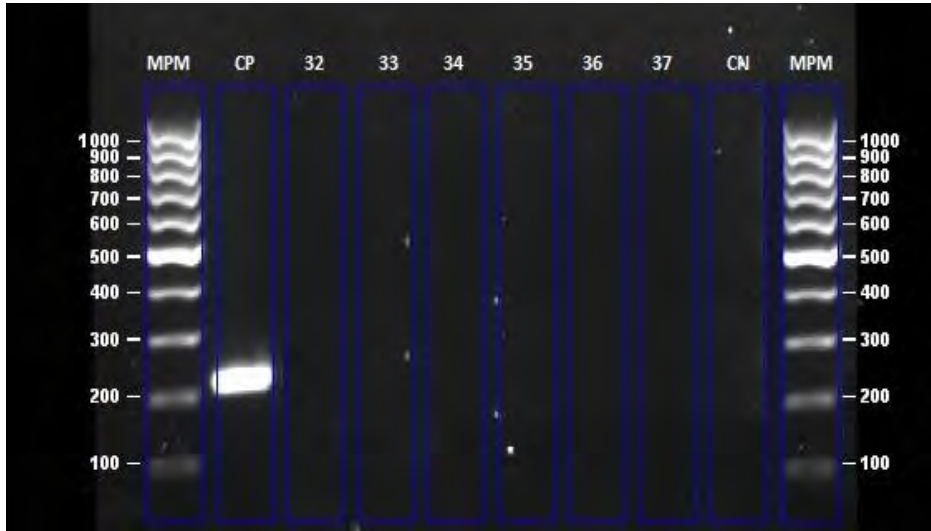


Figura 42. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de la PCR multiplex MPI para la amplificación del fragmento correspondiente al gen *tpi* en las muestras de los pacientes 32-37. El tamaño del fragmento de *tpi* es de 230 pb. **MPM:** Marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder). **CP:** Control positivo (DNA puro de *Clostridium difficile*), **Carriles del 32 al 37:** muestras de los pacientes 32 al 37, **CN:** Control Negativo. Las muestras positivas presentan una banda que se ubica en un tamaño alrededor de 200pb. La ausencia de bandas indica un resultado negativo.

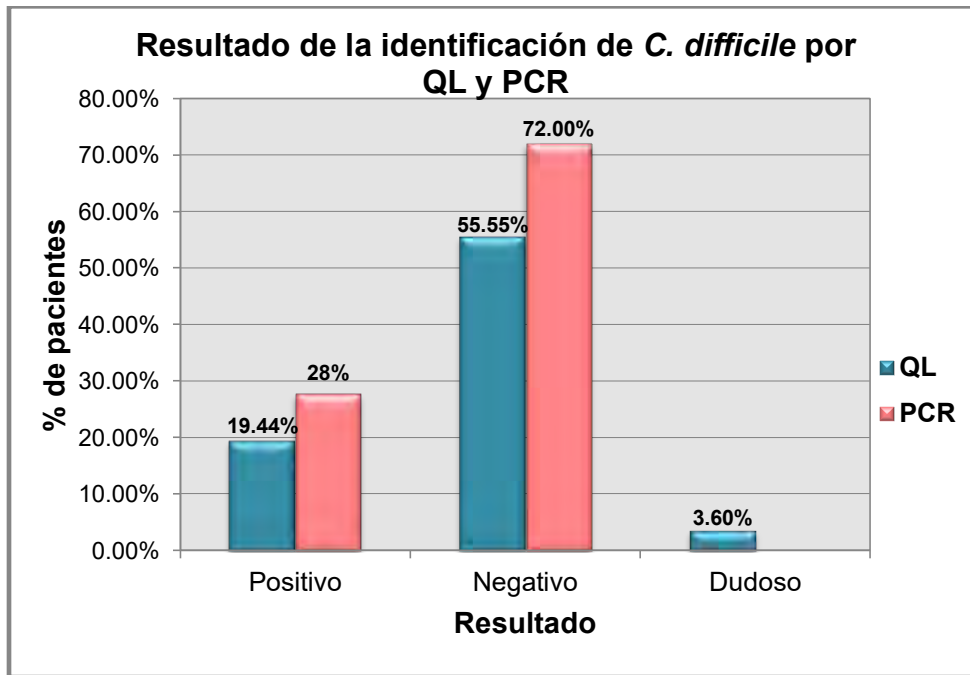


Figura 43. Resultado de la identificación de *C. difficile* por QL y PCR.

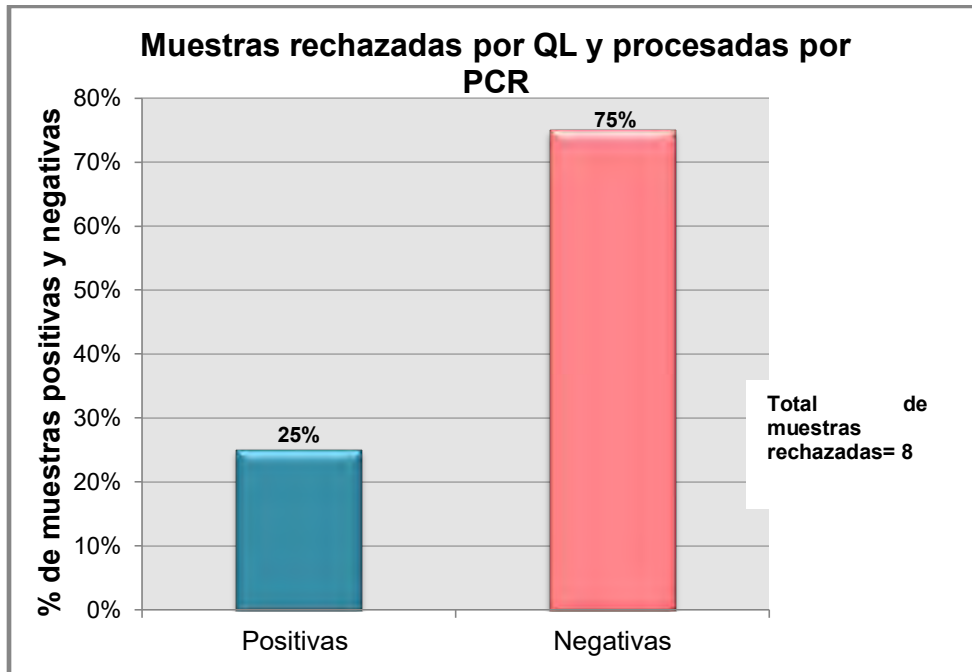


Figura 44. Porcentaje de las muestras aceptadas y rechazadas en QL y PCR.

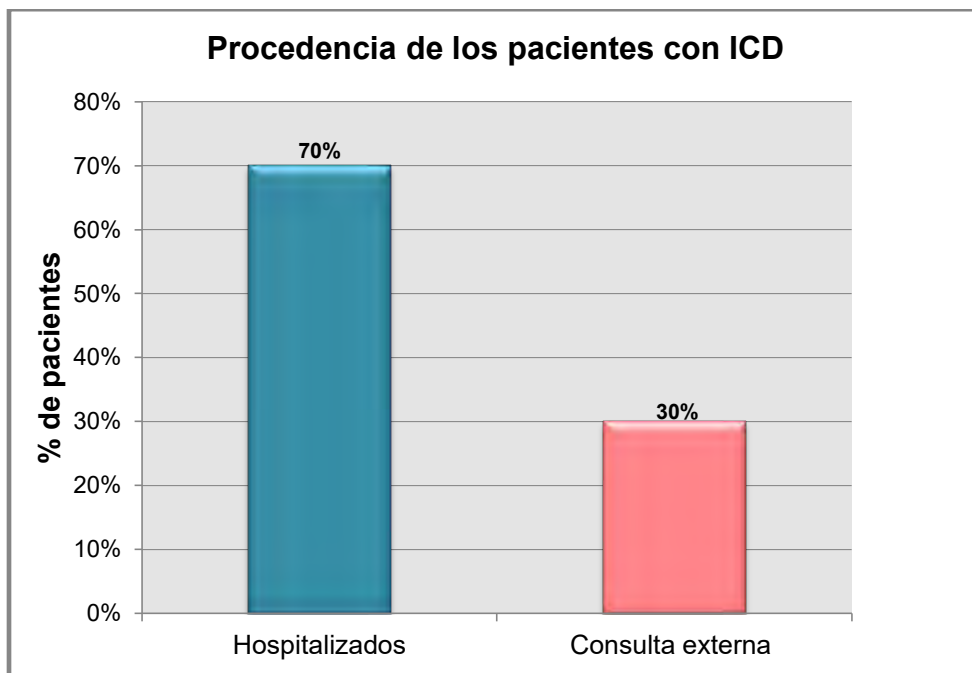


Figura 45. Representación gráfica de la procedencia de los pacientes con ICD.

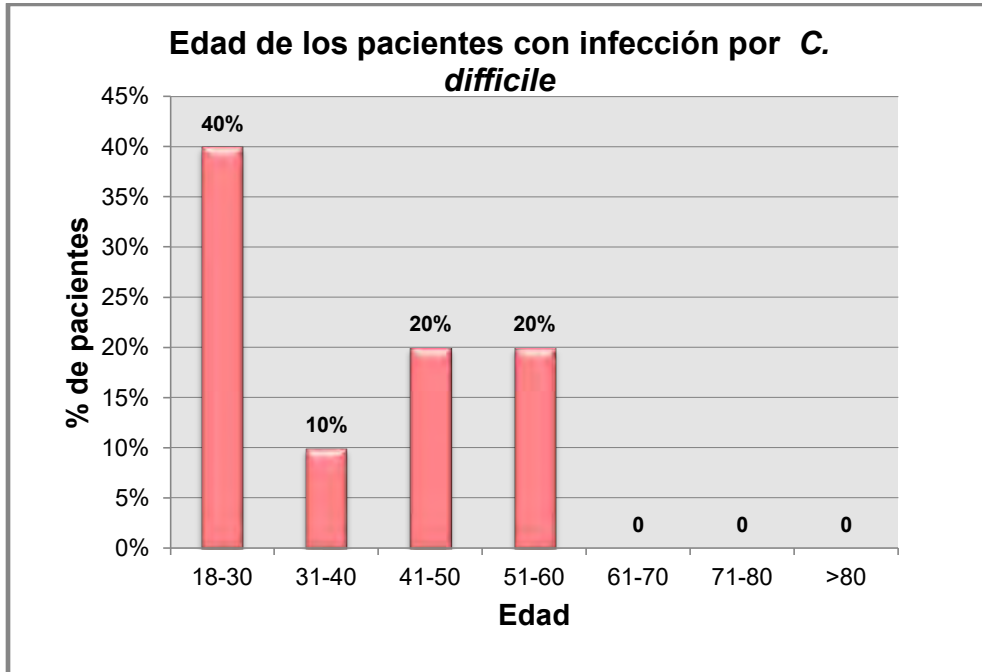


Figura 46. Edades de los pacientes con infección por *C. difficile*

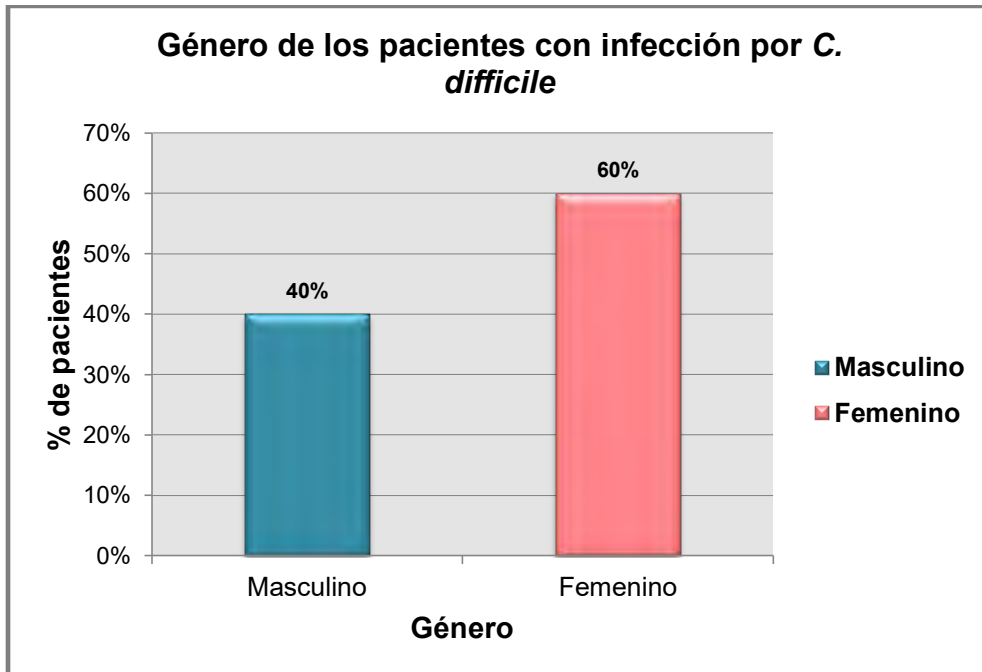


Figura 47. Género de los pacientes con infección por *C. difficile*.

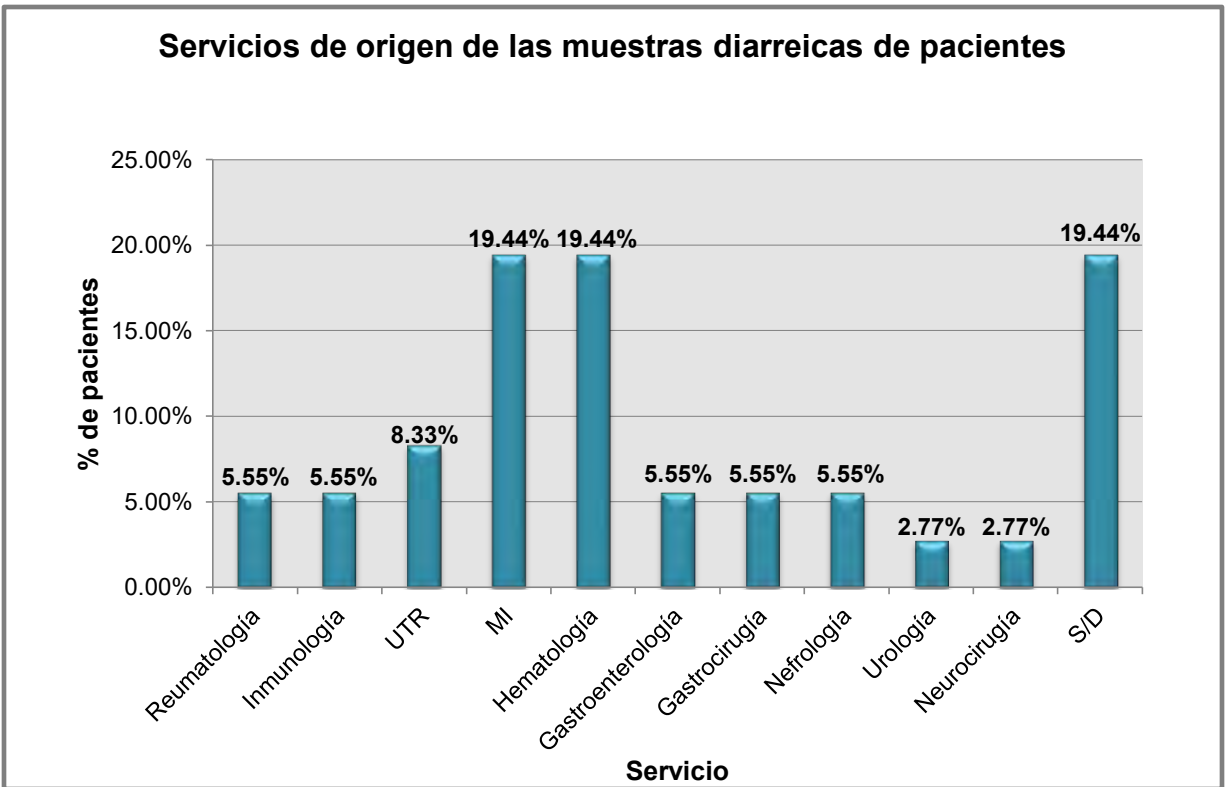


Figura 48. Servicios de origen de los pacientes con CD positivo

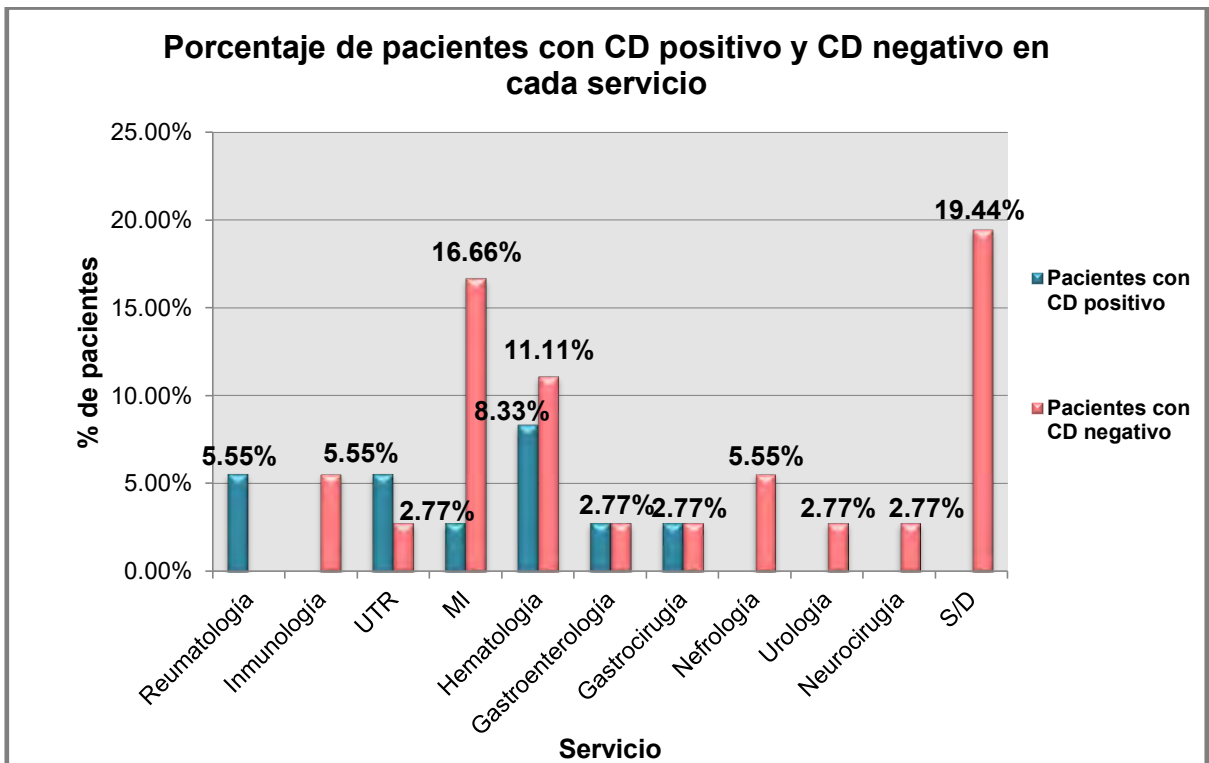


Figura 49. Porcentaje de pacientes con CD positivo y CD negativo en cada servicio

8. DISCUSIÓN

El diagnóstico clínico de *Clostridium difficile* se apoya en el diagnóstico de laboratorio. Los métodos de diagnóstico de laboratorio que se han utilizado tradicionalmente (ensayo de citotoxicidad y cultivo toxigénico) tienen prolongados tiempos de respuesta, lo cual ha limitado su utilidad para la práctica diaria. Como resultado de esto, cuando surgieron los EIAs para el diagnóstico de la ICD, fueron ampliamente adoptados por los laboratorios debido a su rapidez. Sin embargo, se ha demostrado que estos métodos no tenían una sensibilidad adecuada, lo cual ha resultado en una era de técnicas de detección molecular basadas en la amplificación de ácidos nucleicos.

La PCR multiplex es una variante de la PCR, en la cual se puede amplificar más de un gen en una sola reacción. Esta técnica da una mayor sensibilidad y rapidez en la detección del patógeno, además de presentar la ventaja de que su determinación puede realizarse directamente del DNA extraído de la muestra de heces sin tener que realizar un aislamiento previo. Con ello se lograría reducir el riesgo de infección por *C. difficile* al tener el resultado en menor tiempo y con mayor sensibilidad, permitiendo así aislar a los pacientes infectados e iniciar el tratamiento oportuno para evitar el agravamiento del cuadro y la posible diseminación del agente etiológico a otros pacientes.

En el presente estudio se buscó implementar en el hospital de especialidades “Dr. Bernardo Sepúlveda” la técnica de PCR multiplex para el diagnóstico molecular de *Clostridium difficile*, teniendo como base el protocolo desarrollado por Quesada en 2014, esto debido a la gran incidencia de casos reportados en el hospital en los últimos años. De manera más reciente, en el periodo en que se llevó a cabo el estudio se obtuvieron 36 muestras de pacientes con sospecha clínica de ICD, las cuales, a su vez, fueron llevadas a un laboratorio de maquila en donde fueron analizadas por la técnica de quimioluminiscencia para posteriormente comparar los resultados obtenidos por ambas técnicas.

El ensayo de PCR multiplex consistió en la detección simultánea de genes que codifican la toxina A, la toxina B, la toxina binaria y un gen de limpieza para el organismo *C. difficile*, a partir de muestras de heces.

Para evaluar la funcionalidad correcta de los oligonucleótidos y verificar que las condiciones de la PCR fueran adecuadas se realizó una primer PCR de los controles. Como control positivo se utilizó una cepa de *Clostridium difficile* ribotipo 027 NAP1, la cual es una cepa toxigénica. Las cepas toxigénicas de *C. difficile* contienen el gen *tcdA* que codifica para la enterotoxina A y/o el gen *tcdB* que codifica para la citotoxina B, pero, además de estas toxinas, se ha demostrado que varias cepas aisladas de brotes e infecciones graves albergan los genes que codifican para la toxina binaria *CDT*. Razón por la cual, *tcdA*, *tcdB*, *cdtB* (subunidad B de la toxina Binaria) se incorporaron en la presente PCR multiplex ya que se consideran los genes más relevantes para la caracterización de *C. difficile*.

Además, es importante mencionar que esta cepa presenta una variación en el gen represor *tcdC*, lo que se manifiesta en hiperproducción de toxinas A y B asociándose con una presentación grave de la enfermedad (Meyer y cols., 2014; Camacho y cols., 2015). El gen *tcdC* actúa como regulador negativo evitando la expresión de todo el PaLoc de *C. difficile*.

En los últimos años, en diversos estudios se han identificado varias activaciones genéticas potenciales en este gen en cepas de infecciones graves y de brotes epidémicos, por lo tanto, se puede suponer que los defectos en este gen pueden estar relacionados con la expresión elevada de toxinas, lo cual explicaría la patogenicidad relativamente alta de estas cepas. Se ha demostrado que el gen *tcdC* que contiene una delección de 18 pb codifica una proteína *tcdC* que es activa, tanto *in vivo* como *in vitro* (Persson, 2008; Spigaglia, 2002). Con el fin de identificar aquellas cepas no toxigénicas, es decir, que no producen la enfermedad y aquellas cepas con delecciones en *tcdC* de 18 pb se incorporó dicho gen a la PCR.

Como controles negativos, además de utilizar agua grado molecular, se incorporó una cepa de *E. coli* ya que es la bacteria que más abunda en heces, la levadura *Candida albicans* y una alícuota tomada del medio *Cooked meat*, todo con el fin de verificar que no existiera reactividad cruzada.

Los miembros del género *Clostridium* además de formar parte de la microbiota del tracto gastrointestinal, se detectan en el suelo y en el agua (Olivas, 2004). Debido a las dificultades para obtener otras especies del género *Clostridium*, se decidió inocular entonces, una muestra de suelo en el medio *Cooked meat* el cual se utiliza para el cultivo y mantenimiento de clostridios y para la determinación de la actividad de organismos anaerobios proteolíticos. Además, este medio favorece el crecimiento de la mayoría de los organismos anaerobios obligados formadores y no formadores de esporas (BD, 2015).

Como se describe en el diagrama metodológico (Figura 27), el primer paso del análisis consistió en la realización de la PCR multiplex MPI, con el fin de identificar en las muestras la presencia de los genes *tcdC* y *tpi*. El gen de *tpi*, funciona como gen de limpieza. Los genes de limpieza que codifican enzimas metabólicas pueden proporcionar marcadores alternativos al DNA ribosómico rDNA 16S para la caracterización genotípica y filogenética de especies bacterianas. Lemee y cols. en el año 2004, utilizaron el gen *tpi* (triosa fosfato isomerasa) para diferenciar doce especies de *Clostridium* incluyendo *C. difficile*. Los cebadores diseñados a partir de alineaciones de secuencias *tpi* de diversas bacterias Gram positivas permitieron la amplificación de una región diana de 501 pb en las doce cepas de *C. difficile*, por lo que se concluyó que este gen ofrece una herramienta precisa para la identificación de especies de *Clostridium* y proporciona además, un marcador alternativo al rDNA 16S para análisis filogenéticos.

Por lo tanto, el gen *tpi* se utilizó con dos fines; el primero para poder confirmar o descartar la presencia de *C. difficile*. De tal manera que al realizar la MPI, aquellas muestras en las que no hubo amplificación del gen *tpi* se reportaron como negativas para *C. difficile*, mientras que en aquellas muestras en las que hubo amplificación del gen se les realizó la MPIII para la identificación de las toxinas A, B y/o binaria.

Los oligonucleótidos utilizados para el gen *tpi* fueron los diseñados por Lemee y cols. en el año 2004, generados a partir de alineaciones de fragmentos internos del gen *tpi*, generando un fragmento amplificado de 230 pb específicos para *C. difficile*.

En la Figura 31 se muestran los resultados obtenidos de la MPI realizada a los controles de la PCR, como se observa solo hubo amplificación de los controles positivos y, no hubo amplificación en los carriles de los controles negativos (2, 3 y 4).

Los amplicones observados (carriles 1 y 5) comparados con el marcador de peso molecular DNA *Ladder* presentan un peso aproximado de 230 pb, por lo que corresponden al gen *tpi*, confirmándose así la especie de *Clostridium difficile* en las cepas control, además de que se confirma la ausencia de reactividad cruzada con *E. coli*, *Candida albicans* y otros clostridios presentes en el medio *cooked meat*. Sin embargo, se esperaba además en los controles positivos la amplificación de un fragmento de 673 pb correspondientes al gen *tcdC* ya que como se mencionó anteriormente, la cepa de *C. difficile* ribotipo 027/NAP1 presenta una delección en *tcdC* de 18 pb, lo que activa la producción de las toxinas A, B y Binaria.

Dado que en el control de DNA puro se presenta el amplicón de manera débil, y en las subsecuentes reacciones no se presenta el amplicón, una posibilidad es que los oligonucleótidos correspondientes al gen *tcdC* podrían estar degradados, defectuosos, mal diseñados o incluso que la cantidad utilizada no sea la correcta. Si hay mucha cantidad aumenta el rendimiento de la PCR, pero podrían formarse a su vez productos inespecíficos, y si se agrega aún mayor cantidad los oligonucleótidos pueden formar dímeros, en vez de unirse al DNA, y eso impide la amplificación del producto. Si se utiliza muy poco se podría tener mayor especificidad en el producto, pero puede suceder que no se logre ver el amplificado (pues baja el rendimiento), así que será necesario encontrar el óptimo para la reacción (Asuar, 2007).

Por otro lado, no se observa banda alguna en el control negativo de agua (carril 6) por lo que es posible decir que ninguno de los componentes de la reacción está contaminado con DNA de otra procedencia y que no se han producido errores de manejo que hayan producido la contaminación cruzada entre muestras.

Los resultados obtenidos de la MPII se muestran en la Figura 32, en donde de igual manera solo hubo amplificación en los controles positivos (carriles 1 y 5). Se observa en ambos carriles tres bandas, que comparándolas con el marcador de peso molecular corresponden a los genes *tcdA*, *tcdB* y *cdtB*. Lo cual confirma la presencia de *Clostridium difficile* toxigénico y que los oligonucleótidos utilizados y las condiciones de PCR son las adecuadas.

De las 36 muestras clínicas de pacientes con sospecha de ICD, un total de 10 muestras (28%) fueron positivas para *C. difficile*, en las figuras, 33, 35, 37, 39, 40 y 41 correspondientes a los resultados de la MPI se puede observar que el fragmento del gen *tpi* se amplificó con éxito sólo en las muestras positivas, mientras que en las muestras negativas no hubo amplificación; por otra parte, en las figuras 34, 36 y 38 se muestra la amplificación de las toxinas A, B y Binaria en las 10 muestras positivas para el gen *tpi*, confirmando así el diagnóstico de infección por *C. difficile* toxigénico.

Analizando los resultados obtenidos por ambas técnicas, el 19.44% de las muestras analizadas por QL resultaron positivas, mientras que, por la técnica de PCR multiplex el porcentaje de muestras positivas fue del 28% (ver Figura 42). La diferencia entre ambas técnicas radica en que el 22.22 % del total de las muestras obtenidas por los diferentes servicios del hospital fueron rechazadas por el laboratorio de bacteriología, debido a que no se encontraban en el recipiente adecuado, es decir, en el frasco de tapa de rosca. Las muestras rechazadas fueron analizadas por PCR, obteniendo que el 25 % de las mismas presentaban un resultado positivo para *C. difficile* (Figura 43).

Cabe mencionar que, las muestras rechazadas se presentaron en un recipiente blanco, limpio con tapa de presión por lo que debido a esas características no puede ser transportado al laboratorio de maquila. La característica del recipiente (si es hermético o no) no causa mayor problema para la PCR ya que en cuanto la muestra llega al laboratorio si es posible, se analiza de manera inmediata y si no, se almacena directamente a -20°C y aun así no hay riesgo de derramamiento y pérdida de la muestra lo cual preocupa al momento del transporte.

Ahora bien, los resultados de la Figura 44 arrojan que el 70% de los pacientes con ICD se encontraban hospitalizados y de algunos pacientes se sabe que su ingreso fue por causas distintas a la diarrea y en el transcurso de la hospitalización fue que presentaron los síntomas de ICD. Por otro lado, la mayor prevalencia entre el grupo de edad de 18 a 30 años (40%), presentándose con mayor frecuencia en mujeres que en hombres (ver Figuras 45 y 46).

Si bien se sabe, la ICD afecta principalmente a adultos mayores, sin embargo, también son de mayor riesgo aquellos pacientes con estancia hospitalaria prolongada, múltiples comorbilidades e inmunosuprimidos, estos son aquellos con presencia de malignidad, quimioterapia, corticoterapia, trasplante de órganos y cirróticos. Tal y como ocurre en este caso ya que de los pacientes que se tiene información y que no son adultos mayores, se sabe que presentaban lupus, infección de vías urinarias, leucemia y enfermedad renal crónica. Además, tienen en común el haber recibido Vancomicina durante el tratamiento previo a la ICD.

Estudios prospectivos revelan que hasta un 21% de los pacientes con cultivo negativo en el momento del ingreso hospitalario son colonizados por *Clostridium difficile* durante la estancia. La mayoría de los enfermos ingresados e infectados por este microorganismo se mantienen asintomáticos. Sin embargo se ha estimado que hasta 1 % de los pacientes ingresados, tratados con antibióticos, podrán presentar diarrea secundaria por infección con *C. difficile* (Martín y cols. 2007).

En cuanto al servicio que presentó una mayor prevalencia de pacientes con ICD fue hematología con un 8.33 % (Figura 47); ya que la mayoría de los pacientes son oncológicos, y, como bien se dijo, la quimioterapia contra el cáncer es un factor de riesgo importante para la ICD, es decir, por lo menos en parte, mediada por la actividad antimicrobiana de varios agentes quimioterapéuticos a los que son sometidos los pacientes, aunque también pueden estar relacionados con los esfuerzos inmunosupresores de la neutropenia (Stuart, H. y cols., 2010). Posteriormente, los servicios que prosiguen en cuanto a prevalencia son reumatología y la UTR con el 5.55%, mismos que se asocian con lo ya antes mencionado.

De acuerdo a estos resultados, el área de Hematología es la que primeramente tiene que tomar las medidas de control de infección ya que es donde se presentan la mayoría de los casos. Además de la detección precoz de la infección, se debe aislar a todo paciente con ICD y es necesario utilizar bata, guantes desechables y el lavado de manos con agua y jabón tras el contacto con los pacientes (Rodríguez y cols. 2013; Alcalá y cols. 2017).

Es importante educar al personal para que el lavado de manos sea un hábito. Además, personal del hospital debe limpiar y desinfectar superficies, dispositivos médicos así como cómodas, baños, suelos y toda superficie con mayor probabilidad de estar contaminada con heces y esporas, así como hacer uso racional de antibióticos , evitando su prescripción innecesaria (Álvarez y cols., 2017)

Para observar la relación que hay entre ambas técnicas se realizó el cálculo del índice Kappa, obteniendo un coeficiente de 0.915 (consultar anexo) lo cual indica que hay una concordancia casi perfecta entre las pruebas, entonces, es posible decir que la PCR arroja resultados casi iguales a los obtenidos en la Quimioluminiscencia. Se evaluó además, la sensibilidad y especificidad de ambas técnicas, obteniendo una sensibilidad del 100% y 87.5% para PCR y QL, respectivamente; mientras que la especificidad fue del 100% y 96.2% para PCR y QL, respectivamente, con lo anterior podemos confirmar lo reportado por diversas bibliografías, la PCR es la técnica que presenta mayor sensibilidad y especificidad frente a otras pruebas diagnósticas de *C. difficile*.

Es importante recalcar que, a pesar de que la PCR es una prueba muy sensible, una de las dificultades que presenta, es que para la obtención de resultados correctos, el procedimiento y la manipulación de los reactivos y de los materiales debe ser cuidadoso y preciso, ya que se trabaja con reactivos sensibles a los cambios de temperatura y con volúmenes reducidos. Por ejemplo, la desnaturalización de la enzima Taq polimerasa es un punto crítico durante el desarrollo de la prueba, es extremadamente sensible a la temperatura y necesita ser mantenida dentro de compartimentos que la protejan de la descongelación.

Según Espinosa (2007), cualquier error en el procedimiento, deterioro o falta de alguno de los constituyentes (ácidos nucleicos, enzima o buffers) imposibilitarán la reacción, invalidando los resultados. Por lo tanto, es importante revisar que las condiciones en las cuales se desarrolla la PCR sean las adecuadas. Una condición que interfiere en que se presente o no el amplicón es la calidad de DNA. El DNA puede estar contaminado con proteínas o alguna sustancia que inhibe la reacción de PCR (Asuar, 2007). El DNA fragmentado dificulta la amplificación de productos de PCR de alto peso molecular y afecta la reproducibilidad de las técnicas (Alejos y cols., 2014). En este caso el kit de extracción utilizado garantiza la calidad del DNA.

Es por esto que se recomienda el uso de los controles positivos y negativos de la reacción, los cuales no impedirán errores o mal desarrollo de la técnica, pero sí harán evidente que hubo una falla. Si falla uno o ambos controles, se invalidarán automáticamente los resultados obtenidos (Toledo, 2016). Sin embargo, las ventajas que se ofrecen al implementar la técnica de PCR en el Hospital de Especialidades, son varias.

La primera ventaja a resaltar se deriva del hecho de que como ya se mencionó, para realizar la PCR el 100% las muestras son aceptadas sin importar si el recipiente es hermético o no, mientras que para la QL forzosamente el recipiente debe ser hermético. Rechazar las muestras provoca que se ponga en riesgo al paciente al incrementar el tiempo para llegar al diagnóstico y tratamiento, lo cual lleva a la segunda ventaja.

La segunda ventaja es que permite el diagnóstico temprano de *Clostridium difficile* al ahorrar el tiempo de transporte al laboratorio de maquila y al evitar la pérdida de tiempo que conlleva la recolección y registro de solicitud del estudio de una nueva muestra de los pacientes a los que se les rechazó la muestra por encontrarse en el recipiente inadecuado. Además hay que valorar el tiempo y complejidad de la técnica de PCR, ya que el tiempo de procesamiento de la muestra, desde el recibimiento, hasta la emisión del resultado va de 4-5 horas, mientras que un resultado emitido por el laboratorio de maquila va desde los 5-7 días.

La tercera ventaja es que desde la detección del gen correspondiente a la *tpi*, que como ya se mencionó es específico de *Clostridium difficile*, se puede indicar al médico la presencia de éste, de tal forma que pueda iniciar un tratamiento. Por otro lado, la identificación de las toxinas por medio de esta PCR permitiría entonces, clasificar en seis grupos a las cepas de *C. difficile* según la dotación de toxinas descritas: (Stubbs y cols., 2000)

- Cepas A⁺ B⁺
- Cepas A⁺ B⁺ Toxina Binaria⁺
- Cepas A⁻ B⁺
- Cepas B⁺ Toxina Binaria⁺
- Cepas Toxina Binaria⁺
- Cepas A⁻ B⁻ Toxina Binaria⁻

Con lo mencionado anteriormente, es posible decir que la implementación de la técnica de PCR multiplex para el diagnóstico de *C. difficile* permitiría conocer las cepas predominantes en el hospital y, a su vez, conocer la epidemiología actual de la institución, de esta manera sería posible contribuir a estudios epidemiológicos de la infección por *Clostridium difficile* en México, que cabe mencionar son muy pocos los que hay reportados. De igual forma se sugiere llevar a cabo un control y recopilación de la información de todos los pacientes relacionados con ICD para tener una idea más clara y real de los factores predisponentes en el hospital, así como los servicios que presentan mayor incidencia y que requieren por lo tanto mayor atención para tomar medidas de prevención contra la ICD hospitalaria.

Por otro lado, la técnica de quimioluminiscencia no permite la clasificación de las cepas tal como ocurre con la PCR multiplex ya que en dicho ensayo sólo se identifica la presencia de las toxinas A y/o B de *Clostridium difficile*, por lo que nos es posible saber con precisión al menos si se trata de la toxina A, toxina B o ambas. Otra imprecisión es que en ocasiones la quimioluminiscencia puede arrojar resultados dudosos en los cuales si el resultado de la repetición del ensayo es nuevamente negativo, será necesario recoger y procesar muestras nuevas (DiaSorin, 2012) lo cual implica mayor tiempo para llegar a un diagnóstico correcto.

En situaciones como ésta, la PCR podría utilizarse como prueba confirmatoria tal como ocurrió con el caso que se presenta a continuación:

Paciente Femenino con diagnóstico de Leucemia mieloide acude al laboratorio por motivos ajenos a este y comenta que ha tenido diarreas frecuentes de hasta un mes de duración. Su médico le dice que es a causa del tratamiento. Ella indica que sus heces son semilíquidas, mucoides y verdosas. Al tratarse de un paciente oncológico, lo cual es factor de riesgo importante para la ICD, y por las características de las heces se le recomendó hacer la prueba de PCR multiplex. Posteriormente la paciente proporcionó una muestra de heces, cabe mencionar que en ese momento no cursaba por un cuadro diarreico. La muestra de heces se presentó entonces de color marrón, sólida y pastosa.

Se procesó la muestra y el resultado de la PCR multiplex se observa en la Figura 35, carril 17. Se observa la banda correspondiente al gen de la *tpi*, lo cual indica un resultado positivo de la presencia de CD por lo que se procedió a realizar la PCR MPII para la

caracterización toxigénica de CD, obteniendo como resultado la amplificación de los genes correspondientes a la toxina A, B y binaria.

Posteriormente se informó el resultado al médico de la paciente y éste solicitó el ensayo de quimioluminiscencia el cual arrojó un resultado dudoso. Al tratarse la PCR multiplex de una técnica molecular, el resultado proporcionado por ésta fue tomado como el correcto y el médico indicó tratamiento con metronidazol 500 mg/8h/21 días. Al terminar el tratamiento se analizó por PCR múltiplex una nueva muestra obteniendo ahora un resultado negativo para CD (Figura 41, carril 37), ya que no hubo amplificación del gen *tpi*, lo cual indica que el tratamiento fue exitoso. De esta manera se pudo proporcionar a la paciente el diagnóstico oportuno y certero de la ICD lo cual permitió que el cuadro no se agravara.

De los pacientes con resultado positivo, el 20% falleció. Es probable que la ICD complicara su cuadro inicial. Se resalta nuevamente la importancia del diagnóstico oportuno de CD.

9. CONCLUSIONES

- Se seleccionó un método de extracción de ADN adecuado para la determinación de *C. difficile*
- Se identificó mediante PCR multiplex la presencia de las toxinas A, B y binaria en las muestras de heces diarreicas confirmando así el diagnóstico de ICD.
- Se estudió la prevalencia y la importancia del diagnóstico oportuno de este microorganismo en pacientes comprometidos.
- Se evaluó la importancia de la evolución en la ICD y se determinaron los factores de riesgo que permiten predecir la misma clínicamente.
- Se estudió la patogénesis y las estrategias terapéuticas sobre el manejo de la infección por este patógeno.
- Se logró implementar la técnica de PCR multiplex para la identificación de los genes *tcdA*, *tcdB*, *cdtB*, *tpi* y *tcdC* en muestras de heces diarreicas de pacientes con sospecha clínica de infección por *Clostridium difficile*.

10. PERSPECTIVAS

Los resultados de este trabajo destacan la necesidad de profundizar los estudios, para adelantarse a los cambios evolutivos de este importante patógeno nosocomial, tanto en el aspecto diagnóstico como terapéutico. Se sugiere realizar análisis comparativos de las diferentes técnicas de diagnóstico así como la relación costo-beneficio lo cual permitirá aportar nuevas opciones que se adapten a las particularidades del sistema de salud de nuestro país.

Por lo tanto algunas preguntas por responder serían:

- ¿Qué tan bien se correlaciona este método con los cultivos para *C. difficile* toxigénico y estudios de citotoxicidad de cultivos celulares?
- ¿Cuál de estos estudios de “estándar de oro” (cultivo para *C. difficile* toxigénico o estudio de citotoxicidad de cultivo celular) es óptimo como una prueba de referencia para el diagnóstico de ICD?
- ¿Cuál es el mejor método de diagnóstico para los laboratorios de los hospitales que no tienen disponible la tecnología PCR?
- ¿Qué estudios comerciales PCR para toxinas dan mejores resultados, en comparación con la realizada?
- ¿De qué forma los estudios individuales de PCR derivados del laboratorio para *C. difficile* se comparan con los estudios PCR comerciales?
- ¿Hay algún motivo para repetir las pruebas de heces para *C. difficile* durante el mismo episodio de enfermedad?
- ¿Después del diagnóstico inicial de CDI, se deberían repetir las pruebas por algún motivo que no sea la recurrencia de síntomas después de un tratamiento exitoso?

11. REFERENCIAS

1. Aktories, K., Wegner, A. (1992). "Mechanisms of the cytopathic action of actin-ADP-ribosylating toxins." *Molecular microbiology*. 6(20), 2905-2908. doi: 10.1111/j.1365-2958.1992.tb01749.x
2. Alba, P. (2011). "*Clostridium difficile*: Prevalencia e importancia ecológica en animales domésticos y fauna salvaje." (Tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid, Facultad de veterinaria, Madrid.
3. Alcalá, L., Mena, A., Niubó, J., Marín, M. (2015). "Diagnóstico microbiológico de la infección por *Clostridium difficile*". *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 34(9), 595-602.
4. Alcalá, L., Reigadas, E., Bouza, E. (2017). "Infección por *Clostridium difficile*." *Medicina clínica*. 148(10), 456-463.
5. Alcantara, C., Stenson, F., Steiner, T., Guerrant, R. (2001). "Role of inducible cyclooxygenase and prostaglandins in *Clostridium difficile* toxin A-induced secretion and inflammation in an animal model." *The Journal of Infectious Diseases*. 184(5), 648-652.
6. Alejos, L. P., Aragón, M. D., & Cornejo, A. (2014). "Extracción y purificación de ADN. Unidad de Biotecnología y Prototipos. *Universidad Nacional Autónoma de México*. [Recuperado el 13 de Mayo del 2018] de: <https://goo.gl/3Uogkn>
7. Álvarez, D. A., González, A. M., González, D., Franyuti, G. A., Díaz, A. y Vázquez R. (2017). "Perspectivas históricas y vigentes sobre la infección por *Clostridium difficile*." *Revista de Gastroenterología de México*. doi:10.1016/j.rgmx.2017.03.004
8. Arámburu, C. (2017). "Colitis Pseudomembranosa: Abordaje y tratamiento." [En línea]. Recuperado de <https://sapiensmedicus.org/colitis-pseudomembranosa/>
9. Armendáriz, J., Salazar, A., Sandoval, A. (2013). "Biología molecular: Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud." *Mc Graw Hill*: México.
10. Asuar, L. E. (2007). "Guía práctica sobre la técnica de PCR." *Ecología molecular. Instituto Nacional de Ecología*, 574pp.
11. 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. <http://doi.org/10.4161/19490976.2014.969632>
12. Barrientos, M., Esquivel, M., Álvarez, S., Tencio, J., Soto, J. (2017). "Antibioticoterapia y nuevas terapias no farmacológicas en infecciones por *Clostridium difficile*". *Medicina legal de Costa Rica*. 34(1).

13. BD (2015) BBL Cooked Meat Médium. Obtenido de <http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=22253>
14. Beaugerie, L. (2004). "Antibiotic-associated diarrhoea". *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 18(2), 337-352.
15. Becerra, M. G., Ospina, S., León, S., Berbesi, D. Y., (2011). "Factores de riesgo para la infección por *Clostridium difficile*." *Asociación colombiana de infectología*. 15 (4), 220-226.
16. Bernabeu A. y Martín F. (1992). "*Clostridium difficile*, características biológicas para el aislamiento, caracterización y detección de toxinas." Murcia: Secretario de publicaciones, Universidad de Murcia.
17. Biostang, N. (2018). "Overview of a polymerase Chain Reaction Cycle." [En línea]. Recuperado el 18 de Abril del 2018 de: <http://ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-3-genetics/35-genetic-modification-and/gel-electrophoresis.html#previous-photo>
18. Bujanda, L. & Cosme, A. (2009). "Diarrea asociada a *Clostridium difficile*." *Gastroenterología y Hepatología*. 32 (1). 48-56
19. Burgos, R. J. (2015). "Prevalencia de diarrea aguda asociada a infección por *Clostridium difficile* en pacientes hospitalizados en el Hospital De Especialidades Dr. Bernardo Sepúlveda." (Tesis de especialidad). *Universidad Nacional Autónoma de México*, México.
20. Burke, E., & Lamont, T. (2014). "*Clostridium difficile* infection: A Worldwide disease." *Division of Gastroenterology*. 8(1), 1-6.
21. Burnham, C.-A. D., & Carroll, K. C. (2013). "Diagnosis of *Clostridium difficile* Infection: an Ongoing Conundrum for Clinicians and for Clinical Laboratories." *Clinical Microbiology Reviews*, 26(3), 604–630. doi: 10.1128/CMR.00016-13
22. Calderón, G., Torres, J., Lin, T., Chavez, B., Hernández, M., Muñoz, O., Befus, A., Enciso, J. (1998). "Effects of toxin A from *Clostridium difficile* on mast cell activation and survival." *Infection and immunity*. 66(6), 2755-2761.
23. Camacho-Ortiz, A., López-Barrera, D., Hernández-García, R., Galván-De los Santos, A. M., Flores-Treviño, S. M., Llaca-Díaz, J. M., Garza-González, E. (2015). "First Report of *Clostridium difficile* NAP1/027 in a Mexican Hospital." *PLoS ONE*, 10(4), e0122627. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0122627>
24. Cameán, A. M. y Repetto M. (2012). "Toxicología alimentaria." (pp.39-59). Madrid: *Díaz de Santos*.
25. Carman, J., Wickham, K., Chen, L., Lawrence, A., Boone, J., Wilkins, T., Lyerly, D. (2012). "Glutamate dehydrogenase is highly conserved among *Clostridium difficile* ribotypes." *Journal of Clinical Microbiology*, 50 (4), 1425-1426. doi: 10.1128/JCM.05600-11

26. Castro, A. M. (2014). "Bacteriología básica basada en problemas." México: *El Manual Moderno*
27. Chang J. Y., Antonopoulos D. A., Kalra A., Tonelli A., Khalife W. T., Schmidt T. M. y Young V. B. (2008). "Decreased diversity of the fecal microbiome in recurrent *Clostridium difficile* – Associated Diarrhea." *Journal of Infectious Diseases*. 197. 435-438
28. Considine, R., Simpson, L. (1991). "Cellular and molecular actions of binary toxins possessing ADP-ribosyltransferase activity." *Toxicon* 29(8), 913-936.
29. Curry, S.R. (2010). "*Clostridium difficile*." *Clinics in Laboratory Medicine*, 30(1), 329-342.
30. Debast, S.B., Bauer, M.P., Kuijper, E. J. (2014) "European Society of Clinical Microbiology and Infectaos Diseases: Update of the treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection." *Clinical Microbiology and Infection.*, 20 (3) 1-26
31. Del Campo, R., Alarcón T., D'Auria, G., Delgado, S., Ferrer, M. (2017). "Microbiota en la Salud Humana: técnicas de caracterización y transferencia." *Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica*. doi:10.1016/j.eimc.2017.02.007
32. DiaSorin. (2012). "*LIAISON*[®] *C. difficile* Toxins A and B." Recuperado de: <https://www.diasorin.com/en/liaisonr-c-difficile-toxins-and-b>
33. Drudy, D., Fanning, S., Kyne, L. (2006). "Toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile*." *Elsevier*: España. 125(2), 413-420. doi:10.1016/j.ijid.2006.04.003
34. Feltis, B., Wiesner, S., Kim, A., Erlandsen, S., Lysterly, D., Wilkins, T., Wells, C. (2000). "*Clostridium difficile* toxins A and B can alter epithelial permeability and promote bacterial paracellular migration through HT-29 enterocytes." *Shok*. 14(6), 629-634.
35. Forbes, B., Sahm, D. F., & Weissfeld, A. S. (2009). "Bailey & Scott; diagnóstico microbiológico." 12a ed. Buenos Aires: *Médica Panamericana*
36. Fortoul, T. I. (2013). "*Histología y Biología Celular*." 2a ed. México: *Mc Graw-Hill*.
37. García, A., Rodríguez, E., Aguilera, L., Ferre, C., López, A. (2015). "Transplante de microbiota Fecal." *Gastroenterología y Hepatología*. 38 (3). 123-134.
38. García, S y Gollomón, F. (1998). "Colitis pseudomembranosa" *Gastroenterologia y hepatologia*. 21 (1). 302-313.
39. Gerding, D., Johnson, S. (2010). "Management of *Clostridium difficile* Infection: Thinking Inside and Outside the Box." *Clinical Infectious Diseases*. 51 (11), 1306-1313. DOI: 10.1086/657116
40. Giesemann, T., Egerer, M., Jank, T., Aktories, K. (2008). "Processing of *Clostridium difficile* toxins." *Journal of Medical Microbiology*. 27(1), 690-696. doi: 10.1099/jmm.0.47742-0

41. Gonçalves, C., Decré, D., Barbut, F., Burghoffer, B., Petit, J. (2004). "Prevalence and Characterization of binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) from *Clostridium difficile*." *Journal of clinical Microbiology*. 1933-1939.
42. Gonçalves, T., Moura, H., Barr, J. R., Pilotto, R., De Oliveira, E. (2017). "Ribotypes associated with *Clostridium difficile* outbreaks in Brazil display distinct surface protein profiles." *Anaerobe* 45. 120-128. doi: 10.1016/j.anaerobe.2017.04.001
43. González, F. (2006) "Ensayos médicos sobre genética: La genética molecular en la medicina eucariota." *Noción*: Ecuador.
44. He, D., Sougioultzis, S., Hagen, S., Liu, J., Keates, S., Keates, A. C., Pothoulakis, C., and LaMont, J. (2002). "Clostridium difficile toxin A triggers human colonocyte IL-8 release via mitochondrial oxygen radical generation." *Gastroenterology*. Doi: <https://doi.org/10.1053/gast.2002.32386>
45. Janoir, C. (2016). "Virulence factors of *Clostridium difficile* and their role during infection." *Anaerobe*. 37. doi:10.1016/j.anaerobe.2015.10.009
46. Keel, M., Songer, J. (2006). "The comparative pathology of *Clostridium difficile* associated disease." *Veterinary Pathology*. 43(3), 225-240.
47. Kim, J., Kim, S., Jung, H., Oh, Y., Song, I., Kim C. (2002). "Differential Expression and polarized secretion of CXC and CC chemokines by human intestinal epithelial cancer cell lines in response to *Clostridium difficile* toxin A." *Microbiology and Immunology*. 46(5), 333-342.
48. Koneman, E. W., Allen, S., Janda, Procop, Schreckenberger, Woods, (2008). "Koneman diagnóstico microbiológico: texto y atlas en color." 6 ed. Buenos Aires: *Médica Panamericana*.
49. Lemee, L., Dhalluin, A., Testelin, S., Mattrat, M.-A., Maillard, K., Lemeland, J.-F., & Pons, J.-L. (2004). "Multiplex PCR Targeting *tpi* (Triose Phosphate Isomerase), *tcdA* (Toxin A), and *tcdB* (Toxin B) Genes for Toxigenic Culture of *Clostridium difficile*." *Journal of Clinical Microbiology*, 42(12), 5710-5714. <http://doi.org/10.1128/JCM.42.12.5710-5714.2004>.
50. Lisa, M., Kodadek, M.D., Pamela A., Lipsett, M.D. (2018). "Prevention and treatment of Clostridium difficile Enterocolitis." Elsevier. 52 (1), 29-42. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yasu.2018.04.001>.
51. Lowy, I., Morline, D., Leav, B., Blair, B., et al. (2010). "Treatment with Monoclonal Antibodies against Clostridium difficile Toxins" *The new england journal of medicine*. 362: 197-205. DOI: 10.1056/NEJMoa0907635

52. Mantyh, C., Pappas, T., Lapp, J., Washington, M., Neville, L., Ghilardi, J., Rogers, S., Mantyh, P., Vigna, S. (1996). "Substance P activation of enteric neurons in response to intraluminal *Clostridium difficile* toxin A in the rat ileum." *Gastroenterology*. 111(5), 1272-1280. doi: <http://dx.doi.org/10.1053/gast.1996.v111.pm8898641>
53. Martín, E., Chávez, F., Mercado, P. (2007). "Asociación de *Clostridium difficile*, su toxina A y el daño histopatológico en pacientes con diarrea nosocomial". *Rev. Perú, biol.* 14(2), 287-290.
54. Martínez, A., Azevedo, G. (2012). "Traducción, adaptación cultural y validación de la Escala de Bristol." *Rev. Latino-Am. Enfermagem*: 20(3).
55. Meyer, L., Espinoza, R., Quera, R. (2014). "Infection for *Clostridium difficile*: Epidemiology, diagnostic and therapeutic strategies". *Revista de medicina clínica Condes*. 25(3), 473-484
56. Monge, D., Morosini, M., Millán, I., Pérez, C., Manso, M., Guzmán, M. F., Asensio, A. (2011). "Factores de riesgo de infección por *Clostridium difficile* en pacientes hospitalizados." *Medicina Clínica*. 137(13), 575-580, doi: 10.1016/j.medcli.2010.12.026.
57. Mota, M., Cuenca, J., Sipán, M. (2016). "Biología molecular y citogenética". *Paraninfo*: España.
58. Nusrat, A., Von Eichel-Streiber C., Turner, J., "Clostridium difficile Toxins Disrupt Epithelial Barrier Function by Altering Membrane Microdomain Localization of Tight Junction Proteins. " *Infection and Immunity*. 69 (3), 1329-1336. Doi: 10.1128/IAI.69.3.1329-1336.2001
59. Olivas, E. (2004). Manual de prácticas de Microbiología I y II y Parasitología. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez: Ciudad Juárez, Chi.
60. Pérez, M., Hurtado, A I., Couto, I., Gutiérrez, J. M., Seoane, L., Suárez, J. M. y Galeiras, R. (2013). "Abordaje multidisciplinario de la infección por *Clostridium difficile*." *Rev Chilena Infectol*. 30(2), 165-185.
61. Persson, S., Torpdahl, M., and Olsen, K. (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." *Sciencedirect*. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02092.x>
62. Pierce, B. A. (2014). "Genética. Un enfoque conceptual." Madrid: *Médica Panamericana*.
63. Polanco, I. (2015). "Microbiota y enfermedades gastrointestinales." *Anales de pediatría*. 83 (6), 443e1-44e5. Doi: 0.1016/j.anpedi.2015.07.034
64. Pothoulakis, C., Gilbert, R., Cladaras, C. (1996). "Rabbit sucrase-isomaltase contains a functional intestinal receptor for *Clostridium difficile* toxin A." *Journal of clinical investigation*. 98(3), 641-649. doi: 10.1172/JC1118835

65. Pothoulakis, C., LaMont, J. (2001). "Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial-mucosal interactions II. The integrated response of the intestine to *Clostridium difficile* toxins." *American Journal of physiology-Gastrointestinal and liver physiology*. 280, 178-183
66. Qa'Dan, L., Spyres, M., and Ballard, D. (2000). "pH induced Conformational Changes in Clostridium difficile Toxin B". *Infection and Immunity*. 68 (5), 2470-2474.
67. Remes, J. M. (2012). "Diarrea asociada con infección por *Clostridium difficile*, ¿Es tiempo de preocuparnos en México?" *Revista de Gastroenterología de México*. 77 (2). 58-59.
68. Rizzo, D. C. (2010). "Fundamentos de Anatomía y Fisiología." 3a ed. México: *Cengage Learning*
69. Rodríguez, A., Muñoz, O. M., Pulido, J., Amado, S. B., Tobón, M., (2017). "Antibiotic-associated diarrhea: Clinical characteristics and the presence of *Clostridium difficile*." *Revista de Gastroenterología de México*. 82 (2). 129-133
70. Rodríguez, D., Mirelis, B., Navarro, F. (2013). "Infecciones producidas por *Clostridium difficile*." *Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica*. 31(4), 254-263.
71. Rupnik, M. (2008). "Heterogeneity of large clostridial toxins: importance of *Clostridium difficile* toxinotypes." *Microbiology reviews*. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00110.x
72. Rupnik, M., Avesani, V., Janc, M., Streiber, C., Delmée, M. (1998). "A novel Toxinotyping scheme and Correlation of toxinotypes with serogroups of *Clostridium difficile* Isolates." *Journal of Clinical Microbiology*. 36(8), 2240-2247. Recuperado de: <http://jcm.asm.org/content/36/8/2240.long>
73. Saladin, K. S. (2012). "Anatomía y Fisiología. La unidad entre forma y función." 6a ed. México: *Mc Graw-Hill*.
74. Sánchez, L. A., De Santos, P. A., Rodríguez, C., Vázquez, B. (2013). "Infecciones producidas por *Clostridium difficile*. Observaciones." *Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica*. 31 (8) 557
75. Sepúlveda, S. J. (2012). "*Texto atlas de histología: biología celular y tisular*." México: *McGraw-Hill Interamericana*. Recuperado de: <http://www.ebrary.com>
76. Spigaglia, P., & Mastrantonio, P. (2002). "Molecular Analysis of the Pathogenicity Locus and Polymorphism in the Putative Negative Regulator of Toxin Production (TcdC) among *Clostridium difficile* Clinical Isolates." *Journal of Clinical Microbiology*, 40(9), 3470–3475. doi: 10.1128/JCM.40.9.3470-3475.2002

77. Stuart, H., Cohen, MD., Dale, N., Gerding, M., et al. (2010). "Guía de práctica clínica para la infección por *Clostridium difficile* en adultos: actualización 2010 realizada por la Sociedad de Salud Epidemiológica de Norteamérica (SHEA) y la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de Norteamérica (IDSA)." *The society for Healthcare Epidemiology of America*. doi: 10.1086/657453
78. Stubbs, S., Rupnik, M., Gibert, M., Brazier, J., Duerden, B., Popoff, M. (2000). "Production of actin-specific ADP- ribosyltransferase (binary toxin) by strains of *Clostridium difficile*." *Fems Microbiol Lett* 186: 307-312
79. Tan, K., Song, K. (2001). "Evidence for holin function of tcdE gene in the pathogenicity of *Clostridium difficile*." *The pathological Society of Great Britain and Ireland. Journal Med. Microbiol.* 50(1), 613-619.
80. Tian, J.H., Glenn, G., Flyer, D., Zhou, B., Liu, Y., Sullivan, E., Wu, H., Cummings, F.J., Ellingsworth, L., Smit, G. (2017). "*Clostridium difficile* chimeric toxin receptor binding domain vaccine induced protection against different strains in active and passive challenge models." *Elsevier*. 35 (33). 4079-4087. Recuperado de: <https://goo.gl/AM7suK>
81. Toledo, C. A. (2016). "Implementación de la técnica de la reacción de la Polimerasa en cadena como método diagnóstico de *Mycoplasma gallisepticum* Y *Mycoplasma synoviae* y su aplicación en muestras de gallinas comerciales en Chile." (Tesis de Licenciatura, Universidad de Chile). Recuperado de: <https://goo.gl/QCJLJv>
82. Tortora, G. J. y Derrickson, B. (2015). "Principios de Anatomía y Fisiología." 19a ed. México: *Editorial Médica Panamericana*.
83. Tortora, G. J., Funke, B. R. & Case, C. L. (2007). "Introducción a la microbiología." 9 ed. Buenos Aires: *Médica Panamericana*.
84. Tucker, D., Wilkins, D. (1991). "Toxin A of *Clostridium difficile* Binds to the Human Carbohydrate Antigens I, X, and Y." *Infection and immunity*. 59(1), 73-78. Recuperado de: <https://goo.gl/j24Mfz>
85. Vedantam, G., Clark, A., Chu, M., McQuade, R., Mallozzi, M., & Viswanathan, V. K. (2012). "*Clostridium difficile* infection: Toxins and non-toxin virulence factors, and their contributions to disease establishment and host response." *Gut Microbes*, 3(2), 121-134. <http://doi.org/10.4161/gmic.19399>
86. Vega, A. (2008). "*Clostridium difficile*: Un patógeno nosocomial de importancia epidemiológica." (Tesis de grado). *Universidad Nacional Autónoma de México*.
87. Verger, E. (2017). "Escala de Bristol". Madrid: *CienciaToday*. <https://cienciatoday.com/escala-bristol/>

88. Voth, D., Ballard, J. (2005). "Clostridium difficile Toxins: Mechanism of action and role in disease." *Clinical Microbiology Reviews*. 18(2), 247-263. doi: 10.1128/CMR.18.2.247-263.2005
89. Walter, J., Lina, C. (2012). "Enfermedad asociada a Clostridium difficile: prevalencia y diagnóstico por laboratorio". *Asociación Colombiana de Infectología*. 16(4), 211-222.
90. Wilcox, M., Gerding, D., Poxton, I. et al. (2017). "Bezlotoxumab for prevention of recurrent Clostridium difficile infection". *The new england journal of medicine*. DOI: 10.1056/NEJMoa1602615.
91. Zamudio, A., Bermúdez, H., Lezama, H. R., Guevara, M. P., Islas, E. Sosa, F. A. (2017). "Rompiendo paradigmas. Transplante de microbiota intestinal: reporte preliminar. Cirugía y Cirujanos." doi: 10.1016/j.circir.2016.11.017.

12. ANEXOS

11.1 Anexo A. Especificaciones de los oligonucleótidos

Nombre/Secuencia	Propiedades	Cantidad de oligo	Preparación de oligo
cdtB-F1 5'-TGGACAGGAAGAATAATTCCTTC-3'	Tm (50mM NaCl): 52.4 °C Contenido de GC: 39.1% Peso molecular: 7071.7	109.6 nmoles = 0.78mg	Para: 100µM añadir 1.096 mL a vial. Dilución 1:10 para obtener alícuotas 10µM
cdtB-F2 5'-TGCAACTAACGGATCTCTTGC-3'	Tm (50mM NaCl): 55.2 °C Contenido de GC: 47.6% Peso molecular: 6381.2	105.7 nmoles = 0.67mg	Para: 100µM añadir 1.057 mL a vial. Dilución 1:10 para obtener alícuotas 10µM
tcdA-F 5'-AGATTCTATATTTACATGACAATAT-3'	Tm (50mM NaCl): 48.1 °C Contenido de GC: 23.1% Peso molecular: 7927.2	94.4 nmoles = 0.75 mg	Para: 100µM añadir 944 µL a vial. Dilución 1:10 para obtener alícuotas 10µM
tcdA-RA3B 5'-ACCATCAATCTCGAAAAGTCCAC-3'	Tm (50mM NaCl): 55.2 °C Contenido de GC: 43.5% Peso molecular: 6945.6	92.1 nmoles = 0.64mg	Para: 100µM añadir 921 µL a vial. Dilución 1:10 para obtener alícuotas 10µM
tcdB-F3 5'-AATGCATTTTTGATAAACACATTG-3'	Tm (50mM NaCl): 49.5 °C Contenido de GC: 25% Peso molecular: 7349.9	85.2 nmoles = 0.63mg	Para: 100µM añadir 852 µL a vial. Dilución 1:10 para obtener alícuotas 10µM
tcdB-F4 5'-AAGTTTCTAACATCATTCCAC-3'	Tm (50mM NaCl): 48.9 °C Contenido de GC: 31.8 % Peso molecular: 6628.4	98.7 nmoles = 0.65mg	Para: 100µM añadir 987 µL a vial. Dilución 1:10 para obtener alícuotas 10µM
tpi-F 5'-AAAGAAGCTACTAAGGGTACAAA-3'	Tm (50mM NaCl): 51.6 °C Contenido de GC: 34.8% Peso molecular: 7122.7	84.8 nmoles = 0.60mg	Para: 100µM añadir 848 µL a vial. Dilución 1:10 para obtener alícuotas 10µM
tpi-R 5'-CATAATATTGGGTCTATTCTAC-3'	Tm (50mM NaCl): 48.1 °C Contenido de GC: 34.8% Peso molecular: 6988.6	106.1 nmoles = 0.74mg	Para: 100µM añadir 1.061 mL a vial. Dilución 1:10 para obtener alícuotas 10µM
Pal-F15 5'-TCTCTACAGCTATCCCTGGT-3'	Tm (50mM NaCl): 54.2 °C Contenido de GC: 50% Peso molecular: 6018.9	85.3 nmoles = 0.51mg	Para: 100µM añadir 853 µL a vial. Dilución 1:10 para obtener alícuotas 10µM
Pal-F16 5'-AAAAATGAGGGTAACGATTT-3'	Tm (50mM NaCl): 47.5 °C Contenido de GC: 30% Peso molecular: 6213.1	81.6 nmoles = 0.51mg	Para: 100µM añadir 816 µL a vial. Dilución 1:10 para obtener alícuotas 10µM

11.2 Anexo B. Master Mix (2x) para la PCR

Descripción

PCR Master Mix es una solución concentrada 2X de Taq DNA polimerasa, dNTP y todos los demás componentes requerido para la PCR, excepto la plantilla de ADN y los cebadores. Esta formulación premezclada ahorra tiempo y reduce contaminación debido a un número reducido de pasos de pipeteo requerido para la configuración de PCR.

Aplicaciones

- PCR de alto rendimiento.
- PCR de rutina con alta reproducibilidad.
- Generación de productos de PCR para TA. Clonación.
- RT-PCR

Composición de la Master Mix (2x):
0.05 U / μ L Taq ADN polimerasa
Tampón de reacción
4 mM MgCl ₂
0.4 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP y dTTP).

11.3 Anexo C. Marcador de Peso Molecular (Thermo Scientific™ GeneRuler™ 100 pb DNA Ladder)

Descripción

Thermo Scientific™ GeneRuler™ 100 pb DNA Ladder está diseñado para el dimensionamiento y la cuantificación aproximada de ADN bicatenario de amplio rango en agarosa y geles de poliacrilamida. La escalera se compone de diez fragmentos de ADN individuales purificados por cromatografía (en pares de bases): 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100. Contiene una banda de referencia (500 pb) para orientación fácil. La escalera se disuelve en buffer TE.

- Buffer de almacenamiento

Tris-HCl 10 mM (pH 7.6), EDTA 1 mM.

- Tinte de carga de ADN TriTrack 6X (buffer de carga)

10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.03% bromofenol azul, 0.03% xileno cianol FF, 0.15% de naranja G, 60% de glicerol y 60 mM de EDTA.

Componentes	#SM0241
GeneRuler 100 bp, DNA Ladder, 0.5 µg/ µL	50 µg (para 100 aplicaciones)
6X TriTrack DNA Buffer de carga	1 ml
Almacenar de -25°C a -15°C	

11.4 Anexo D. Preparación del gel de agarosa

1. Preparar una solución de agarosa al 1.5% en TBE 0.5X: Disolver por ebullición la agarosa en 100 mL de TBE 0.5X en un matraz Erlenmeyer. Dejar enfriar
2. Cuando la temperatura de la solución esté a 40°C agregar 2µL de bromuro de etidio y mezclar bien.
3. Se sella con cinta adhesiva el soporte donde se va a verter el gel de agarosa y se coloca el peine que servirá para formar los pocillos del gel.
4. Vaciar el líquido en un molde de acrílico colocando un peine con capacidad de 20µL por orificio para formar los pozos. Esperar por 20 minutos a que solidifique.

11.5 Anexo E. Preparación de la cámara para la electroforesis

1. Colocar el gel en una cámara de electroforesis que contenga buffer TBE 0.5 X (los pocillos deben estar del lado del cátodo) cubriendo completamente el gel sin sobrepasar la línea de límite de llenado.
2. Depositar las muestras en los carriles.
3. Aplicar flujo eléctrico de 100V. durante 90 min.

11.6 Anexo F. Integridad del DNA

Resultados de las determinaciones espectrofotométricas en NanoDrop ND1000 para evaluar la calidad del DNA

Muestra	Ácido nucleico (ng/uL)	A260/A280	A260/A230	A260	A280
10	114.785	2.071	1.727	2.296	1.108
14	26.408	1.866	1.219	0,528	0,283
17	5.63	1.542	0,494	0,113	0,073
21	55.584	2.027	1.441	1.112	0,548
22	19.145	2.022	0,877	0,383	0,189
36	89.268	2.067	1.822	1.785	0,864
37	19.996	1.831	0,693	0,400	0,218
DNA control	437.471	1.362	0,737	8.749	6.423

Valores de referencia (García y Pinto, 2014):

Relación	Valor	Pureza
A260 / A280	1.8 – 2	DNA de pureza óptima
	1.6 – 1.8	DNA pureza aceptable
	< 1.6	Presencia de compuestos aromáticos
	> 2.1	Contaminación con RNA
A260 / A230	< 1.5	Contaminación con sales, carbohidratos, fenoles.

11.7 Anexo G. Cálculo de índice kappa (Programa XLSTAT)

- Datos

El objetivo es determinar el valor de kappa para estimar el grado de concordancia entre dos pruebas diagnósticas.

Nivel de confianza de 95%

		PCR	
		positivos	Negativos
QL	positivos	9	0
	Negativos	1	26

Kappa = 0.929

Landis y Koch (1977) han establecido la escala a continuación para describir la calidad del acuerdo según los valores de Kappa:

- <0: Sin acuerdo
- 0 - 0.2: Pequeño
- 0.2 - 0.4: Acuerdo justo
- 0.4 - 0.6: Moderado
- 0.6 - 0.8: Sustancial
- 0.8 - 1: Casi perfecto

En nuestro caso, el valor Kappa de Cohen es **0.929**, lo que indica un acuerdo casi perfecto entre las pruebas de acuerdo con la escala anterior.

11.8 Anexo H. Determinación de la sensibilidad y especificidad de las técnicas de diagnóstico.

Tabla de contingencia 2x2 utilizada para el cálculo de sensibilidad y especificidad.

Resultados prueba	Enfermos (+)	Sanos (-)	Totales
Positivos	Verdaderos positivos (a)	Falsos positivos (c)	Positivos a+c
Negativos	Falsos negativos (b)	Verdaderos negativos (d)	Negativos b+d
Total	Enfermos a+b	Sanos c+d	N

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{verdaderos positivos}}{\text{total de casos positivos}} = \frac{a}{a+c} = \frac{VP}{VP+FN} \times 100$$

Dónde:

a= Verdaderos positivos

a+c= Total de casos positivos (enfermos)

VP= Verdaderos positivos

FN= Falsos negativos

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{verdaderos negativos}}{\text{total de casos negativos}} = \frac{d}{b+d} = \frac{VN}{VN+FP} \times 100$$

Dónde:

b= Verdaderos negativos

b+d= Total de casos negativos (sanos)

VN= Verdaderos negativos

FP= Falsos positivos

- PCR

Tabla de contingencia:

Resultados prueba	Enfermos (+)	Sanos (-)	Totales
Positivos	10	0	10
Negativos	0	26	26
Total	10	26	36

$$\text{Sensibilidad} = \frac{10}{10} \times 100 = 100\%$$

$$\text{Especificidad} = \frac{26}{26} \times 100 = 100\%$$

- QL

Tabla de contingencia:

Resultados prueba	Enfermos (+)	Sanos (-)	Totales
Positivos	7	0	7
Negativos	1	26	27
Total	8	26	34

$$\text{Sensibilidad} = \frac{7}{8} \times 100 = 87.5\%$$

$$\text{Especificidad} = \frac{26}{27} \times 100 = 96.2\%$$