



**Universidad Nacional Autónoma de México**  
**Facultad de Estudios Superiores Zaragoza**

**TESIS**

**Análisis de la sensibilidad a antibióticos y producción de toxina B de cepas de *Clostridium difficile* aisladas de pacientes con diarrea nosocomial.**

Que para obtener el título de:

Químico Farmacéutico Biológico

Presenta:

**Camacho Rodríguez Jazmín Guadalupe.**

No. Cuenta: 307226466

Director:

**Dra. Margarita Camorlinga Ponce**

Asesor:

**QFB Patricia Vidal Millán**

México, D.F., Noviembre del 2015



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.

## **Agradecimientos**

**A la UNAM y a la FES Zaragoza por la excelente formación académica..**

**A mi directora de tesis, la doctora Margarita Camorlinga Ponce, por permitirme formar parte de su equipo y a mis compañeros de la UMAE Hospital de Pediatría CMN Siglo XXI-IMSS: Laura, Jorge y Emanuel.**

**Al doctor Miguel de la Cruz, la Doctora Guadalupe Cárdenas, Norma y Graciela de la UMAE Hospital de Pediatría CMN Siglo XXI-IMSS.**

**A mi asesora de tesis la QFB. Patricia Vidal y a mis revisores: Roberto González, Georgina Rios y la Dra. Juana Rosado.**

**Al profesor Pablo De Los Santos por la ayuda proporcionada.**

**Y a cada uno de mis profesores y compañeros de la carrera por sus enseñanzas, del tipo escolar y de la vida.**

## **Dedicatorias**

**A mis padres Emma Rodríguez y Simón Camacho por ser siempre mi motor, por todo el apoyo que me han dado en cada etapa de mi vida y por ser los mejores padres que alguien pudiera tener. Les estoy sumamente agradecidos por creer en mí como nadie.**

**A mis hermanos: Andrés Camacho y Jocelyn Camacho por todos esos momentos que hemos compartido juntos y sin importar la distancia, el lugar o las circunstancias, siempre serán mis hermanos a los que quiero tanto.**

**A mi abuelita Carmen Rodríguez por ser mi segunda madre, cuidarme, alimentarme y apapacharme. A mi abuelito Ramiro Rodríguez por todas las enseñanzas que me dio y la fortaleza que siempre demostró, sé que desde donde te encuentras, siempre estarás conmigo.**

**A mis padrinos Guadalupe Rodríguez y Xóchitl Arellano, por el apoyo que me han brindado desde pequeña.**

**A Abihú Martínez, por ser mi compañero de la escuela y de la vida, por todos esos momentos que compartimos juntos y por el apoyo incondicional que siempre me ha ofrecido.**

**A Mónica Hernández y Cristian Arce, por la amistad que siempre me brindaron y por todos esos momentos de alegría y estrés que compartimos.**

**“Por mi raza hablará el espíritu”**

## **Anexos**

### **INDICE DE CUADROS**

**Cuadro 1** Antibióticos relacionados a la infección por *C. difficile*

**Cuadro 2.** Factores de virulencia asociados a *C. difficile*<sup>25</sup>

**Cuadro 3** Características de cepa hipervirulenta de *C. difficile*

**Cuadro 4.** Métodos de detección de *C. difficile* y sus toxinas

**Cuadro 5** Ventajas de los métodos de dilución en caldo y en agar

**Cuadro 6.** Tratamiento de la infección por *C. difficile*

**Cuadro 7.** Medidas estándar de los halos de inhibición a los antibióticos utilizados.

**Cuadro 8.** Secuencias de los Iniciadores utilizados en la PCR para identificar genes de *C. difficile*

**Cuadro 9.** Población de los aislados.

**Cuadro 10.** Sensibilidad antimicrobiana

**Cuadro 11.** Resultado de Toxinas

**Cuadro 12.** Distribución de la resistencia a antibióticos entre las cepas toxigénicas de *C. difficile*

### **INDICE DE FIGURAS**

**Figura 1.** Identificación de las cepas de *C. difficile* por su morfología, tinción gram y el brillo bajo luz ultravioleta

**Figura 2.** Porcentaje sensibilidad antimicrobiana de las cepas de *C. difficile* (población total)

**Figura 3.** Porcentaje de sensibilidad antimicrobiana de cepas de *C. difficile* de pacientes del sexo femenino, masculino y niños

**Figura 4.** Electroforesis en gel de agarosa para la identificación de la toxina cdt subunidad A, 219 pb, y para la subunidad b, 609pb

**Figura 5.** Electroforesis para el gen tpi, de la toxina b (432pb) y de la toxina a (311pb) mostradas en ese orden.

## **ABREVIATURAS**

<b>AAN</b>	<b>amplificación de ácidos nucleicos</b>
<b>CCFA</b>	<b>cicloserina, cefotixin, fructosa, agar</b>
<b>CDT</b>	<b>cdtA and cdtB</b>
<b>CFU</b>	<b>Unidad Formadora de Colonia</b>
<b>CMN</b>	<b>Centro Médico Nacional</b>
<b>CMI</b>	<b>Concentración Mínima Inhibitoria</b>
<b>CPM</b>	<b>Colitis Pseudomembranosa</b>
<b>EIA</b>	<b>enzimoinmunoanálisis</b>
<b>G-C</b>	<b>Guanina-Citocina</b>
<b>ICD</b>	<b>Infeccion por C. difficile</b>
<b>NCCLS</b>	<b>Comité Nacional de Normas de Laboratorios Clínicos</b>
<b>NAP1</b>	<b>North American pulse-field electrophoresis type 1</b>
<b>PaLoc</b>	<b>locus de patogenicidad</b>
<b>PCR</b>	<b>Reacción en Cadena de la Polimerasa</b>
<b>PFGE</b>	<b>Electroforesis en gel de campo pulsado</b>
<b>TC</b>	<b>tomografía computarizada</b>
<b>TcdA</b>	<b>toxina C. difficile A</b>
<b>tcdA</b>	<b>Gen que codifica TcdA</b>
<b>tcdB</b>	<b>Gen que codifica TcdB</b>

<b>TcdB</b>	<b>toxina C. difficile B</b>
<b>Tpi</b>	<b>Triosa fosfato isomerasa especifica de C. difficile</b>
<b>UMAE</b>	<b>Unidad Médica de Alta Especialidad</b>
<b>VE</b>	<b>Vía endovenosa</b>
<b>VO</b>	<b>Vía oral</b>

## TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
1. Resumen	1
2. Introducción	3
3. Marco teórico	5
3.1 Características microbiológicas de la bacteria	5
3.2 Cuadro clínico	6
3.3 Patogénesis	9
3.4 Virulencia	9
3.5 Factores de riesgo	12
3.6 Epidemiología	13
3.7 Diagnostico	14
3.7.1 Métodos microbiológicos	14
3.7.2 Métodos Moleculares	16
3.8 Pruebas de sensibilidad a antibióticos	16
3.9 Tratamiento	19
4. Planteamiento del problema	22
5. Hipótesis	22
6. Objetivos	23
7. Material y Métodos	23
7.1 Diseño experimental	23



7.2 Criterios de Inclusión y Exclusión.	24
7.3 Material Biológico	24
8. Resultados	29
9. Discusión	35
10. Conclusiones	40
11. Referencias	41

## 1. RESUMEN

*Clostridium difficile* (*C. difficile*) origina enfermedades gastrointestinales asociadas a antibióticos que comprende desde una diarrea relativamente benigna y de resolución espontánea hasta una colitis pseudomembranosa grave que pone en peligro la vida.

*C. difficile* es productora de una enterotoxina (toxina A) y una citotoxina (toxina B) La enterotoxina es quimiotáctica para los neutrófilos, con infiltración de polimorfonucleares en el íleon, lo que da lugar a la liberación de citosinas. Asimismo, la toxina A ejerce un efecto citopático que altera la unión intercelular estrecha e incrementa la permeabilidad de la pared intestinal. La citotoxina provoca la despolimerización de la actina, con posterior destrucción del citoesqueleto celular tanto en condiciones in vivo como in vitro, también es productora de una tercera toxina, la toxina binaria, la cual está relacionada con la inhibición de la motilidad intestinal; en los últimos años ha habido un incremento de la toxina binaria por lo que se busca la identificación de esta última.<sup>1</sup>

En este trabajo se analizó la sensibilidad a diferentes antibióticos en las cepas de *C. difficile* aisladas de pacientes con diarrea nosocomial para, de esta manera, buscar su mejor tratamiento y dado que es el principal agente etiológico relacionado con el uso desmedido de algunos antibióticos, es importante conocer también cuáles presentan resistencia.

Se aislaron las muestras de heces de pacientes que presentaban diarrea nosocomial de dos hospitales de especialización en la ciudad de México, identificando las tres toxinas (toxina A, toxina B y toxina binaria) en 11 de 44 aislados clínicos, observando que en el caso de los niños no hubo ningún caso en donde la toxina B o la binaria se

encontrara presente. A las muestras se les realizaron pruebas de sensibilidad de antibióticos, encontrando que la vancomicina y el metronidazol son el mejor tratamiento para la Infección por *C. difficile*.

## 2. Introducción

*C. difficile* es el principal agente etiológico responsable de la diarrea intrahospitalaria, relacionado con el uso prolongado de antibióticos. Esta bacteria está asociada con un espectro amplio de enfermedades, que van desde una diarrea leve, colitis, colitis pseudomembranosa y puede llegar hasta megacolon tóxico y sepsis fulminante. *C. difficile* produce tres toxinas que son responsables de la patogénesis de la bacteria, la toxina A (TcdA), la toxina B (TcdB), y la toxina binaria (CDT). Estas toxinas son codificadas en dos locus de patogenicidad integrados por genes que codifican para las toxinas y genes reguladores.

Recientemente se ha reportado un incremento importante en el número de casos relacionados con esta bacteria, principalmente por la aparición de cepas hipervirulentas, con las siguientes características genéticas:

- a) Ausencia del gen *tcdC*, cuya función es la regulación en la producción de TcdA y TcdB.
- b) Producción de toxinas TcdA, TcdB y CDT
- c) Resistencia a Fluoroquinolonas

A estas cepas se les ha denominado NAP1 (Electroforesis de campo pulsado Norteamericano de tipo 1 por sus siglas en inglés) y ha mostrado una rápida diseminación en Estados Unidos y Canadá.

En México apenas se conoce la prevalencia de este tipo de cepas, además de no conocer su resistencia a los antibióticos más usados en el tratamiento de la

enfermedad por lo que el objetivo de este trabajo fue conocer los antibióticos más recomendados para la infección con *C. difficile* y con qué frecuencia se pueden encontrar las toxinas A, B y binaria.

### 3. Marco teórico

#### 3.1 Características microbiológicas de la bacteria

El aislamiento de *C. difficile* se reportó desde 1935, por Hall y O'toole., estos investigadores observaron que este organismo producía una toxina que era altamente letal para el ratón, siendo solamente de 10-100 veces menos tóxica que la toxina botulínica. Casi 40 años después, hubo un incremento en los casos de Colitis Pseudomembranosa (CPM) relacionado con el uso de antibióticos. La especie conocida ahora como *C. difficile* fue identificada como el agente etiológico de la CPM relacionada con el uso de los antibióticos .<sup>2</sup>

*C. difficile* es un bacilo Gram positivo, anaerobio, capaz de producir tres toxinas: TcdA, TcdB y CDT. Se diferencia de las otras especies de *Clostridium* por presentar espora subterminal y por no elaborar lipasa y fosfolipasa, a partir de glucosa produce ácido acético; propionico, isobutírico, isovalérico y un pico alto de ácido isocaproico como productos finales.<sup>3</sup>

Este bacilo mide aproximadamente 0.5 µm de ancho por 3-6 µm de largo, es anaerobio estricto. Algunas cepas son móviles por la presencia de flagelos peritricos. En algunas ocasiones, las células vegetativas se unen por los extremos formando pequeñas cadenas de 2 a 6 bacilos. El único compuesto químico capaz de eliminar las esporas ha sido el hipoclorito de sodio concentrado.<sup>4</sup>

Las colonias de *C. difficile* en agar sangre tienen un diámetro de 2-5 mm, siendo circulares o rizoides, entre planas y poco convexas, de color grisáceo y superficie mate o algo satinada y no hemolíticas.<sup>5</sup>

Posee un olor característico a “establo de caballos”, que se desprende debido a las sustancias volátiles que sintetizan, como el p-cresol aunque también se ha llegado a afirmar que huelen a “fruto dulce”.<sup>6</sup>

El tamaño de su genoma es de 4'4 Mb aproximadamente y presenta un bajo contenido de Guanina-Citocina (G-C) del 28%. Debido a esta característica se le clasifica como perteneciente al *Phylum Firmicute* pseudobacterias Gram positivas con bajo contenido en G-C.<sup>7</sup>

### **3.2 Cuadro clínico**

La infección con *C. difficile* (ICD), se presenta por la alteración de la microbiota después del tratamiento antimicrobiano.<sup>8</sup>

La colitis por *C. difficile* debe sospecharse especialmente en pacientes que comienzan con diarrea (a menudo asociada con dolor o malestar abdominal, fiebre y leucocitosis), después de un tratamiento con antibióticos y especialmente en pacientes hospitalizados.<sup>9</sup>

La presentación clínica puede variar desde una diarrea leve, colitis sin pseudomembranas, una colitis pseudomembranosa o una colitis fulminante con riesgo para la vida del paciente. La diarrea por *C. difficile* puede ser asociada con la evacuación de mucosa o sangre oculta en las heces, pero la melena (heces negras) o la hematoquecia (sangre en las heces) son poco comunes. La fiebre, los calambres, las molestias abdominales y la leucocitosis periférica son comunes pero se encuentran en menos de la mitad de los pacientes. Las manifestaciones extraintestinales, como la bacteriemia, son poco comunes. La ileitis (inflamación del ileon) por *C. difficile* también

ha sido reconocida rara vez en pacientes que se han sometido anteriormente a una colectomía total, por ICD complicada o alguna otra indicación. Las formas leves se suelen acompañar de dolor abdominal crónico pero puede haber ausencia de síntomas sistémicos o de hallazgos relevantes en la exploración física. La colitis moderada-grave suele manifestarse como diarrea profusa, con dolor y distensión abdominal y en algunos casos hemorragia digestiva oculta. Los pacientes con afectación predominante del ciego y el colón derecho pueden tener leucocitosis y dolor abdominal pero diarrea mínima o ausencia de diarrea. Las complicaciones de colitis severa por *C. difficile* incluyen deshidratación, trastornos en los electrolitos, hipoalbuminemia, megacolon tóxico, perforación de los intestinos, hipotensión, insuficiencia renal, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, sepsis y muerte.<sup>10</sup>

Una definición de caso para la presentación usual de ICD incluye los siguientes hallazgos: (1) la presencia de diarrea, definida como 3 evacuaciones o más de heces no formadas en 48 horas consecutivas; (2) una prueba de heces con resultado positivo para la presencia de *C. difficile* toxigénico o sus toxinas o hallazgos colonoscópicos o histopatológicos que demuestren colitis pseudomembranosa. En la mayoría de los pacientes existen antecedentes de tratamientos con agentes antimicrobianos o antineoplásicos dentro de las 8 semanas previas al tratamiento.<sup>11</sup>

En el análisis de sangre, suele haber leucocitosis (a veces muy llamativa), aumento de la proteína C reactiva y disminución de la albúmina sérica. Puede aparecer dilatación del colon en las placas simples de abdomen y en la tomografía computarizada (TC) abdominal. En un 1-3% de los pacientes puede haber colitis fulminante, con íleo, megacolon tóxico e incluso perforación.<sup>12</sup>



Casi todos los antibióticos han sido implicados con infección por *C. difficile*; sin embargo el riesgo de desarrollar la enfermedad es particularmente alto con: clindamicina, cefalosporinas, amoxicilina y recientemente fluoroquinolonas de amplio espectro tales como levofloxacin, moxifloxacin, y gatifloxacin<sup>13</sup> (Cuadro 1). Los antibióticos más utilizados para el tratamiento de ICD son metronidazol y vancomicina, pero ya hay reportes en Estados Unidos y Canadá, de la presencia de cepas resistentes a estos antimicrobianos<sup>14</sup>. En individuos mexicanos, se desconoce el patrón de resistencia a estos antibióticos de las cepas de *C. difficile* infectantes.

Cuadro 1. Antibióticos relacionados a la infección por *C. difficile*<sup>13</sup>

<b>Muy frecuentes</b>	<b>Frecuentes</b>	<b>Poco frecuentes</b>
Ampicilina	Quinolonas	Vancomicina
Amoxicilina	Macrólidos	Metronidazol
Cefalosporina	Tetraciclinas	Aminoglicosidos
Clindamicina	Cloranfenicol	Rinfampicina
	Trimetoprim	Teicoplanina

Se ha informado que el 96% de los pacientes con infección de *C. difficile* sintomática han recibido antimicrobianos dentro de los 14 días previos a la aparición de la diarrea en donde todos recibieron un antimicrobiano dentro de los 3 meses anteriores a sus síntomas<sup>15</sup>. Los síntomas de ICD por lo general comienzan poco después de la colonización, con un tiempo promedio de inicio de 2 a 3 días.<sup>16</sup>

### 3.3 Patogénesis

La mayoría de las formas vegetativas de *C. difficile* ingeridos, son eliminados en el estómago y sólo un 1% del inóculo llega al intestino delgado. Sin embargo, las esporas de *C. difficile* 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. Cuando estas formas vegetativas llegan al ambiente anaerobio del ciego y colon en un hospedero susceptible, proliferan y colonizan la mucosa intestinal. 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.<sup>17</sup>

### 3.4 Virulencia

Todas las cepas de *C. difficile* toxigénico presentan un locus de patogenicidad (PaLoc) que mide aproximadamente 19,6 kb. Este locus está formado por 5 genes (*tcdA*, *tcdB*, *tcdD*, *tcdE* y *tcdC*). Los genes *tcdA* y *tcdB* codifican 2 toxinas TcdA y TcdB (toxina A y B respectivamente). La expresión de *tcdA* y *tcdB* está regulada en forma positiva por *tcdD* y en forma negativa por el gen *tcdC*<sup>18</sup>. Los polimorfismos o deleciones parciales de *tcdC* pueden llevar una producción aumentada de las toxinas A y B. El gen *tcdE* codifica una holina que se encargará de hacer poros en la membrana citoplasmática que permite la liberación de las toxinas. Tanto TcdA como TcdB son citotoxinas con actividad de glucosiltransferasa, causando la interrupción de las fibras de actina del citoesqueleto que resulta en una disminución de la resistencia transepitelial, la acumulación de líquido y la destrucción del epitelio intestinal<sup>19</sup>. En años recientes se ha

encontrado que las cepas TcdA negativas y TcdB positivas, están asociadas a brotes de diarrea y a CPM fatal en individuos hospitalizados.<sup>20,21</sup>

TcdA o enterotoxina: es quimiotáctica para los neutrófilos y provoca infiltración de leucocitos polimorfonucleares en el íleon, con liberación de citosinas, hipersecreción de líquido y necrosis hemorrágica. TcdB o citotoxina: causa despolimerización de la actina con destrucción del citoesqueleto celular tanto in vivo como in vitro.<sup>22</sup>

La toxina binaria (homóloga a la de *Clostridium perfringens*) formada por dos subunidades codificadas por cdtA y cdtB, donde la subunidad CdtB es responsable de la unión y translocación, facilitada por ciclofilina A y Hsp90, hacia el citoplasma de células epiteliales del intestino. La subunidad CdtA produce la ADP-ribosilación de la actina, desorganiza el citoesqueleto con el consecuente aumento de la adherencia de *C. difficile* al epitelio intestinal. Tiene actividad entero-tóxica in vitro, sin embargo, estudios en animales han demostrado que esta toxina por sí sola no es suficiente para producir infecciones.<sup>23</sup>

Otros factores de virulencia conocidos, son los siguientes: su adherencia en la que se une específicamente (in vitro) a las células del colon humano, la hialuronidasa; que posee actividad hidrolítica, degrada la matriz extracelular permitiendo la colonización del microorganismo, formación de esporas, en la que permite la supervivencia durante meses en el ambiente intrahospitalario (en presencia de oxígeno y gran cantidad de antibióticos). Este último factor tiene suma importancia en la conservación del microorganismo, ya que las esporas además son muy resistentes a la mayoría de los desinfectantes usados en los hospitales. Si es necesario limpiar y desinfectar

instrumental para luego usarlo en otro paciente, se encuentra indicado el uso de glutaraldehído alcalino e hipoclorito de sodio, y posiblemente también de desinfectantes yodados.<sup>24</sup>

**Cuadro 2.** Factores de virulencia asociados a *C. difficile*<sup>25</sup>

<b>Factor de virulencia</b>	<b>Actividad biológica</b>
Enterotoxina (Toxina A)	Produce quimiotaxis, induce la producción de citosinas con hipersecreción de fluido y produce necrosis hemorrágica.
Citotoxina (Toxina B)	Induce la despolimerización de la actina y la pérdida del citoesqueleto celular.
Toxina binaria	Inhibe la motilidad intestinal.
Factor de adhesión	Interviene en la unión a las células coloniales humanas
Hialuronidasa	Produce actividad hidrolítica
Formación de esporas	Permite la supervivencia del microorganismo durante meses en el medio hospitalario.

### 3.5 Factores de riesgo

La edad avanzada, el tiempo de hospitalización de los pacientes y la exposición a agentes microbianos son los factores de riesgo más importantes para la ICD. El riesgo relativo del tratamiento con un agente antimicrobiano dado y su asociación con la ICD depende de la prevalencia local de las cepas que son altamente resistentes al agente antimicrobiano en particular. La administración de agentes antimicrobianos aumenta el riesgo de ICD debido a que suprime la flora intestinal normal, proporcionando por lo tanto un “nicho” para que florezca *C. difficile*.<sup>26</sup>

La quimioterapia contra el cáncer es otro factor de riesgo para la ICD, mediada por la actividad antimicrobiana de varios agentes quimioterapéuticos. Pruebas recientes sugieren que *C. difficile* se ha convertido en el patógeno más importante que causa diarrea bacteriana en pacientes en EUA infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), lo que sugiere que estos pacientes corren un riesgo específico mayor debido a su inmunosupresión subyacente, exposición a agentes antimicrobianos, exposición a entornos de cuidado de la salud o alguna combinación de estos factores.<sup>27</sup>

Otros factores de riesgo incluyen: la cirugía gastrointestinal o la manipulación del tracto gastrointestinal, incluyendo la alimentación parenteral o el uso de sondas nasogástricas, además del uso de medicamentos de supresión del ácido, como los bloqueadores de histamina 2 y los inhibidores de bomba de protones.<sup>28</sup>

### 3.6 Epidemiología

Durante la última década se han presentado brotes intrahospitalarios graves en Canadá y Estados Unidos. En Estados Unidos la incidencia de diarrea por *C. difficile* en pacientes adultos hospitalizados se duplicó de 5.5 casos por 10,000 habitantes a 11, 2 por 10,000 habitantes en 2005 <sup>29</sup>. La tasa de hospitalización por *C. difficile* aumentó aproximadamente un 23% por año entre 2000 y 2005, destacando un incremento entre las personas mayores de 65 años, con una incidencia 5 veces más alta en comparación a personas entre 45 y 64 años. Los agentes etiológicos en los brotes de Quebec y en varios hospitales de Estados Unidos, así como países de Europa, tales como: Austria, Bélgica, Dinamarca, Finlandia, Francia, Luxemburgo, Holanda, Suiza, Inglaterra, España, fueron cepas hipervirulentas de *C. difficile* (Cuadro 3), conocidas como ribotipo 027, NAP1 (North American pulsed-field gel electrophoresis type1). Esta cepa presenta una variación en el gen represor tcdC lo que se manifiesta en la hiperproducción de toxinas A y B. <sup>31</sup>

**Cuadro 3** Características de cepa hipervirulenta de *C. difficile*<sup>30</sup>

- 
- **Ribotipo: 027**
  - **Toxinotipo III**
  - **Productora de grandes cantidades de toxinas A y B**
  - **Delección del gen tcdC de 18 pb en posición 117**
  - **Productora de toxina binaria**
  - **PFGE: Tipo NAP1**
  - **Cepa resistente a fluoroquinolonas**
-

### **3.6 Diagnóstico**

Las pruebas diagnósticas en los casos de sospecha de enfermedad asociada con *C. difficile* deben realizarse en el laboratorio mediante la demostración de la citotoxina, por el aislamiento y la identificación de toxinas producidas por *C. difficile* a partir de heces, por realización de una prueba de aglutinación del látex o un enzimoimmunoanálisis (EIA) para la glutamato deshidrogenasa de *C. difficile*, por una prueba EIA para la enterotoxina o citotoxina producidas por el microorganismo en las heces o por una combinación de métodos, los cuales se describen más adelante.

### **3.7. Métodos de identificación**

#### **Métodos microbiológicos**

*Cultivo:* La muestra de materia fecal se cultiva en el medio selectivo CCFA (cicloserina, cefoxitin, fructosa, agar). Previo a la siembra, se puede hacer un choque con alcohol para permitir una mejor recuperación de *C. difficile*, ya que sus esporas son resistentes al alcohol, es recomendable pre-reducir los medios que se van a utilizar, los medios líquidos se reducen por “baño María” en ebullición y los medios sólidos poniendo en anaerobiosis un día previo al cultivo, con lo que se obtiene un mayor rendimiento de recuperación de aislados. En el crecimiento *in vitro* en medios de cultivo, crecen tanto las cepas toxigénicas de *C. difficile* como las no toxigénicas, y tienen la misma morfología colonial. La adición de taurocolato de sodio o lisozima puede mejorar la recuperación de *C. difficile*, probablemente debido a un aumento de la germinación de las esporas<sup>32</sup>. Los resultados óptimos requieren que las placas de cultivo se reduzcan en un ambiente anaeróbico antes de su uso. Las cepas producen colonias planas,

amarillas, de aspecto vítreo esmerilado con una aureola amarilla rodeando el medio. Las colonias tienen un olor típico y muestran fluorescencia con lámpara de luz UV. Además, una tinción Gram debe mostrar una morfología típica (bacilos Gram positivo o Gram variable). Las cepas aisladas que no cumplan estos criterios pueden ser identificadas posteriormente por métodos bioquímicos o por cromatografía de gases.<sup>33</sup>

*Cultivo celular*: Esta técnica se considera el estándar de oro para la identificación de *C. difficile* toxigénico, en el cuadro 4 se comparan la sensibilidad y especificidad de esta prueba con las demás. El ensayo *in vitro* de citotoxicidad, producida por la TcdB, en cultivos celulares, que puede realizarse directamente de un filtrado de heces o de un aislado de *C. difficile* de heces. El resultado se considerará positivo cuando el efecto citopático es neutralizado con la antitoxina de *C. difficile*.<sup>34</sup>

**Cuadro 4.** Métodos de detección de *C. difficile* y sus toxinas<sup>35</sup>

Prueba	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
Análisis de citotoxicidad celular	92.7-100	99-100
Cultivo tisular	96.4	99.1
Elisa para toxina A + B	66-96.2	93.5-100
Elisa para toxina A	65.4-88.3	65.4-100
Reacción en cadena de la polimerasa	87-91.5	96-100

Aunque el cultivo de heces no es práctico desde el punto de vista clínico debido a al tiempo necesario para la obtención de resultados, la sensibilidad y especificidad del cultivo de heces seguido por la identificación de las cepas aislada toxigénicas (cultivo



toxigénico), realizado por el laboratorio proporciona el estándar contra el cual deben compararse los resultados de otras pruebas clínicas.

### **Métodos Moleculares**

Detección de toxinas de *C. difficile*, mediante amplificación de ácidos nucleicos (AAN) empleando diferentes métodos:

Ensayos moleculares por *Reacción en Cadena de la Polimerasa* (PCR) para la identificación del gen *tcdB* que codifica la TcdB. Se ha planteado que es el método más sensible y específico para la detección de *C. difficile*, siendo actualmente recomendado como método de diagnóstico. Se realiza directamente de DNA de heces o de los bacilos aislados.<sup>36</sup>

Ensayo de *PCR multiplex*. Se realiza con iniciadores específicos para las toxina TcdA, TcdB, CDT y un gen conservado de *C. difficile* (*tpi*).<sup>37</sup>

### **3.8 Pruebas de sensibilidad a antibióticos**

Para determinar la sensibilidad a los antibióticos, se utilizan diferentes métodos de laboratorio, los cuales tienen como objetivo evaluar la respuesta de los microorganismos contra uno o varios antimicrobianos. Existen dos métodos, que son: las técnicas de difusión y las técnicas de dilución. Dentro de las técnicas de difusión, el método más utilizado por su facilidad y rapidez es el método de Kirby-Bauer, en el que, se emplean discos de papel filtro impregnados con una concentración conocida de antibióticos. Tan pronto como el disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde al agar

Mueller-Hinton. El antibiótico difunde radialmente a través del agar a partir del disco formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18-24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición. La concentración de antibiótico en la interface entre bacterias en crecimiento y bacterias inhibidas se conoce como concentración crítica y se aproxima a la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) obtenida por métodos de dilución. Sin embargo los métodos de discos en placa no permiten una lectura directa del valor de CMI<sup>38</sup>. El diámetro obtenido del halo de inhibición de las bacterias por la difusión del antibiótico al agar y la sensibilidad de cada cepa bacteriana permiten clasificar a las bacterias en sensibles, intermedias o resistentes a cada uno de los antibióticos probados. En la literatura existen tablas con las que se comparan los diámetros de los halos de inhibición para clasificarlas como sensibles, intermedias o resistentes.

Los métodos de dilución se basan en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano, que se encuentra diluido en el medio de cultivo (caldo o agar). Estos son:

*Dilución en agar:* En estos métodos se incorpora el antimicrobiano a evaluar a un medio con agar. El antimicrobiano se añade cuando el medio aún está fundido. Para lograr el rango de dilución deseado se prepara una serie de placas, cada una con una determinada concentración de antimicrobiano. Las placas se inoculan con un replicador una vez que se haya solidificado el medio de cultivo. En la mayoría de los casos, el medio de cultivo a emplear es agar Mueller-Hinton, pero en función de los microorganismos y de sus necesidades nutritivas puede ser adecuado o necesario añadir algún suplemento a este medio, o emplear un medio diferente.<sup>39</sup>

*Dilución en caldo:* el medio recomendado es Mueller-Hinton. Existen dos modalidades de los métodos de dilución, en las que se utilizan tubos (macrométodo) o placas de microtitulación (micrométodo). En el método de macrodilución se emplea por cada combinación microorganismo/antimicrobiano una batería de tubos. Habitualmente se prepara la batería de tubos con 1 mL de medio estéril sin antimicrobiano. Al primero de ellos se añade 1 mL de la solución inicial del tubo de antimicrobiano hasta conseguir la concentración más alta a estudiar (teniendo en cuenta que este primer paso supone la dilución a la mitad de la solución madre, y que una vez inoculados los tubos, con 1 mL de inóculo, se diluirá nuevamente la concentración de antimicrobiano a la mitad). Tras mezclar adecuadamente, se pasa 1 mL al siguiente tubo; el proceso se repite tantas veces como diluciones se quieran estudiar, eliminando del último tubo de la serie 1 mL de medio con antimicrobiano, con objeto de mantener el volumen final de 1 mL. En el método de microdilución cada una de las pocillos de la placa de microtitulación con pocillos de fondo en “U” representa uno de los tubos del método de macrodilución. El volumen final de cada pocillo es habitualmente de 100  $\mu$ L, por lo que antes de la inoculación de la placa, cada pocillo debe contener 100  $\mu$ L de caldo con antimicrobiano (volumen de inóculo menor de 10  $\mu$ L) o 50  $\mu$ L (si se van a usar también 50  $\mu$ L para inocular la placa)<sup>40</sup>. El inóculo en los métodos de dilución en caldo se prepara a partir de suspensiones del 0.5 de la escala de MacFarland, empleando cualquiera de los dos métodos (crecimiento o suspensión directa). En el método de macrodilución se hará una dilución 1:100 de forma que al añadir 1 mL a los tubos con 1 mL de medio con antimicrobiano queden 10<sup>6</sup> CFU en 2 mL, es decir 5 x10<sup>5</sup> CFU/mL. De forma análoga, en el caso de la microdilución se hará una dilución 1:10 (en el caso de emplear un

inóculo de 5 µl) o 1:100 (en el caso de emplear un inóculo de 50µL<sup>41</sup>. En el cuadro 5 se comparan las ventajas de los métodos de dilución en caldo y agar.

**Cuadro 5.** Ventajas de los métodos de dilución en caldo y en agar.<sup>25</sup>

Caldo (microdilución)	Agar
10-12 antibióticos diferentes	32-36 microorganismos
Más microorganismos a menos antibióticos	Barata
Pipetas multicanal	Automatización
Lectura automatizada (resultado en 4 horas)	Placas comerciales

### 3.9 Tratamiento

En el caso de ICD leve a moderada, muchas veces basta con la suspensión del antimicrobiano prescrito. De no ceder con esta medida, el tratamiento de elección es metronidazol oral a una dosis de 250-500 mg cada 8 horas por 10 a 14 días. En el caso de ICD grave, se puede administrar vancomicina oral a una dosis de 125mg cada 6 horas por 10 días. La recurrencia es similar tanto si se ha usado metronidazol como vancomicina. Se recomienda tratar la primera recaída igual que si se tratará de un primer episodio. En caso de una segunda recaída y subsecuentes; se puede administrar 125 mg de vancomicina oral cada 6 horas por al menos 10 días y considerar dosis decrecientes durante 6-8 semanas (vancomicina se puede sustituir por 100mg de teicoplanina oral cada 12 horas).<sup>42</sup>

Un número pequeño de pacientes con infección por *C. difficile* puede desarrollar una colitis fulminante y algunos de ellos requerirán una colectomía, urgente (procedimiento

quirúrgico en el que se saca un extremo del intestino grueso a través de una abertura hecha en la pared abdominal). La colitis fulminante por *C. difficile* puede pasar inadvertida en sus estudios iniciales porque no presenta cuadro clínico específico pudiendo alcanzar una mortalidad en torno al 80%. El procedimiento quirúrgico de elección es la colectomía abdominal subtotal con ileostomía terminal. La colectomía debe hacerse en las siguientes situaciones: perforación del colón, megacolon tóxico o íleo grave con deterioro del paciente que no responda a tratamiento médico. La mortalidad postoperatoria descrita es de 35%- 80%. Esta alta mortalidad se debe principalmente al retraso de la intervención quirúrgica y a la falta de consenso en relación a la selección del paciente adecuado. Actualmente se ha empleado con éxito la rifaximida, para el tratamiento de la infección ya que la mayoría de las cepas son sensibles a este antibiótico.<sup>43</sup>

**Cuadro 6.** Tratamiento de la infección por *C. difficile*<sup>44</sup>

<b>Primer episodio</b>	<b>Tratamiento de la infección por <i>C. difficile</i></b>
<b>Infección leve a moderada</b>	Metronidazol 500 mg 3 veces al día VO por 10 días
<b>Infección severa</b>	Vancomicina 125-500mg 4 veces al día VO por 14 días o Fidaxomicina 200 mg 2 veces al día VO por 10 días
<b>Infección severa complicada</b>	Vancomicina 125-500mg 4 veces al día VO o por sonda nasointestinal o 500mg en 500mL de suero fisiológico 4 veces al día rectal como enema de retención en caso de ileo con distensión abdominal significativa junto con Metronidazol 500mg 3 veces al día EV por 14 días.
<b>Primera recurrencia</b>	Mismo esquema que primer episodio, estratificando al paciente según severidad de la diarrea.
<b>Segunda recurrencia</b>	Vancomicina 125 mg 4 veces al día VO por 14 días, seguido de 125 mg dos veces al día VO por 7 días, seguido de 125 mg cada 48 horas VO por 7 días, seguido de 125 mg cada 72 horas al día VO por 14 días, o Vancomicina 125 mg cuatro veces al día VO por 10 días seguido por pulsos de Vancomicina 125 mg cada 3 días por 10 veces.
<b>Tercera o más recurrencias</b>	Transplantes de microbiota fecal.

VO: vía oral; EV: endovenosa.

Numerosos antibióticos se han vinculado con la CPM, pero los más frecuentes son ampicilina y clindamicina y, más recientemente, fluoroquinolonas. El tratamiento de esta enfermedad consiste en interrumpir el antibiótico causal y administrar por vía oral metronidazol o vancomicina.<sup>45</sup>

#### **4. Planteamiento del problema**

A nivel global se ha observado un incremento de la ICD en pacientes hospitalizados, sometidos a tratamiento antimicrobiano, también se ha observado la selección de cepas de *C. difficile* más virulentas y resistentes a los antibióticos más utilizados para el tratamiento de la enfermedad. Sin embargo, en nuestro país los estudios son escasos.

Por lo que se plantean las siguientes preguntas de investigación:

- 1.- ¿Cuál es la frecuencia de *C. difficile* en pacientes con diarrea nosocomial?
- 2.- ¿Cuáles son las características toxigénicas de las cepas de *C. difficile* aisladas?
3. ¿Cuál es la sensibilidad a los antibióticos que se utilizan en el tratamiento de la ICD de las cepas de *C. difficile* aisladas?

#### **5. Hipótesis**

De acuerdo con la información teórica-científica disponible, suponemos que las cepas de *C. difficile* aisladas de la Unidad Médica de Alta Especialidad (UMAE) Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional (CMN) Siglo XXI-IMSS y de la UMAE Hospital de Pediatría CMN Siglo XXI-IMSS, serán productoras TcdA, TcdB y la CDT; y considerando los mecanismo de acción de los fármacos sobre la bacteria suponemos que serán resistentes a los antibióticos: clindamicina, rifaximina y fluoroquinolonas.

## 6. Objetivos

### Objetivo general

- Analizar la sensibilidad a antibióticos y determinar la producción de toxina B de cepas de *Clostridium difficile* aisladas de pacientes con diarrea nosocomial.

### Objetivos particulares

- 1. Determinar la frecuencia de aislamiento de *C. difficile* en pacientes hospitalizados y que presenten diarrea nosocomial
- 2. Determinar la frecuencia de la producción de las toxina A, B y binaria en las muestras aisladas de *C. difficile*.

## 7. Materiales y Métodos

### 7.1. Diseño experimental

Tipo de estudio: Observacional, transversal, prolectivo, descriptivo.

Población de estudio: Pacientes adultos de la UMAE Hospital de Especialidades del CMN Siglo XXI.IMSS y pacientes, niños de 3 a 18 años de la UMAE Hospital de Pediatría CMN Siglo XXI, IMSS,



## **7.2 Criterios de Inclusión y Exclusión.**

Inclusión: Pacientes mayores de 18 años de la UMAE Hospital de Especialidades del CMN Siglo XXI. IMSS que presenten diarrea nosocomial y proporcionen una muestra de heces para el diagnóstico de ICD; así como niños mayores de tres años hasta 18 años de edad provenientes de la de la UMAE Hospital de Pediatría CMN Siglo XXI, IMSS que presenten diarrea nosocomial

Exclusión: Pacientes que dieron negativo para toxina B de *C. difficile* en cultivo celular.

## **7.3 Material Biológico**

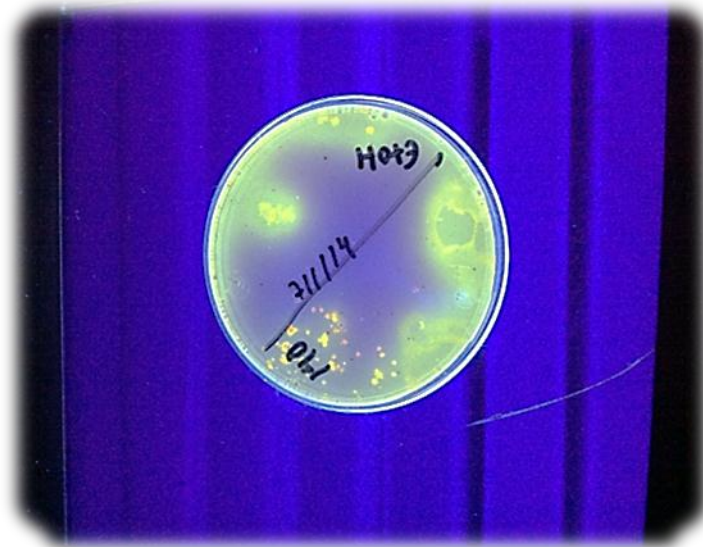
Muestras de heces de pacientes adultos con diarrea nosocomial, hospitalizados en la UMAE. Hospital de Especialidades del CMN Siglo XXI. IMSS, muestras de heces de niños con diarrea nosocomial hospitalizados en la UMAE Hospital de Pediatría CMN Siglo XXI. IMSS. Los materiales utilizados en esta sección fueron proporcionados por el laboratorio de Bacteriología de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI- IMSS.

### **Aislamiento e identificación de *C. difficile*.**

A las muestras de heces, se les dio un tratamiento con etanol al 70%, por 15 minutos, posteriormente se sembraron en agar CCFA, se incubaron en jarras en las que se generó la atmosfera anaeróbica (10% CO<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub>, 80% N<sub>2</sub>) mediante el equipo Anoxomat que permite controlar la atmósfera de anaerobiosis, durante 48 horas, a

37°C. Las colonias de *C. difficile* se identificaron, por su morfología colonial, tinción de Gram y por su color amarillo fosforescente en luz UV.

Para la correcta identificación de *C. difficile* las muestras en agar CCFA se observaban bajo luz ultravioleta, como se observa en la figura 1.



**Figura 1.** Identificación de las cepas de *C. difficile* por su morfología, tinción Gram y el brillo bajo luz ultravioleta

### **Extracción de DNA.**

Las colonias ya crecidas en gelosa sangre de carnero, se inocularon en caldo Brucella, posteriormente se centrifugaron en microtubos conteniendo 500µL de PBS 1x estéril., se agregaron 500µL de lisozima a una concentración de 2 mg/mL, manteniéndolos a 37° C de 30 a 50min. Se centrifugó 2min a 12 000rpm, posteriormente se decantó y a la pastilla se le agregaron 500µL de Regulador de lisis (GnCl 6M). Se realizó lisis por choque térmico (3 ciclos): revco -70° C 10 min y 65° C 10 min. Se le agregaron 500 µL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1. Se centrifugó 5 min a 12000 rpm,

posteriormente se extrajo la fase superior acuosa (aprox 500  $\mu$ L) y se transfirió a un tubo de 1.5mL estéril. Se agregaron 500 $\mu$ L de cloroformo:alcohol isoamílico 24:1. Se centrifugó 5 min a 12 000rpm. Se extrajo la fase superior acuosa (aprox 500 $\mu$ L) y se transfirió a un microtubo de 1.5mL. Se añadió 1 mL de etanol absoluto frío, agitando y en vórtex. Se centrifugó 10 min a 13 000 rpm. Se decantó y se lavó añadiendo 500  $\mu$ L de etanol al 70%. Se centrifugó 2 min a 10 000rpm. El botón de DNA se secó al vacío. Se resuspendió con 50 $\mu$ L de H<sub>2</sub>O mQ estéril. Se cuantificó en Nanodrop (marca Thermo Scientific) y se determinó la pureza A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>.

### **Pruebas de sensibilidad a antibióticos.**

#### **Método de Kirby Bauer.**

Inoculo bacteriano. Las cepas de *C. difficile* se crecieron en caldo Brucella durante 48 h, a 37°C, en anaerobiosis, posteriormente se ajustó el inoculo con el estándar de Mac Farland 0-5. Equivalente a  $1.5 \times 10^8$  Bacterias.

Medio de cultivo para Kirby Bauer. Se prepararon placas de agar Muller-Hinton con sangre de carnero al 5%, con 60mL de agar en cada placa, se dejó gelificar, se inoculó masivamente una cepa en cada placa, con un hisopo impregnado con el caldo del cultivo, para obtener un inoculo bacteriano uniforme. Se colocaron en la superficie impregnada con la bacteria los discos de antibióticos, separados entre sí. Se incubaron las placas en anaerobiosis, a 37°C durante 24 h. Se revisaron y se midieron los halos de inhibición. Se compararon con el cuadro 7 para determinar si las cepas fueron sensibles, resistentes o intermedias a los antibióticos probados.

**Cuadro 7.** Medidas estándar de los halos de inhibición a los antibióticos utilizados.<sup>46</sup>

<b>Antibiótico</b>	<b>Sensible ( mm)</b>	<b>Intermedio (mm)</b>	<b>Resistente (mm)</b>
<b>Vancomicina</b>	<9	10 -11	>12
<b>Clindamicina</b>	<14	15-16	>17
<b>Ciprofloxacina</b>	<15	16-20	>21
<b>Levofloxacino</b>	<13	14-16	>17
<b>Metronidazol</b>	<17	-	>18

## **PCR**

Para la realización de la PCR se usó la master mix GoTaq® Green Master Mix (Promega) la cual contiene TaqDNA polimerasa; dNTPs, MgCl<sub>2</sub> y reacciones buffer, además de usar los iniciadores mostrados en el cuadro 8.

**Cuadro 8.** Secuencias de los Iniciadores utilizados en la PCR para identificar genes de *C. difficile*<sup>47</sup>.

	gen	Secuencia (5' -3)	Tamaño del producto ( pb)
<b><i>C. difficile</i></b>	tpi	F: GAAGCTACTAAGGGTACAAA R: GGTCTATTCCTACTTCTAATGC	236
<b>Toxina A</b>	tcdA	F AATGATGTTACCTAATGCTCCTTC: R: AGTAAGTTCCTCCTGCTCCATC	311
<b>Toxina B</b>	tcdB	F:CCAGCTAATACACTTGATGAAAACC R: TTTCTTCACCTTCTTCATTTCTT	432
<b>Toxina binaria</b>	cdtA	F:GGAAGCACTATATTTAAAAGCAGAAGC R: TCTGGGTTAGGATTATTTACTGGAC'	219
	cdtB	F: AAAGTTGATGGTCTGATTGGGAAG R: TTTGTTGTTGGTGTCACTTTGTA	608

A la mezcla maestra se le adicionaron los iniciadores correspondientes para cada una de las toxinas y se colocaron en el termociclador AXYGEN, MAXYGENE con los siguientes tiempos: 45seg a 94° C, 1 min a 50° C, minuto veinte a 72° C durante 30 ciclos. Observando el resultado mediante electroforesis.

Los datos se analizaron por medio de estadística descriptiva con el paquete de Microsoft Excell 2010.

## 8. RESULTADOS

**8.1 Frecuencia de aislamiento de *C. difficile* e identificación de las toxinas.** En este trabajo, se procesaron 200 muestras fecales, y se aisló *C. difficile* de 44 muestras (una frecuencia del 22%). De los 44 aislados, 22 procedían de hombre y 22 de mujeres. De esas 44 muestras, 10 fueron de niños en donde 5 eran del sexo femenino y 5 del sexo masculino (Cuadro 9).

**Cuadro 9.** Población de los aislados.

<b>Sexo</b>	<b>Niños n=10( 22.7%)</b>	<b>Adultos n=34 (77.27%)</b>
<b>Mujer</b>	5 (50%)	17 (50%)
<b>Hombre</b>	5 (50%)	17 (50%)

Se obtuvo la frecuencia del Hospital de Especialidades de un 20.2% de aislados de *C. difficile*, mientras que la frecuencia del Hospital de Pediatría fue del 31.25% de aislados. La media de edad de los adultos fue de 61.6 años y la mediana de 70 años, en cuanto a los niños, la media fue de 8.5 años y la mediana fue de 13 años.

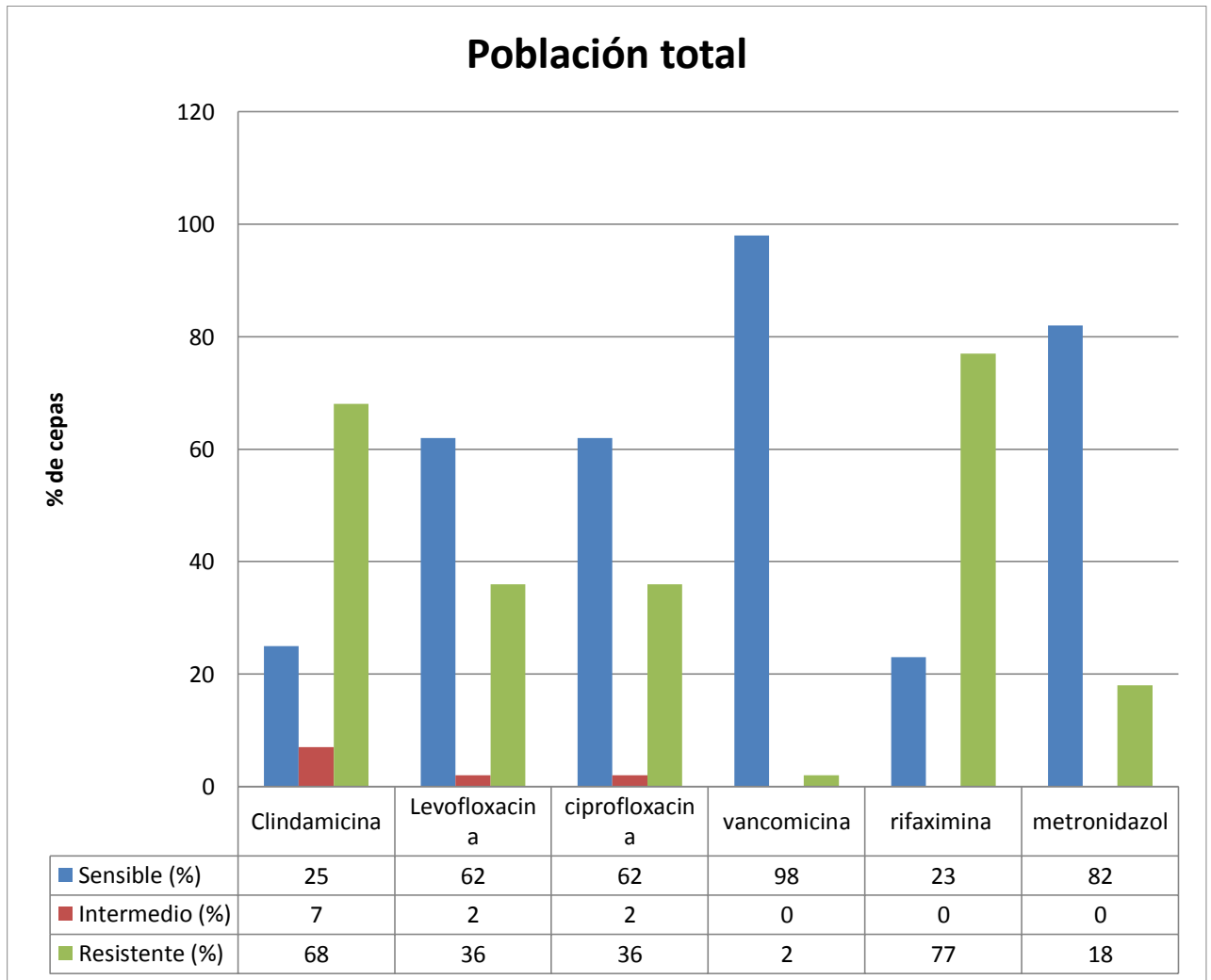
**8.2 Sensibilidad antimicrobiana de *C. difficile* por Kirby Bauer.** En el cuadro 10 , se observa que de las 44 cepas analizadas: 30 cepas fueron resistentes a clindamicina, 16 cepas fueron resistentes a levofloxacin y ciprofloxacina, 33 fueron resistentes a rifaximina, 8 mostraron resistencia a metronidazol y 1 fue resistente a vancomicina, algunas cepas mostraron sensibilidad intermedia a clindamicina(7%), levofloxacin y ciprofloxacina (2%).

Vancomicina y metronidazol que son los antibióticos usados en el tratamiento de la ICD muestran ser sensible en 43 (98%) y 36 (82%) muestras respectivamente.

**Cuadro 10.** Sensibilidad antimicrobiana

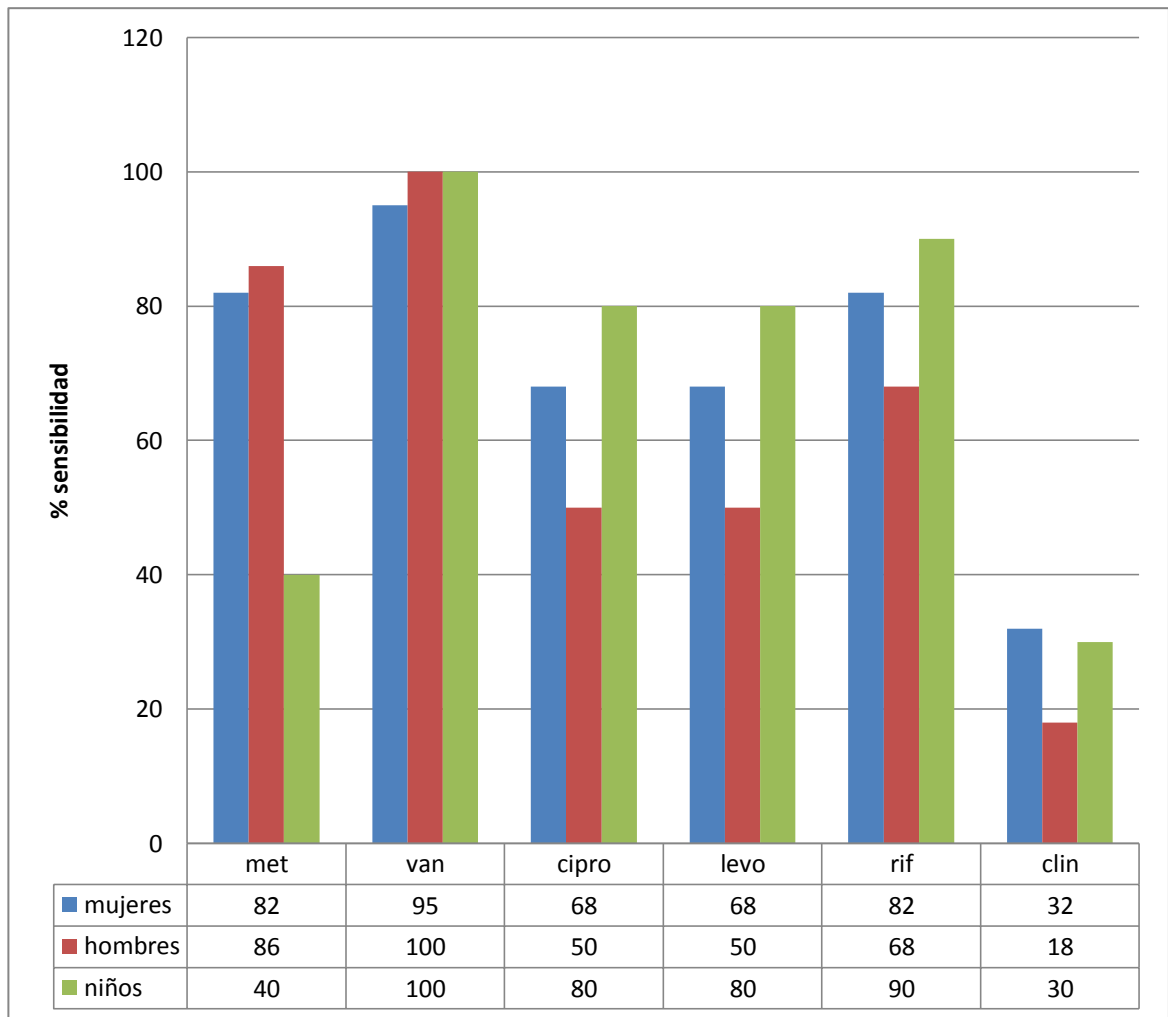
	<b>Sensible</b>	<b>Intermedio</b>	<b>Resistente</b>
<b>Clindamicina</b>	11 (25%)	3 (7%)	30 (68%)
<b>Levofloxacin</b>	27 (62%)	1 (2%)	16 (36%)
<b>Ciprofloxacina</b>	27 (62%)	1 (2%)	16 (36%)
<b>Vancomicina</b>	43 (98%)	0	1 (2%)
<b>Rifaximina</b>	11 (23%)	0	33 (77%)
<b>Metronidazol</b>	36 (82%)	0	8 (18%)

**Figura 2.** Porcentaje sensibilidad antimicrobiana de las cepas de *C. difficile* (población total)

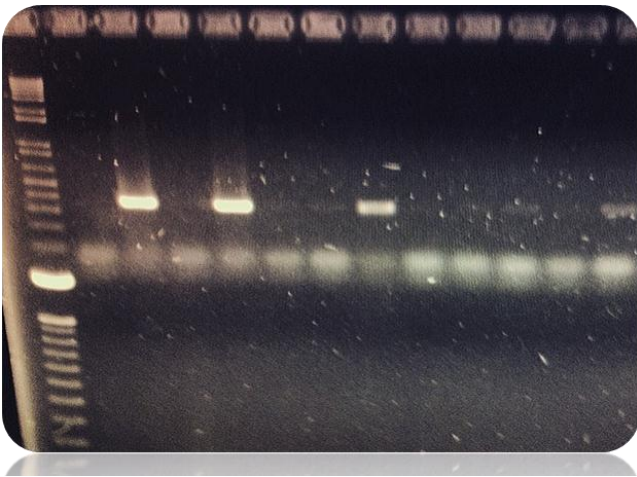




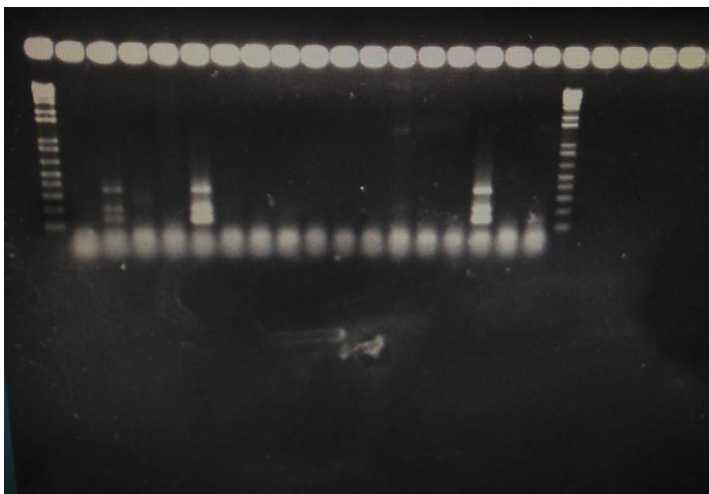
**Figura 3.** Porcentaje de sensibilidad antimicrobiana de cepas de *C. difficile* de pacientes del sexo femenino, masculino y niños.



Las características toxigénicas de las 44 cepas de *C. difficile* aisladas fueron las siguientes: se identificó Tcd A en 10 Cepas (23% ) , TcdB en 10( 23%) y, CDT en 6 (13.6%)cepas. En las figuras 4 y 5 se observan las toxinas obtenidas mediante PCR en una electroforesis.



**Figura 4.** Electroforesis en gel de agarosa para la identificación de la toxina cdt subunidad A, 219 pb, y para la subunidad b, 609pb.



**Figura 5.** Electroforesis de la toxina B (432pb), de la toxina A (311pb) y para el gen tpi (236), mostradas en ese orden.

**Cuadro 11.** Resultado de Toxinas

	Toxina A(TcdA) No(%)	Toxina B(TcdB) No(%)	Binaria (cdt) No(%)	TcdA+ Tcdb+ cdt+ No(%)
Niños	1 (10)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Adultos	12 (35.3)	11 (32.35)	11 (32.35)	11 (32.35)
Total	13 (29.54)	11 (25)	11 (25)	11 (32.25%)

**Cuadro 12.** Distribución de la resistencia a antibióticos entre las cepas toxigénicas de *C. difficile*

Grupo de resistencia	No(%) de aislados			
	Tcd A	Tcd B	cdt	TcdA TcdB,cdt
	positivos	positivos	positivos	positivos
<b>Clindamicina</b>	8 (18.8%)	8 (18.8%)	5 (11.36%)	5 (11.36%)
<b>Levofloxacina</b>	6 (13.6%)	6 (13.6%)	3(6.8%)	3 (6.8%)
<b>Ciprofloxacina</b>	7 (15.9%)	7(15.9%)	3(6.8%)	3(6.8%)
<b>Vancomicina</b>	1 (2.27%)	1(2.27%)	1(2.27%)	1(2.27%)
<b>Rifaximina</b>	4(9%)	4(9%)	3(6.8%)	3(6.8%)
<b>Metronidazol</b>	2(4.54%)	2(4.54%)	1(2.27%)	1(2.27%)

## 9. Discusión

### Frecuencia de *C. difficile* en pacientes hospitalizados y que presenten diarrea nosocomial

*C. difficile* es el principal agente etiológico relacionado con las diarreas asociadas al uso de antibióticos, aunque se puede encontrar en un 3% de la población de adultos sanos. En el Hospital de Especialidades se observó una frecuencia del 20.2% de aislados de *C. difficile*, mientras que la frecuencia del Hospital de Pediatría fue del 31.25% de aislados, la diferencia entre estos hospitales fue de que, a pesar de observarse una mayor frecuencia en el Hospital de Pediatría, las cepas de los aislados no presentaban citotoxicidad ni presencia de la toxina binaria, por lo que, aunque las esporas juegan un papel importante en la transmisión, iniciación y persistencia de la ICD, estos brotes tienen mayor respuesta a la terapia antimicrobiana que aquellas cepas que provienen del Hospital de Especialidades.. Al inicio de la investigación, no existían datos recientes de prevalencia de *C. difficile* en México, pero recientemente se realizó un estudio en Monterrey-Nuevo León, con adultos hospitalizados en el que, de 106 muestras analizadas, se lograron aislar 22 cepas de *C. difficile*, lo cual equivale al 20.7%; estas correspondieron a 40.9% en mujeres y 59.1% en hombres. El estudio data de abril de este año<sup>48</sup>. Por lo que al comparar este resultado con el obtenido en este estudio en el hospital de especialidades, se observa una frecuencia similar, con una diferencia únicamente del 0.5%.

En Irán se realizó otro estudio en donde, se observa que se aislaron 75 de 350 muestras fecales de pacientes con ICD, con una frecuencia de 21.4%, de los cuales

52% hombres y 48% mujeres 48,<sup>49</sup> datos muy similares con los obtenidos en este estudio: de 20.2% de aislados en adultos.

Todas las cepas que presentaron toxina B, también presentaron toxina Binaria, causante de una mayor virulencia. Ninguna cepa fue toxina A (-) Toxina B (+); las cepas que dieron negativo para toxina B, también lo fueron para la toxina A, con lo que, en base a lo expuesto anteriormente sobre la virulencia de *C. difficile*, en estas cepas no hay mutaciones de la Toxina A, que pudiera causar hipervirulencia. Esta relación que presenta la toxina A con la toxina B, se basa en que TcdA se adhiere eficazmente a la superficie apical del epitelio colónico, provocando la liberación de varias citosinas pro-inflamatorias y una vez que las uniones estrechas son alteradas, TcdB cruza hacia el lado basolateral de las células y se adhiere a un receptor provocando la citotoxicidad en la célula.

En el estudio realizado en Nuevo León, de las 22 muestras, 90.9%, fueron positivas a la enterotoxina, citotoxina y la toxina binaria, el restante 9.1% fueron positivas para tcdB, tcdA y tcdC pero negativas para cdtA y cdtB.<sup>48</sup>

En el trabajo realizado en Irán se reportó resistencia de *C. difficile* del 5.3% a metronidazol, mientras que en este trabajo se encontró que 8 cepas (18%) fueron resistentes a metronidazol. En el mismo reporte se publicó que todas las cepas de *C. difficile* incluidas en el estudio fueron sensibles a vancomicina,<sup>48</sup> en nuestro estudio tuvimos una única cepa resistente a este antibiótico.

## **Sensibilidad antimicrobiana de las cepas de *C. difficile* aisladas**

La razón, principalmente, de que las cepas mexicanas muestren mayor resistencia a metronidazol que a vancomicina puede ser por el uso indiscriminado en el tratamiento de ICD, ya que es el tratamiento de primera línea recomendado por la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas<sup>51</sup>. Aunque, es importante mencionar que a pesar de que la resistencia al metronidazol es gradualmente incrementada aún sigue siendo una droga efectiva para el tratamiento de ICD.

La clindamicina, fue el antibiótico que presentó mayor resistencia (68%), comparándolo con los otros antibióticos analizados. En estudios anteriores se observa que el 89.3% de la población muestra una relación con la formación de colitis pseudomembranosa<sup>49</sup>, este antibiótico y la producción de las toxinas liberadas por *C. difficile*, por lo que no es de extrañar la superior resistencia comparándola con el resto de los antibióticos. Otros estudios también han publicado porcentajes importantes de resistencia a clindamicina<sup>50</sup>, reportan que solo 16% de los aislados fueron sensibles a este antibiótico. Debido a que éste antibiótico en la circulación enterohepática, junto con sus metabolitos, determinan una presencia duradera del fármaco en las heces. En consecuencia los cambios de la flora intestinal pueden persistir 2 semanas después que se interrumpe la medicación, lo que se asocia con la colitis por *C. difficile* y alterando la microflora intestinal generará las condiciones para que ésta bacteria germine y así pueda secretar toxinas.

La rifaximina es un derivado de la rifamicina dirigido contra las bacterias anaerobias Gram positivas que alcanzan altas concentraciones en el tracto gastrointestinal,

mientras que su absorción es mínima. Al ser un nuevo antibiótico no está definido en la normativa de la NCCLS pero se puede hablar de cepas resistentes de manera cualitativa por la inexistencia del halo de inhibición, mostrando una resistencia del 75%. Podría deberse a que la sal pura del antibiótico utilizado fue la que se utiliza con los pacientes en su presentación inyectable, ya que no fue posible conseguir los discos de marca comercial para realizar el ensayo de Kirby Bauer.

En el caso de ciprofloxacina y levofloxacina son de la misma familia; de las fluoroquinolonas, conocidas por actuar frente a Gram positivos, y actualmente son antibióticos que cada vez tienen mayor auge para el tratamiento, por lo que hay un mayor el número de cepas sensibles (62%) que resistentes (36%), con sólo un 2% de cepas definidas como intermedias.

De las 44 muestras analizadas, 4 cepas presentaron colonias dentro del halo de inhibición, para descartar que se trataran de contaminantes se realizó de nuevo el ensayo y al observar el mismo resultado se pensó en la posibilidad de que sean clonas resistentes junto con clonas sensibles.

Se compararon los resultados de sensibilidad entre hombres y mujeres observando que no existen diferencias significativas en cuanto a la respuesta que tenga el antibiótico a *C. difficile*. Lo cual era de esperarse debido a que el sexo del paciente no influye en la respuesta que tenga a los fármacos, ni al mecanismo de acción del mismo.

Este estudio es de gran trascendencia debido a que los resultados muestran que existe una sensibilidad a la vacomicina (98%) mayor que la del metronidazol (82%) y este último muestra mayor resistencia (18%) en comparación con la vancomicina (2%) dado

que actualmente se utiliza el metronidazol como primer tratamiento. En cuanto a la clindamicina, al estar relacionada con la aparición de la CPM, se esperaba una mayor resistencia, observándose en este estudio una resistencia del 68%, menor a la rifaximina (77%); lo cual es de gran importancia porque actualmente se utiliza la rifaximina cuando existe resistencia a la vancomicina, contra el tratamiento de la ICD. Lo cual debe considerarse en el tratamiento de los pacientes mexicanos.



## 10. Conclusiones

- En pacientes mexicanos la frecuencia de *C. difficile* fue del 22% en aquellos pacientes con diarrea nosocomial.
- La vancomicina, es el mejor tratamiento para la ICD, porque aunque se utiliza de la misma manera que el metronidazol, se empieza a observar una cierta resistencia a este último.
- Existe una mayor preponderancia a las toxinas A (cdtA) y la toxina B (cdtB) identificadas mediante PCR y en menor medida la toxina binaria, la cual ha resultado estar involucrada en la hipervirulencia de *C. difficile*.
- El Hospital de Pediatría presenta una mayor frecuencia de cepas aisladas, pero el Hospital de Especialidades presentan cepas más tóxicas.

## 11. Referencias

1. McFarland L, Mulligan M, Kwok R et al. Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* infection. N Engl J Med. 1989; 320: 204-210.
2. Bartlett J. Historical Perspectives on Studies of *Clostridium difficile* and *C. difficile* Infection. Clin Infect Dis. 2008; 46: 54-49.
3. A.ba P. *Clostridium difficile*. Prevalencia e importancia ecológica en animales domésticos y fauna salvaje. (tesis doctoral). Madrid: Universidad Complutense de Madrid, Facultad de veterinaria; 2011.
4. Starr J. *Clostridium difficile* associated diarrhea: diagnosis and treatment. J Epidemiol Community Health. 2005; 331(7515): 498-501.
5. Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, et al. Koneman Diagnostico microbiologico: Texto y atlas en color. 6a ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2008: 984.
6. Meyer LS, Espinoza RA, Quera RP: infección por *Clostridium difficile*: Epidemiología diagnóstica y estrategias terapéuticas. Rev Med Clin Condes. 2014; 25(3): 473 -484.
7. Vicent C, Mehrotra S, Loo VG, Dewar K, Monges AR. Excretion of host DNA in feces is associated with risk of *Clostridium difficile* infection. J Immunol Res. 2015; 2015: 203-246.
8. Jhons S, Gerding D. *Clostridium difficile*– associated diarrhea. Clin Infect Dis. 1998; 26: 1027-1036

9. Almeida R, Gerbaba T, Petrof EO. Recurrent *Clostridium difficile* infection and the microbiome. J Gastroenterol. 2015; 1099.
10. Adalja AA, Kellum AJ. Of *Clostridium difficile*: moving beyond antimicrobial therapy. Critical Care. 2010; 14: 320.
11. Freeman J, Baver Mp, Baines SD, et al. The changing epidemiology of *Clostridium difficile* infections. Clin Microbiol Rev. 2010; 23 (3): 529-549.
12. Briceño I, Garcia P, Alvarez M, Ferres M, Quiroga T. *Clostridium difficile*: evaluación de varios métodos diagnósticos. Rev Chil Infect. 2000; 17(4): 313-320.
13. Lanzas C, Dubberke ER, Lu Z, Reske KA, Grohn YT. Epidemiological model for *Clostridium difficile* transmission in healthcare settings. Infect Control Hosp Epidemiol. 2011, 326 553-561.
14. Le F, Arora V, Shah DN, Salazar M, Palmar HR, Garey KW. A real-world evaluation of oral vancomycin for severe *Clostridium difficile* infection implications for antibiotic stewardship programs. Pharmacotherapy. 2012; 3(2): 129-134.
15. Olson M, Shanholtzer C, Lee J et al. Ten years of prospective *Clostridium difficile*-associated disease surveillance and treatment at the Minneapolis VA Medical Center, 1982-1991. Infect Control Hosp Epidemiol. 1994; 15: 371-381.
16. Rodríguez D, Mirelis B, Navarro F. infecciones producidas por *Clostridium difficile*. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2013; 31(4): 254-263.

17. Kuehne SA, Collery MM, Kelly ML, Cartman ST, Cockayne A, Minton NP. Importance of Toxin A, Toxin B, and CDT in Virulence of an Epidemic *Clostridium difficile* Strain. *J Infect Dis.* 2014; 209 (1): 83-86.
18. Ananthakrishnan AN. *Clostridium difficile* infection: epidemiology, risk factors and management. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2011; 8(1): 17-26.
19. Faulds-Pain A, Twine SM, Vinogradov E, Strong P, Dell A, Buckley A et al. The post-translational modification of the *Clostridium difficile* flagellin affects motility, cell surface properties and virulence. *Molecular Microbiology.* 2014; 94 (2): 272–289.
20. al-Barrak A1, Embil J, Dyck B, Olekson K, Nicoll D, Alfa M, et al. An outbreak of toxin A negative, toxin B positive *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a Canadian tertiary-care hospital. *Can Commun Dis Rep.* 1999;25(7):65-9.
21. Choi HY, Park SY, Kim Ya, Yoon TY, Choi JM, CHOE BK, et al. The epidemiology and economic burden of *Clostridium difficile* infection in Korea. *Biomed Res Int.* 2015; 2015.
22. Gawlik D, Slickers P, Engelmann I, Müller E, Lück C, Friedrichs A et al. DNA-Microarray based Genotyping of *Clostridium difficile*. *B;C Microbiol.* 2015; 15: 158-168.
23. Di Bella S, Friedrich AW, García- Almodovar E, Gallone MS, Taglietti F, Topino S, et al. *Clostridium difficile* infection among hospitalized HIV- Infect Individuals: epidemiology and risk factors: results from a case-control study (2002-2013). *BMC Infect Dis.* 2015; 15:194.

24. Knight DR, Elliott B, Chang BJ, Perkins TT, Riley TV. Diversity and Evolution in the Genome of *Clostridium difficile*. Clin Microbiol Rev. 2015; 28(3): 721-741.
25. Murray PR, Rosenthal KS, Pfauer MA. Microbiología médica. 5ª ed. Madrid: Elsevier; 2008: 411-413.
26. Gardilic MF, Fica AC, Chang MR, Llanos CM, Luzoro AV. Diarrea asociada a *Clostridium difficile* en un hospital de adultos. Estudio descriptivo, Rev Chil Infectol. 2000; 17(4): 307-312.
27. Becerra Mg, Ospina S, Atehortúa SL, Debsy YB. Risk factors of *Clostridium difficile* infections. Infection, 2011; 15(4): 220-226.
28. Kwan JH, Olsen MA, Dubber ER. The morbidity mortality and costs associated with *Clostridium difficile* infection. Infect Dis Clin North Am. 2015; 29(1): 123-34.
29. Dial MD, Kezouh A, Dascal A, Barkun A, Suissa S. Patterns of antibiotic use and risk of hospital admission because of *Clostridium difficile* infection. CMJA. 2008; 179 (89): 767-772.
30. Smits WK. Hype or hypervirulence: a reflection on problematic *C. difficile* strains Virulence. 2013; 4(7):592-6.
31. Vindigni SM, Surawicz CM. *C. difficile* Infection: Changing Epidemiology and Management Paradigms. Clin Transl Gastroenterol. 2015;6.
32. Pareja T, Hornillos M. Diarrea asociada a *Clostridium difficile* en el paciente anciano. SciDig. Rev Clín Española. 2007; 207 (2): 86-90.

33. Fedorko PD, Williams EC: Used of Cycloserine-cefoxitin-fructosa agar and L-proline-aminopeptidase (PRO Discs) in the Rapid Identification of *Clostridium difficile*. J Clin Microbiol. 1997; 35(5): 1258-1259.
34. Camorlinga-Ponce M, Gamboa M, Barragan JJ, Munoz O, Fekety FR, Torres JF. Epidemiological aspects of *Clostridium difficile* in a pediatric hospital and its role in diarrheal disease. Eur J Clin Microbiol. 1987;6(5):542-6.
35. Eckert C, Holschera E, Petita A, Lalandea V, Barbuta F. Molecular Test Based on Isothermal Helicase-Dependent Amplification for Detection of the *Clostridium difficile* Toxin A Gene. J Clin Microbiol. 2014; 52 (7): 2386-2389.
36. Kilic A, Alam MJ, Tisdell NL, Shah DN, Yapar M, Lasco TM, Garey K. Ph.D. Multiplex Real-Time PCR Method for Simultaneous Identification and Toxigenic Type Characterization of *Clostridium difficile* From Stool Samples. Ann Lab Med. 2015; 35(3): 306-313.
37. Krause JC, panning M, Hengel H, Henneke P. The role of multiplex PCR ub respiratory tract infections in children. Dtsch Arztebl Int. 2014; 111 (38): 639-645.
38. Michael GB, Freitag C, Fessier AT, Wendlandt S, Eidam C, Entarf M, et al. Antimicrobial resistance, ESBL and MRSA definitions and laboratory diagnostics. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 2014; 127(9-10): 339-348.
39. Baker, FJ, Breach MR. Manual de Técnicas de Microbiología Médica. 3ra ed. Madrid: Acribia; 1990.

40. Madigan M, Martinko J, Parker J. Brock Biología de los Microorganismos. 10a ed. Madrid: Pearson. 2010: 807-809.
41. Lennette HE, Balows A, Hauster WJ. Shadomy HJ. Manual de Microbiología Clínica. 4ª ed. Buenos Aires: Medica Panamericana; 1992.
42. Van der Wilden GM, Subramanian MP, Chang Y, Lottenberg L, Sawyer R, Davies SW, et al. Antibiotic Regimen after a Total Abdominal Colectomy with Ileostomy for Fulminant *Clostridium difficile* Colitis: A Multi-Institutional Study. Surg Infect (Larchmt). 2015;16(4):455- 460.
43. Orellana A. Salazar E. Colitis pseudomembranosa asociada al uso de antibióticos. Acta Odont. Venez. 2009; 47(2): 1-5.
44. Dellit TH, Chan JD, Fulton Ch, Pergamit RF, McNamara EA, Kim LJ, Ellenbogen RG, Lynch JB. Reduction in *Clostridium difficile* Infections among Neurosurgical Patients Associated with Discontinuation of Antimicrobial Prophylaxis for the Duration of External Ventricular Drain Placement. Infection Control. 2014; 35 (5):589-590.
45. Freeman J, Baver MP, Baines SD, Corver J, Fawley WN, Goorhuis B, et al The changing epidemiology of *Clostridium difficile* infections. Clin Microbiol Rev. 2010; 23: 529-549.
46. Morosini MI1, Cercenado E, Ardanuy C, Torres C. Phenotypic detection of resistance mechanisms in gram-positive bacteria. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2012;30(6):325-32.

47. Doosti A, Mokhtari-Farsani A. Study of the frequency of *Clostridium difficile* tcdA, tcdB, cdtA and cdtB genes in feces of calves in south west of Iran. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2014; 13-21.
48. Camacho-Ortiz A, López-Barrera D, Hernández-Gavia R, Galvan-De los Santos A, Flores-Treviño S, Llaca-Díaz JM, et al. First Report of *Clostridium difficile* NAP1/027 in a Mexican Hospital. PLoS ONE. 2015; 10 (5).
49. Goudorzi M, Goudorzi H, Alebouyeh M, Azimi RM, Shayegan FS, Reza M, et al. Antimicrobial Susceptibility of *Clostridium Difficile* Clinical Isolates in Iran. Iran Red Crescent Med J. 2013; 15(8): 704-711.
50. Aspevall O, Lundberg A, Burman LG, Akerland T, Svenungsson B. Antimicrobial susceptibility pattern of *Clostridium difficile* and its relation to PCR ribotypes in a Swedish university hospital. Antimicrob Agents Chemother. 2006; 50(5): 1890-2.
51. idsociety.org [Internet]. USA: IDSA; 2015 [actualizado agos 2015; citado 8 sep 2015]. Disponible en: [http://www.idsociety.org/IDSA\\_Practice\\_Guidelines/](http://www.idsociety.org/IDSA_Practice_Guidelines/)