

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES



UNIVERSITAS
Miguel Hernández



BIOTECNOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

UNIVERSITAS
Miguel Hernández

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Grado en Biotecnología

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE
SELECCIÓN DE BACTERIAS RESISTENTES
POR LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS DE
LA DIARREA POR *Clostridioides difficile***

Departamento de Producción Vegetal y Microbiología

Lucía López Ayllón

Tutor: Juan Carlos Rodríguez Díaz

Cotutora: Maria Paz Ventero Martín

Curso académico 2023/2024

ÍNDICE

1. LISTA DE ACRÓNIMOS	2
2. RESUMEN Y PALABRAS CLAVE	3
3. INTRODUCCIÓN	4
3.1 Características de <i>Clostridioides difficile</i>	4
3.2 Susceptibilidad a la infección por <i>Clostridioides difficile</i>	5
3.3 Tratamiento actual y prevención	6
3.4 Riesgo de colonización simultánea por otros microorganismos resistentes	8
3.4.1. Enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido	8
3.4.2. Enterobacterias productoras de carbapenemasas	9
3.4.3. Bacterias gramnegativas resistentes a la colistina	9
3.4.4. Cocos grampositivos resistentes a linezolid	10
3.4.5. Enterococos resistentes a la vancomicina	10
3.4.6. <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina (SARM)	10
3.4.7. <i>Candida auris</i> y <i>Candida parasilopsis</i> resistentes a fluconazol	11
4. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	11
5. MATERIALES Y MÉTODOS	12
6. RESULTADOS	17
7. DISCUSIÓN	27
7. CONCLUSIONES	30
8. PROYECCIÓN FUTURA	30
9. BIBLIOGRAFÍA	32

1. LISTA DE ACRÓNIMOS

ICD: Infección por *Clostridioides difficile*

CSM: Colitis pseudomembranosa

BLEE: Betalactamasas de espectro extendido

CPE: Enterobacterias productoras de carbapenemasas

VRE: Enterococos resistentes a la vancomicina

COL: Colistina

LNZ: Linezolid

SARM: *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina



2. RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

La infección por *Clostridioides difficile* (ICD) está muy relacionada con la composición del microbioma del paciente. La vancomicina y la fidaxomicina son los antibióticos más comúnmente utilizados para el tratamiento de esta infección, aunque está demostrado que la fidaxomicina es menos lesiva sobre el microbioma del paciente que la vancomicina. Con objeto de caracterizar este fenómeno, se analizó la influencia de estos dos tratamientos sobre la presencia de bacterias resistentes en el microbioma de los pacientes. Para ello, se analizaron muestras de heces pretratamiento y postratamiento de 88 pacientes diagnosticados de ICD. Estas muestras se sembraron en placas selectivas para identificar bacterias resistentes a diferentes betalactámicos, colistina, linezolid o vancomicina y levaduras resistentes a fluconazol. Las colonias se identificaron mediante MALDI-TOF y se llevaron a cabo confirmaciones fenotípicas de su resistencia. Se obtuvieron diez aislamientos de *E. coli* productora de BLEE y un aislamiento de cada una de las siguientes especies: *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* productoras de carbapenemasas, *K. oxytoca* resistente a colistina y *S. epidermidis* resistente a linezolid. Como conclusión, no se ha podido validar en nuestro medio que la vancomicina sea un fármaco con mayor capacidad de selección de microorganismos resistentes que la fidaxomicina, puesto que no hubo suficientes aislamientos como para observar ninguna relación entre este antibiótico y la selección de patógenos resistentes.

Palabras clave: Microbioma, ICD, fidaxomicina, vancomicina, cultivo, resistencia.

ABSTRACT:

Clostridioides difficile infection (CDI) is strongly related to the composition of the patient's microbiome. Vancomycin and fidaxomicin are the most used antibiotics for the treatment of this infection, although fidaxomicin has been shown to be less damaging to the patient's microbiome than vancomycin. To characterise this phenomenon, the influence of these two treatments on the presence of resistant bacteria in the microbiome of patients was analysed. For this purpose, pre-treatment and post-treatment stool samples from 88 patients diagnosed with CDI were analysed. These samples were inoculated on selective plates to identify bacteria resistant to different beta-lactams, colistin, linezolid or vancomycin and fluconazole-resistant yeasts. Colonies were identified by MALDI-TOF, and phenotypic confirmation of resistance was performed. Ten isolates of ESBL-producing *E. coli* and one isolate of each of the following species were obtained: carbapenemase-producing *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa*, colistin-resistant *K. oxytoca* and linezolid-resistant *S. epidermidis*. All in all, it has not been possible to validate in our setting that vancomycin is a drug with a greater capacity to select resistant microorganisms than fidaxomicin since there were not enough isolates to observe any relationship between vancomycin and the selection of antibiotic-resistant pathogens.

Keywords: microbiome, ICD, fidaxomicin, vancomycin, culture, resistance.

3. INTRODUCCIÓN

La infección por *Clostridioides difficile* (ICD) se ha convertido en un importante desafío para los sistemas de salud. Este microorganismo es el principal responsable de la diarrea infecciosa adquirida en entornos hospitalarios, afectando a un gran número de pacientes que reciben tratamiento en estos (Merchante et al., 2023). La exposición a antibióticos provoca alteraciones en la diversidad y abundancia de las especies que conforman la microbiota intestinal y que tienen un papel fundamental a la hora de inhibir la colonización por parte de microorganismos potencialmente patógenos tales como *C. difficile* (Wuethrich et al., 2021). El uso de antibióticos como la vancomicina y la fidaxomicina para tratar de forma específica la ICD puede exacerbar aún más la alteración del microbioma del paciente. Ante esta situación, los pacientes no solo son susceptibles a la colonización por *C. difficile*, si no también frente a muchos otros diversos patógenos actualmente extendidos.

3.1 Características de *Clostridioides difficile*

Clostridioides difficile es un bacilo grampositivo anaerobio estricto que posee la capacidad de formar esporas metabólicamente latentes, lo que facilita su transmisibilidad y supervivencia ante condiciones ambientales adversas. Sus esporas son resistentes a la presencia de oxígeno, al calor, a los desinfectantes comunes y la acción de diversos antibióticos (Buddle & Fagan, 2023). Por ello, su eliminación en los entornos hospitalarios se ve dificultada pese a los exhaustivos intentos de descontaminación, permaneciendo en áreas adyacentes a los pacientes infectados e incrementando los costes sanitarios asociados al tratamiento de esta infección. La vía de transmisión de las esporas es fecal-oral. Una vez ingeridas, son capaces de resistir al pH del estómago y alcanzar el colon, donde germinarán de nuevo en forma de células vegetativas y se reanudará la proliferación (Buddle & Fagan, 2023). La acción de las distintas toxinas producidas por las cepas de *C. difficile* sobre los tejidos epiteliales del colon derivará en las manifestaciones clínicas características de esta infección. Esencialmente será debido a la toxina A (una enterotoxina) y la toxina B (una citotoxina), aunque en algunas ocasiones también interviene una tercera toxina, conocida como toxina binaria, producida por ciertas cepas (Chandrasekaran & Lacy, 2017).

El principal síntoma que caracteriza a esta infección es la diarrea, pudiendo ser aguda y autolimitada o prolongarse dando lugar a episodios recurrentes. La colitis pseudomembranosa (CSM) representa su complicación más severa, causando una grave diarrea, calambres abdominales y fiebre, incluso

pudiendo llegar a ser mortal. La CSM se identifica por la formación de placas blanquecinas o pseudomembranas sobre el tejido del colon (Chandrasekaran & Lacy, 2017).

El mecanismo de intoxicación de las células huésped por parte de *Clostridioides difficile* se inicia a través de su adherencia sobre el epitelio intestinal gracias a sus proteínas de superficie (adhesinas). Sobre este epitelio se producirán la colonización y la secreción localizada de toxinas A y B. Una vez las toxinas producidas se han unido a sus correspondientes receptores de la superficie celular en el epitelio del colon, ocurrirá su internalización por endocitosis. Debido a que estas toxinas son glucosiltransferasas, una vez internalizadas producirán la glucosilación de las GTPasas de la familia Rho, generando la inactivación de estas. Se producirá así la alteración del citoesqueleto de las células del epitelio colónico, provocando su muerte apoptótica. Además, las toxinas estimulan la liberación citoquinas proinflamatorias y la infiltración de neutrófilos, lo que conduce a una respuesta inflamatoria intestinal aguda, una característica clave de la fisiopatología clínica de la ICD. Todo ello provoca una alteración en la función de barrera del epitelio colónico que, asociada a la inflamación, conduce a un aumento de la permeabilidad intestinal y vascular, promoviendo la secreción de líquidos y derivando en la sintomatología característica de la ICD (Chandrasekaran & Lacy, 2017; Kordus et al., 2022).

3.2 Susceptibilidad a la infección por *Clostridioides difficile*

El principal factor asociado a una mayor susceptibilidad ante una colonización por *Clostridioides difficile* es el desequilibrio en el microbioma intestinal del paciente principalmente inducido por la exposición previa a antimicrobianos, sobre todo en pacientes mayores de 65 años. Estos fármacos alteran la abundancia y diversidad de las especies que conforman la flora del colon, lo que reduce la capacidad para resistir a la colonización por patógenos resistentes externos y de inhibir el crecimiento excesivo de microorganismos endógenos (Wuethrich et al., 2021). A este fenómeno se le denomina disbiosis intestinal. Sin embargo, durante las últimas décadas ha cobrado importancia el aumento del número de casos de infecciones por *C. difficile* adquiridas en la comunidad, detectadas en personas más jóvenes y que no necesariamente habían estado expuestos a tratamientos antibióticos. Pese a ello, normalmente son casos de menor gravedad. Puesto que entre el 20% y el 27% de los casos tienen origen comunitario (Buddle & Fagan, 2023), se plantea que pueden existir otros factores de riesgo secundarios asociados, como el aumento de portadores asintomáticos, la aparición de cepas hipervirulentas o la contaminación de alimentos (Lim et al., 2020). Con todo, el uso de antibióticos sigue siendo la causa que más incrementa el riesgo de ICD (Ofori et al., 2018).

Se han podido identificar una serie de diferencias entre la composición del microbioma de aquellos pacientes que sufren la sintomatología de la ICD y aquellos que únicamente son portadores

asintomáticos de *C. difficile*. Se expuso que no solo es esencial mantener una adecuada diversidad de especies para evitar la colonización de este microorganismo, sino que también es clave la presencia o ausencia de ciertos taxones. Un microbioma sano está formado en un 90% por microorganismos del filo Bacteroidetes y Firmicutes. En menor medida, también están presentes los filos Proteobacterias, Actinobacterias, Fusobacterias y Verrucomicrobia. En el caso de los pacientes portadores asintomáticos, se observa una proporción de Bacteroidetes, Firmicutes y Proteobacterias similar a la esperada en individuos sanos. Sin embargo, en el caso de los pacientes que desarrollan sintomatología, se aprecia una disminución en el número de microorganismos del filo Bacteroidetes, una serie de cambios dentro del filo Firmicutes, y una mayor prevalencia de las Proteobacterias (Crobach et al., 2018). Por tanto, un estado de disbiosis, sumado a la elevada capacidad de *C. difficile* para adquirir resistencia frente a los distintos antibióticos empleados, permitirá la colonización patogénica de *C. difficile* a costa del desplazamiento las bacterias intestinales normales. La proliferación en el colon de este microorganismo potencialmente patógeno y su característica producción de toxinas generarán la enfermedad (Buddle & Fagan, 2023).

El tipo específico de antibiótico administrado y la duración de su uso también serán decisivos para definir la gravedad, pues de ellos dependerá el grado de disbiosis generado (Merchante et al., 2023). Los antibióticos de mayor riesgo de desarrollo de ICD incluyeron cefalosporinas y carbapenémicos de última generación, fluoroquinolonas y clindamicina (Webb et al., 2020; Buddle & Fagan, 2023).

No solo será importante el efecto los tratamientos previamente aplicados que provocaron una alteración en el microbioma y dieron paso al desarrollo de la ICD, sino también el de los antibióticos comúnmente aplicados para tratar la ICD una vez diagnosticada. Estos tratamientos seguirán intensificando el grado de alteración del microbioma y evitando la recuperación de la eubiosis, lo que favorecerá el crecimiento excesivo de otros microorganismos resistentes de forma paralela al padecimiento de la ICD. Hasta que no se recupere la integridad de su microbioma, el paciente seguirá siendo susceptible a nuevas recidivas de la ICD y a nuevas infecciones causadas por variedad de patógenos (Buddle & Fagan, 2023).

3.3 Tratamiento actual y prevención

Una vez se ha realizado el diagnóstico en un paciente, el primer paso es la suspensión de los tratamientos antibióticos no-ICD activos, siempre que sea posible. El uso de otros antibióticos de forma concomitante al tratamiento de la ICD disminuye la probabilidad de alcanzar la resolución clínica de esta infección y se asocia a recidivas (Mullane et al., 2011). Entre un 15% y un 25% de los pacientes

sufren un primer episodio de recurrencia. De hecho, la probabilidad de recurrencia se va incrementando con cada episodio de ICD afrontado por un paciente (Merchante et al., 2023).

El tratamiento clásico de la ICD se basaba en el uso de metronidazol o vancomicina, aunque el primero ha dejado de considerarse como un tratamiento de primera línea y en la actualidad solo es utilizado cuando no existen otras opciones disponibles. Los dos fármacos más empleados en este momento son la vancomicina y la fidaxomicina. La Sociedad Europea de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas recomienda utilizar la fidaxomicina preferencialmente, sobre todo en aquellos pacientes con alto riesgo de recurrencia (van Prehn et al., 2021). Pese a que el estudio de Zhanel et al. (2015) demostró que la respuesta clínica ante la vancomicina y la fidaxomicina es equivalente y ambos fármacos logran la resolución de la diarrea en la mayoría de los pacientes, existen evidencias de que en aquellos pacientes tratados con fidaxomicina el riesgo de sufrir recurrencias es menor. El efecto farmacológico de la fidaxomicina se sostiene mejor en el tiempo una vez finalizado el tratamiento y es más respetuoso con el microbioma (Venugopal & Johnson, 2012; Zhanel et al., 2015).

La vancomicina es un glicopéptido empleado a la hora de tratar infecciones causadas por patógenos grampositivos, debido a que es capaz de alterar el proceso de biogénesis de la pared celular de estas bacterias, provocando su muerte (Buddle & Fagan, 2023). Es un fármaco poco selectivo, que resulta lesivo para la diversidad del microbioma y que complica la recuperación del estado de eubiosis (Merchante et al., 2023). En el estudio de Ray et al. (2021) se observó que la vancomicina daba lugar a una disminución de la abundancia del filo Firmicutes y Bacteroides, en contraste con un aumento de Proteobacterias.

La fidaxomicina fue aprobada como antibiótico macrocíclico en el año 2011 por la FDA (Food and Drug Administration) (Venugopal & Johnson, 2012). La fidaxomicina posee un espectro antibacteriano más estrecho en comparación con el metronidazol o la vancomicina, y su actividad está más específicamente dirigida contra *C. difficile*. Su acción es selectiva contra anaerobios grampositivos, teniendo un potente efecto frente a *Clostridium spp.* Su efecto sobre estafilococos y enterococos es más moderado. Es menos activo sobre el resto de microbiota intestinal. De esta forma, no afecta en gran medida a los bacilos gramnegativos aerobios, anaerobios y facultativos del intestino (Goldstein et al., 2012; Zhanel et al., 2015). Esto ayuda a preservar en mayor medida la integridad del microbioma. Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la acción de la ARN polimerasa debido a su unión al complejo ADN-molde-ARN-polimerasa antes del inicio de la transcripción (Buddle & Fagan, 2023).

3.4 Riesgo de colonización simultánea por otros microorganismos resistentes

Como se ha expuesto previamente, una situación de disbiosis de la microbiota intestinal puede facilitar la colonización por otros diversos microorganismos patogénicos aparte de *C.difficile*. Esto incluye tanto a patógenos adquiridos de forma exógena en ambientes que actúan como reservorios, entre ellos los hospitales, como a aquellos microorganismos endógenos oportunistas que una vez han proliferado por encima del nivel habitual pueden iniciar su actividad patogénica. Algunos ejemplos de los microorganismos patógenos con mayor relevancia clínica son los siguientes:

3.4.1. Enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido

Los betalactámicos son la familia de antimicrobianos más frecuentemente prescritos en atención primaria y hospitales. Actúan sobre la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana. Las diferentes clases de betalactámicos son: penicilinas, cefalosporinas de cuatro distintas generaciones, carbapenémicos y monobactámicos. La aparición de mecanismos de resistencia capaces de inactivar a estos fármacos es preocupante, ya que las opciones terapéuticas alternativas a este tipo de antibióticos son muy limitadas (Suárez & Gudiol, 2009; Rivera et al., 2014). El principal mecanismo de resistencia frente a los betalactámicos es la producción de β -lactamasas, enzimas que hidrolizan el anillo betalactámico de estos fármacos (Suárez & Gudiol, 2009). Existen tres grupos de betalactamasas con gran relevancia clínica: betalactamasas de espectro extendido (BLEE), β -lactamasas tipo AmpC y carbapenemasas.

Las betalactamasas de espectro expandido (BLEE) son producidas esencialmente por enterobacterias (Miranda García, 2013), y son capaces de inactivar la mayoría de las penicilinas, cefalosporinas de todas las generaciones (salvo cefamicinas) y los monobactámicos. Los genes que las codifican se encuentran generalmente en elementos móviles que facilitan su diseminación (Kunishima et al., 2019). La expresión de esta enzima es compatible con la presencia de otros mecanismos de resistencia frente a los betalactámicos, como alteraciones en sus dianas, un sistema de bombeo de gran eficacia que provoque el eflujo del antibiótico o una permeabilidad alterada (Martinez-Martinez et al., 2017). El Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) recomienda hacer un cribado de la posible producción de BLEE en *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* y *Proteus mirabilis*, siendo las dos primeras especies mencionadas las productoras de BLEE más frecuentes (Miranda García, 2013).

3.4.2. Enterobacterias productoras de carbapenemasas

Los carbapenems son los antibióticos betalactámicos dotados de mayor espectro. Los distintos carbapenems son: imipenem, meropenem, ertapenem y doripenem. Estos fármacos producen la inhibición de la síntesis de la pared celular, afectando a la transpeptidación (Fresnadillo Martínez et al., 2010). Las carbapenemasas son enzimas capaces de conferir resistencia a casi todos los antibióticos betalactámicos (Cantón et al., 2012). Se encuentran principalmente en bacterias gramnegativas y permiten la hidrólisis de los antibióticos carbapenémicos. Las infecciones por enterobacterias productoras de carbapenemasas se asocian a altas tasas de mortalidad (Martinez-Martinez et al., 2017). En mayo de 2024, la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó un informe actualizado en el que se establecen los patógenos bacterianos cuya resistencia supone una mayor amenaza para la salud pública en la actualidad. La resistencia a carbapenems por parte de *Klebsiella pneumoniae* supone la prioridad máxima en el listado establecido por la OMS. Entre las mayores prioridades, también se encuentran *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Enterobacter spp.* resistentes a estos antibióticos (WHO, 2024). Los genes que codifican a las carbapenemasas pueden ser transferidos horizontalmente, estimulando la prevalencia de este mecanismo de resistencia entre las bacterias gramnegativas (Cantón et al., 2012). Las familias de carbapenemasas más frecuentes son NDM, IMP, VIM, OXA-48 y KPC (Tzouveleki et al., 2012).

3.4.3. Bacterias gramnegativas resistentes a la colistina

La colistina (también conocida como polimixina E) es un compuesto activo contra patógenos gramnegativos aerobios. Es el recurso empleado frente a microorganismos causantes de infecciones potencialmente mortales que previamente han mostrado resistencia a otros microbianos ampliamente utilizados, como los carbapenémicos. Su uso desmesurado ha conducido a la aparición de microorganismos patógenos resistentes a la colistina, lo cual supone un grave problema al tratarse en muchas ocasiones de la última opción de tratamiento. Múltiples bacterias poseen mecanismos de resistencia intrínsecos frente a este agente (*Proteus spp.*, *Morganella morganii*, *Hafnia alvei*...). Lo más alarmante es la adquisición de la resistencia a este compuesto a través de la transferencia plasmídica del gen *mcr-1*, que se encuentra altamente diseminado. Preocupa la resistencia a la colistina detectada en *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y otras enterobacterias (Lepe & Martínez-Martínez, 2022; Melgarejo Touchet, 2022).

3.4.4. Cocos grampositivos resistentes a linezolid

El linezolid es uno de los antibióticos de elección a la hora de tratar a pacientes que presentan cepas resistentes a otros antibióticos de primera línea de tratamiento. Suele emplearse frente a patógenos multirresistentes comunes en la UCI con limitadas opciones de manejo. Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la síntesis de proteínas bacterianas. Lo consigue mediante su unión a las subunidades ribosómicas 50S. Un microorganismo puede presentar resistencia al linezolid si existen mutaciones en el gen del ARN ribosómico 23S que forma parte de la subunidad 50S. También se ha detectado que la presencia del gen *Optra* puede conferir resistencia. El linezolid es utilizado para tratar infecciones graves causadas por bacterias grampositivas como *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, *Streptococcus pneumoniae* resistente a la acción de diversos fármacos o *Enterococcus faecium* resistente a la vancomicina, entre otros. Por ello, es esencial realizar un seguimiento de la evolución de la resistencia a linezolid en estas especies (Hashemian et al., 2018).

3.4.5. Enterococos resistentes a la vancomicina

Las cepas de *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis* resistentes a la vancomicina (VRE) son motivo de preocupación debido a su falta de sensibilidad frente a gran parte de los antibióticos comúnmente empleados ya que, como en los casos anteriores, existen limitadas alternativas terapéuticas frente a estos patógenos. Son dos de los microorganismos con mayor presencia en los medios hospitalarios y que con más frecuencia dan lugar a infecciones de origen nosocomial, llegando a causar bacteriemias si alcanzan el torrente sanguíneo. El origen de la resistencia a la vancomicina suele basarse en la presencia de los genes *VanA* y *VanB*, transmisibles a través de plásmidos. El gen *VanA* otorga resistencia a la vancomicina y a la teicoplanina, mientras que el gen *VanB* únicamente genera resistencia a la vancomicina (Martinez-Martinez et al., 2017).

3.4.6. *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM)

Staphylococcus aureus es una bacteria grampositiva asociada a numerosas infecciones adquiridas tanto de forma nosocomial como en la comunidad, aunque muchos individuos sanos también pueden portarla asintóticamente. Las cepas resistentes a la meticilina, un fármaco betalactámico, se relacionan con altas tasas de mortalidad. Estas cepas producen una versión alterada de la proteína de unión a la penicilina (PBP), confiriendo resistencia a la mayoría de las penicilinas semisintéticas disponibles y a gran parte de los betalactámicos. El gen *mecA*, transmitido mediante plásmidos, es el responsable de la producción de esta proteína mutada. Además, se ha detectado la aparición de nuevas versiones de este gen (*mecB*, *mecC* y *mecD*). Este tipo de resistencia dificulta el tratamiento de infecciones causadas por estafilococos (Lakhundi & Zhang, 2018).

3.4.7. *Candida auris* y *Candida parapsilosis* resistentes a fluconazol

Candida auris es uno de los agentes causantes de la candidiasis invasiva de transmisión nosocomial. Se caracteriza por su persistencia en superficies y materiales de entornos sanitarios (Barantsevich & Barantsevich, 2022). La preocupación sobre esta levadura se fundamenta en su rápida propagación a nivel mundial durante las últimas décadas y su resistencia hacia los fármacos antifúngicos actualmente disponibles (Tortorano et al., 2021). Se estima que el 90% de las *C. auris* aisladas son resistentes a fluconazol, uno de los antifúngicos más frecuentemente prescritos debido a su alta efectividad y su bajo coste (Pallotta et al., 2023). Por otro lado, el mismo problema de resistencia al fluconazol se plantea en el caso de *Candida parapsilosis*. En un inicio, la resistencia a este antifúngico no era común. Sin embargo, el número de aislamientos de *C. parapsilosis* resistentes de transmisión nosocomial se encuentra en incremento (Daneshnia et al., 2023).

4. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Múltiples estudios han comparado la utilidad clínica de la vancomicina y la fidaxomicina en relación con la curación de la diarrea causada por la colonización por *Clostridioides difficile* y la prevención de recidivas. Pese a ello, todavía no se conoce con demasiada profundidad cuál es la influencia de estos compuestos sobre el microbioma del paciente. Los pacientes que sufren una ICD generalmente poseen una importante alteración en la integridad de su microbioma intestinal debido a la aplicación de terapia antibiótica para tratar otras infecciones no-ICD previas. Por ello, será fundamental conocer los efectos de los tratamientos específicos empleados una vez diagnosticada la ICD, para evitar que el estado de disbiosis de su microbioma se agrave aún más.

Varios trabajos clínicos han mostrado la aparición de patógenos resistentes capaces de desplazar a la flora normal en el microbioma de los pacientes tratados con vancomicina debido a la mayor lesión del microbioma que se asocia a este fármaco. En concreto, se ha descrito que la utilización de vancomicina oral para el tratamiento de *Clostridioides difficile* ha generado la selección de cepas de *Enterococcus faecium* resistentes a este antibiótico. Además, también se ha dado a conocer que la vancomicina promueve la colonización por parte de *Candida spp.* (Donskey et al., 2000; Fridkin et al., 2001; Al-Nassir et al., 2008; Nerandzic et al., 2012; Correa-Martínez et al., 2021). Esto no se ha estudiado en nuestro medio, con una baja prevalencia de este tipo de microorganismo, pero en aumento en los últimos años.

El objetivo de este estudio es analizar la presencia de microorganismos resistentes en el microbioma intestinal de pacientes con ICD tratados con vancomicina o fidaxomicina, a partir de muestras de heces

recolectadas en tres momentos distintos: en el momento del diagnóstico, al finalizar el tratamiento y ocho semanas después de completarlo. Concretamente, se estudiará la presencia de enterobacterias productoras de BLEE, enterobacterias productoras de carbapenemasas, bacilos gramnegativos resistentes a colistina, cocos grampositivos resistentes a linezolid, enterococos resistentes a vancomicina, *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA), y *Candida auris* o *Candida parapsilosis* resistentes a fluconazol en el microbioma del paciente mediante cultivo.

La hipótesis que se intentará comprobar es que la vancomicina posee una mayor capacidad para seleccionar microorganismos resistentes frecuentes que la fidaxomicina, debido a que se trata de un fármaco menos respetuoso con la flora intestinal y asociado a un mayor grado de disbiosis.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del estudio y muestras recopiladas:

El presente análisis se ha realizado a partir de la cohorte multicéntrica identificada en ClinicalTrials.gov con el código NCT04801862. Desde octubre de 2020 se encuentra activo un reclutamiento de cualquier paciente mayor de edad diagnosticado con una infección por *Clostridioides difficile* (ICD) en distintos hospitales de la Comunidad Valenciana y Andalucía. Para el diagnóstico de esta infección, el clínico debe haber detectado la sintomatología asociada a ICD y se debe haber confirmado en el laboratorio mediante PCR la presencia del gen de la toxina A y/o B de *Clostridioides difficile* en las heces del paciente. La inclusión de un paciente en el estudio ha sido independiente del medio en el que se ha dado la adquisición de este microorganismo: comunitario, nosocomial o asociado a la atención primaria. Se han recogido muestras de heces y los datos clínicos correspondientes a cada uno de los pacientes.

A lo largo de este concreto estudio, únicamente se han analizado las muestras recogidas en los distintos hospitales que pudieron ser trasladadas al Hospital General Universitario Dr. Balmis de Alicante antes de febrero de 2024. De esta forma, se ha establecido una subcohorte formada por 280 pacientes, procedentes de 11 hospitales distintos, que han sido diagnosticados de ICD y tratados de esta. Se dispone de muestras de heces tanto previas como posteriores al tratamiento con uno de los dos antibióticos, además de muestras tomadas 8 semanas tras el fin del tratamiento, para un mejor análisis de la evolución del paciente. Los hospitales de origen de las muestras son los siguientes: Hospital Universitario Virgen de Valme (Sevilla), Hospital General Universitario Dr. Balmis (Alicante), Hospital Universitario Sant Joan d'Alacant (Alicante), Hospital Vega Baja (Orihuela), Hospital Universitario y

Politécnico La Fe (Valencia), Hospital Clínico Universitario Virgen de la Victoria (Málaga), Hospital Marina Baixa (Villajoyosa), Hospital Universitario de San Cecilio (Granada), Hospital Universitario Virgen Macarena (Sevilla), Hospital Universitario Reina Sofia (Córdoba) y Hospital Universitario Puerto Real (Cádiz).

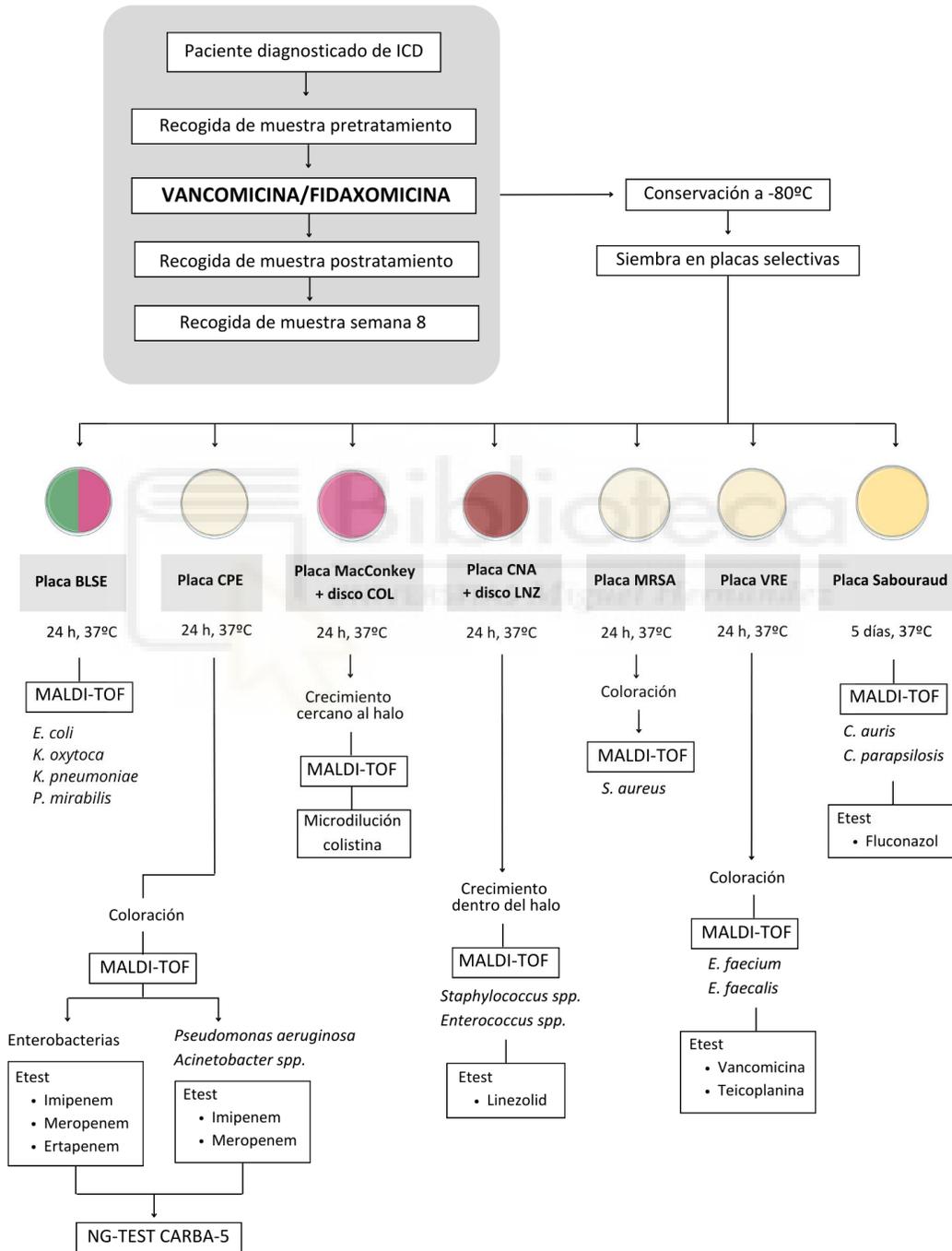


Figura 1: Representación esquemática del algoritmo de trabajo.

Procedimiento en el laboratorio:

Las muestras de heces se conservaron en un congelador a -80°C hasta el momento en el que fueron sembradas en siete distintas placas selectivas comerciales con el objetivo de aislar e identificar microorganismos resistentes de interés clínico. Estos medios selectivos evitan el crecimiento de la microbiota intestinal sensible. La inoculación de la muestra se llevó a cabo de forma directa, sin ser diluida, mediante el uso de torundas estériles. Las placas se incubaron durante 18-24 horas en una estufa bacteriológica a 37°C , hasta el momento de su lectura. Como excepción, la placa selectiva para levaduras fue incubada durante 5 días. Una vez transcurrido el periodo de incubación, se descartaron todas aquellas placas con ausencia total de crecimiento. Con respecto a las placas en las que existió crecimiento, se llevó a cabo un primer cribado fenotípico. Puesto que muchas de los medios de cultivo empleados durante el estudio eran cromogénicos, en caso de que las colonias crecidas no presentasen la coloración específica esperada, serían descartadas.

El resto de las placas con cepas de potencial interés fenotípico fueron sometidas a espectrometría de masas MALDI-TOF, con el objetivo de identificar rápidamente la/s especie/s que habían crecido. Para ello, se tomaron las colonias a identificar y se depositaron en cada uno de los pocillos de una placa de acero. Posteriormente se añadieron $0,5\ \mu\text{L}$ de ácido fórmico al 70% y, una vez este se había secado, $0,5\ \mu\text{L}$ de matriz (ácido α -ciano-4-hidroxicinámico). El primer compuesto ayuda a romper las proteínas bacterianas, y el segundo facilita la ionización de la muestra. Posteriormente, se introdujo la placa en el espectrómetro de masas. Una vez las moléculas eran ionizadas y separadas según su relación masa/carga, se establecía el perfil proteico de la muestra. Este se comparaba automáticamente con la correspondiente base de datos y el programa indicaba cuál era el microorganismo más compatible con el perfil proteico analizado. Tras la identificación de las especies a las que pertenecían las colonias crecidas en las placas, se descartaron todas aquellas especies no interesantes clínicamente o cuyo crecimiento había sido únicamente posible debido a que las placas utilizadas no siempre son tan selectivas como se desea. Además, se descartaron todos aquellos microorganismos identificados que poseían resistencia intrínseca a los antibióticos estudiados, pues únicamente se buscaba detectar microorganismos con resistencias adquiridas, cuya transmisión supone un riesgo para la comunidad.

Finalmente, se llevaron a cabo confirmaciones para aquellas especies con aparente interés clínico, con el objetivo de confirmar si verdaderamente eran resistentes al correspondiente fármaco. Para ello, se recurrió a la prueba Épsilon (Etest), basada en el uso de una tira de plástico con un gradiente de diferentes concentraciones de antibiótico. Esta tira se depositó en el centro de una placa de agar Mueller Hinton E (BioMérieux), en la que previamente se había sido inoculada la muestra en forma de césped. Para las inoculaciones, se prepararon suspensiones estándar de turbidez $0,5$ McFarland a partir

de las colonias de interés y cloruro de sodio. Tras 18-24 horas de incubación a 37°C, se formaría un halo en forma de elipse que indicaría la concentración mínima inhibitoria (CMI) de nuestra cepa en µg/mL, esto es, la concentración mínima del antibiótico empleado necesaria para inhibir el crecimiento del microorganismo. Una vez conocidas las CMI, se utilizó la actualización de 2024 de los puntos de corte establecidos por la Comisión Europea para la Evaluación de la Sensibilidad Antimicrobiana (EUCAST), que indican a partir de qué concentración mínima inhibitoria de un antibiótico un microorganismo es considerado resistente a este.

Las indicaciones específicas seguidas para cada uno de los siete tipos de microorganismos resistentes que se intentó aislar fueron las siguientes:

- ❖ La detección de enterobacterias productoras de β-lactamasas de espectro extendido (BLEE) se llevó a cabo mediante la biplaca de agar BLSE (BioMérieux). Esta posee dos medios diferentes con antibióticos selectores: agar Drigalski con cefotaxima (selector de enterobacterias productoras de BLEE) y agar MacConkey con ceftazidima (selector de gramnegativos con resistencia). La mejor sensibilidad y especificidad para la detección fenotípica de BLEE se logra mediante el cribado combinado que incluye el uso de ambos antibióticos mencionados, confirmando su presencia si existe sensibilidad hacia cualquiera de ellos (García et al., 2010). Según las recomendaciones del Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), el cribado de la producción de BLEE debe ser realizado en *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* y *Proteus mirabilis*.
- ❖ La detección de enterobacterias productoras de carbapenemasas (CPE) se ha llevado a cabo mediante el uso del medio cromogénico selectivo BD BBL™ CHROMagar™ CPE. En el caso de que se detectase crecimiento de colonias en la placa y mediante MALDI-TOF se identificaran como enterobacterias, se realizaría una prueba Etest para los antibióticos imipenem (Etest® Imipenem, BioMérieux), meropenem (Etest® Meropenem, BioMérieux) y ertapenem (Etest® Ertapenem, BioMérieux). Por otro lado, en caso de detectar *Pseudomonas aeruginosa* o *Acinetobacter spp.*, se realizaría un Etest de únicamente imipenem y meropenem, ya que estas dos especies presentan resistencia intrínseca a ertapenem (Fresnadillo Martínez et al., 2010). En caso de ser resistentes, se sometieron al test rápido de detección de carbapenemasas por inmunocromatografía (NG-Test® CARBA-5), capaz de detectar las cinco familias de carbapenemasas más importantes: DM, IMP, VIM, OXA-48 y KPC.
- ❖ La detección de resistencia a colistina por parte de Enterobacterales, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter spp.* se llevó a cabo sembrando las muestras de heces en forma de césped en

- placas de agar MacConkey (BioMèrieux) selectivas para bacterias gramnegativas. Posteriormente, se depositó un disco de 10 µg de colistina (BD BBL™ Sensi-Disc™ Antimicrobial Susceptibility Test Discs, Colistin³⁵) en el centro de la placa. Una vez incubadas, se seleccionaron las placas en las que crecieron colonias tocando el disco. La CMI de las colonias aisladas se conoció aplicando el método de microdilución, pues en el caso de la colistina se trata de la única prueba de sensibilidad aconsejada por EUCAST. No se recomienda el uso de tiras con gradiente. Se emplearon para ello el caldo Mueller-Hinton II (Bruker) y el kit UMIC® Colistin (Bruker). Para preparar el inóculo, se tomaron colonias aisladas del microorganismo identificado y se depositaron en una suspensión de NaCl para preparar una disolución homogénea 0,5 McFarland. Se tomaron 25 µL de esta disolución y se introdujeron en un bote de 5 mL del caldo Mueller Hinton comercial. Se tomó una tira de pocillos UMIC y se inocularon 100 µL de esta disolución en cada uno de ellos. Posteriormente, se produjo la incubación durante 18 horas, en una estufa a 35°C. La CMI se correspondió con el primer pocillo en el que existió ausencia de crecimiento. La guía de UMIC nos indica qué CMI se corresponde con este pocillo.
- ❖ Para la detección de cocos grampositivos resistentes a linezolid se sembraron las muestras de heces forma de césped en placas de agar Columbia CNA con 5% de sangre de oveja (BioMèrieux), selectivas para bacterias grampositivas. Posteriormente, se depositó un disco de 10 µg de linezolid (BD BBL™ Sensi-Disc™ Linezolid) en el centro de la placa. Una vez pasado el periodo de incubación, se seleccionaron las placas en las que existían colonias crecidas dentro del halo. Esas colonias se aislaron e identificaron por MALDI-TOF. En caso de que se tratase de *Staphylococcus spp.* o *Enterococcus spp.*, se procedió a realizar un antibiograma usando el Etest de linezolid (Etest® Linezolid, BioMèrieux) para confirmar su resistencia.
 - ❖ Para la identificación de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina se utilizó el medio cromogénico CHROMID® MRSA SMART de BioMèrieux. El crecimiento de *S. aureus* produciría una reacción colorimétrica, pudiéndose observar colonias de color rosa. Únicamente en este caso se procedió a la identificación con MALDI-TOF. No se llevó a cabo ninguna confirmación fenotípica de dicha resistencia.
 - ❖ La búsqueda de cepas de *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis* con resistencia adquirida a la vancomicina (VRE) se realizó usando el medio cromogénico selectivo CHROMID® VRE (BioMèrieux). En caso de que se diese crecimiento de una de estas dos especies en las placas empleadas, se observarían colonias de color rosado/morado. Se procedió la

confirmación mediante MALDI-TOF y en caso de que efectivamente se tratase de una de ellas, se sometieron a una prueba Etest de vancomicina (Etest® Vancomicina, y teicoplanina (Etest® Teicoplanina, BioMérieux) para confirmar su resistencia.

- ❖ Para la identificación de *Candida auris* o *Candida parapsilopsis* resistente a fluconazol, se sembraron las muestras en placas de agar Sabouraud Gentamicin Chloramphenicol 2 de BioMérieux, ideales para el aislamiento selectivo de levaduras. La incubación en este caso fue de 5 días. Cualquier crecimiento observado en esos 5 días se sometió a MALDI-TOF, y en caso de que se correspondiese con una de esas dos especies, se tomó una placa de agar RMPI (BioMérieux) y se inoculó en césped una disolución 0,5 McFarland preparada a partir de la cepa identificada y cloruro de sodio. Posteriormente, se depositó una tira de Etest de fluconazol (Etest® Fluconazol, BioMérieux) en el centro y se procedió a la lectura en los 2-3 días siguientes.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos obtenidos fue realizado utilizando la versión 29.0 del software IBM SPSS Statistics. Se empleó la prueba exacta de Chi-cuadrado de Fischer para comprobar si existía relación entre la frecuencia de aislamiento de microorganismos resistentes y el tipo de tratamiento aplicado para tratar la infección por *Clostridioides difficile* (vancomicina o fidaxomicina). Se aceptaron como significativos valores $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

Se produjo la participación de 290 personas diagnosticadas con ICD en el estudio. De todas ellas, 254 (88%) habían recibido tratamiento inicial con vancomicina o fidaxomicina. Se excluyó del estudio a las 36 personas que habían recibido un tratamiento distinto a los indicados o que no habían sido tratadas.

De las 254 personas seleccionadas, el número de pacientes de los que se poseía muestras correspondientes al pretratamiento, postratamiento y 8 semanas tras finalizar el tratamiento, fue significativamente menor. Solo se pudo recopilar la totalidad de las muestras de 88 (35%) de ellos. Las características clínicas de estos pacientes quedan recogidas en la **tabla 1**.

Esta selección final de pacientes se estratificó en dos grupos para llevar a cabo el análisis. El primer grupo está formado por las 74 personas que habían sido tratadas con vancomicina (84%) y el segundo grupo constituido por las 14 personas tratadas con fidaxomicina (16%).

Tabla 1. Características clínicas de los pacientes incluidos en el análisis.

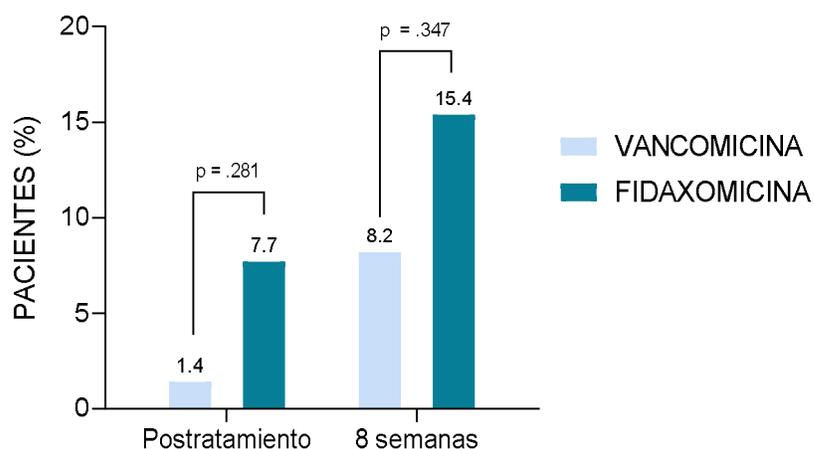
Parámetro	Vancomicina (N = 74)	Fidaxomicina (N = 14)	Total (N = 88)
<i>Edad, n (%)</i>			
<65	36 (49,6)	9 (64,3)	45 (51,1)
65-74	16 (21,6)	1 (7,1)	17 (19,3)
≥75	22 (29,7)	4 (28,6)	26 (29,5)
<i>Sexo femenino, n (%)</i>	43 (58,1)	11 (78,6)	54 (61,4)
<i>Hospitalización en el último año n (%)</i>	34 (45,9)	7 (50,0)	41 (46,6)
<i>Origen de la infección, n (%)</i>			
Comunitario	38 (51,4)	8 (57,1)	46 (52,3)
Relacionado con la asistencia sanitaria	16 (21,6)	1 (7,1)	17 (19,3)
Nosocomial (hospitalizado>72h)	20 (27,0)	5 (35,7)	25 (28,4)
<i>Episodios de recurrencia, n (%)</i>			
Sí	9 (12,2)	0 (0,0)	9 (10,2)
No especificado	1 (1,4)	0 (0,0)	1 (1,1)
<i>Inmunodepresión, n (%)</i>	17 (23,0)	6 (42,9)	23 (26,1)
<i>Antibióticos no-ICD activos durante el diagnóstico, n (%)</i>	21 (28,4)	2 (14,3)	23 (26,1)

Se comparará el porcentaje de pacientes tratados con cada antibiótico que han mostrado cultivos positivos para los distintos tipos de microorganismos resistentes estudiados: enterobacterias productoras de BLEE, enterobacterias productoras de carbapenemasas, bacterias gramnegativas resistentes a colistina, cocos grampositivos resistentes a linezolid, enterococos resistentes a vancomicina, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y *Candida auris* o *Candida parapsilosis* resistente a fluconazol.

La utilidad de las muestras tomadas en el momento del diagnóstico de la ICD será conocer si, en el caso de que se detecte crecimiento de un microorganismo resistente en las muestras de postratamiento, este ya estaba presente en el momento del diagnóstico. Debido a que se trata de un estudio cualitativo, no se ha cuantificado el número de unidades formadoras de colonias (CFU) antes y después de la aplicación del tratamiento para la ICD. Debido a esto, no será posible conocer la evolución de la concentración bacteriana de forma previa y posterior al tratamiento con la vancomicina o la fidaxomicina en aquellos pacientes en los que se detecte presencia de cierto patógeno resistente en ambas muestras. Tampoco se podrá conocer si en ambos casos se trata de la misma cepa. Por ello, no se dispondrá de suficiente información para analizar estos casos, por lo que se excluirán en esta ocasión.

Tras la siembra de cada una de las muestras de cada paciente en las distintas placas selectivas para cada tipo de microorganismo resistente, se obtuvieron los siguientes resultados:

A Cultivos BLEE positivos



No. eventos	1	1	6	2
No. pacientes	73	13	73	13

Figura 2. Porcentaje de pacientes con cultivo positivo de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido una vez aplicado del tratamiento de la ICD con vancomicina o fidaxomicina y una vez han transcurrido 8 semanas. En la tabla inferior a la gráfica se muestran el número de pacientes incluidos en cada categoría y el respectivo número de cultivos positivos.

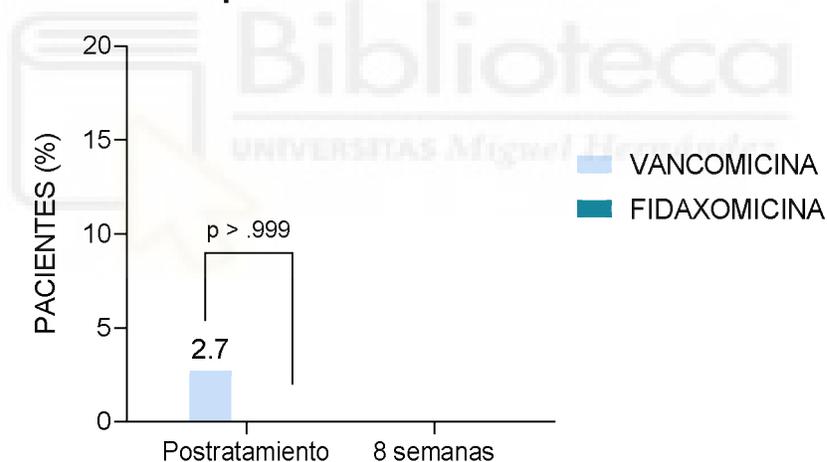
De los 88 pacientes con ICD analizados, dos mostraron crecimiento positivo de enterobacterias productoras de BLEE en las placas inoculadas a partir de sus muestras de heces pretratamiento. En ambos casos se trató de *Escherichia coli*. A pesar de que este microorganismo también fue detectado en sus muestras de postratamiento, ambos pacientes fueron eliminados del análisis por la razón indicada anteriormente.

Con respecto a las muestras de postratamiento de los 86 pacientes restantes, se observó que únicamente 1 de las 73 personas tratadas con vancomicina (1,4%) y 1 de las 13 personas tratadas con fidaxomicina (7,7%) mostraron crecimiento de enterobacterias productoras de BLEE, tratándose en ambos casos de *E. coli*. La diferencia entre estos dos porcentajes se asoció a un valor $p = 0,281$, lo que muestra que en esta ocasión el crecimiento de enterobacterias productoras BLEE es independiente del tipo de tratamiento aplicado. En el caso de las muestras tomadas 8 semanas después del fin del

tratamiento, 6 pacientes (8,2%) tratados con vancomicina y 2 pacientes (15,4%) tratados con fidaxomicina mostraron cultivos positivos, todos ellos identificándose de nuevo como *E. coli*. El valor de p volvió a mostrar una ausencia de significación entre la selección de microorganismos resistentes por parte de ambos tratamientos ($p = 0,347$).

Por otra parte, a pesar de que aparentemente se observa un incremento en el número de aislamientos una vez transcurridas 8 semanas con respecto al momento de postratamiento para ambos antibióticos, la diferencia entre los porcentajes de cultivos positivos en ambos momentos no es significativa. Comparando el porcentaje de aislamientos de *E. coli* en pacientes tratados con fidaxomicina, en las muestras de postratamiento (1,4%) y en las muestras de 8 semanas (8,2%), obtenemos un valor p de 0,116. Si por otro lado comparamos el porcentaje de aislamientos en el caso de aquellos pacientes tratados con vancomicina, con un 7,7% en las muestras de postratamiento y un 15,4% en las muestras de 8 semanas, se obtiene un valor p superior a 0,999.

B Cultivos CPE positivos



No. eventos	2	0	0	0
No. pacientes	74	14	74	14

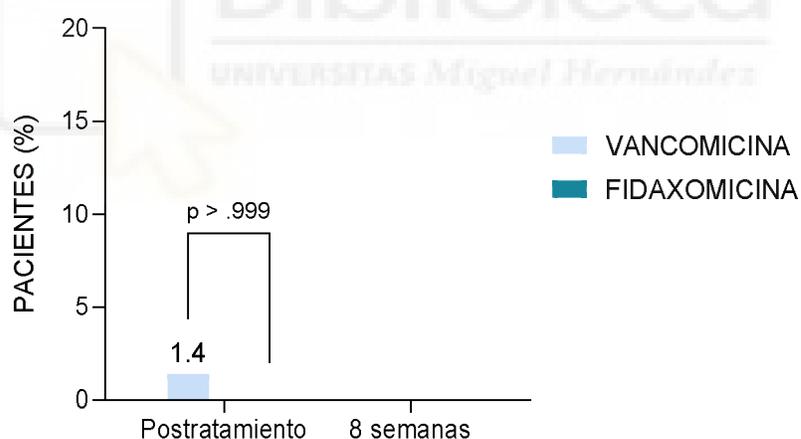
Figura 3. Porcentaje de pacientes con cultivo positivo de enterobacterias productoras de carbapenemasas una vez aplicado del tratamiento de la ICD con vancomicina o fidaxomicina y una vez transcurridas 8 semanas.

En cuanto a los cultivos selectivos para enterobacterias productoras de carbapenemasas, ningún paciente mostró presencia de crecimiento de este tipo de microorganismos en el momento de diagnóstico, por lo que los 88 pacientes se incluyeron en el análisis. Sólo se observaron 2 cultivos

positivos en el momento de postratamiento, correspondientes a dos de los 74 pacientes tratados con vancomicina (2,7%). En uno de ellos, *Klebsiella pneumoniae* fue la especie identificada, y en el otro caso, se trató de *Pseudomonas aeruginosa*. No se observó una variación significativa en la selección de CPE por parte de estos dos tratamientos ($p > 0,999$).

Tras la realización de las correspondientes pruebas Etest, la cepa aislada de *K. pneumoniae* mostró una CMI de 3 $\mu\text{g/ml}$ frente al imipenem y una CMI de 2 $\mu\text{g/ml}$ frente al meropenem, considerándose una cepa sensible a altas dosis de ambos antibióticos. Por otro lado, se consideró resistente al ertapenem ya que su CMI fue de 6 $\mu\text{g/ml}$, siendo superior al punto de corte de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ establecido por EUCAST. Se identificó mediante el uso de la correspondiente inmunocromatografía que producía carbapenemasas tipo OXA-48-like. La cepa de *P. aeruginosa* mostró por su parte una CMI superior a 32 $\mu\text{g/ml}$ frente a imipenem y meropenem, considerándose resistente a ambos (el punto de corte establecido por EUCAST para el imipenem es de 4 $\mu\text{g/ml}$, siendo de 8 $\mu\text{g/ml}$ para el meropenem). Se determinó que poseía carbapenemasas tipo V.

C Cultivos COL positivos



No. eventos	1	0	0	0
No. pacientes	74	14	74	14

Figura 4. Porcentaje de pacientes con cultivo positivo de bacilos gramnegativos resistentes a colistina una vez aplicado del tratamiento de la ICD con vancomicina o fidaxomicina y una vez transcurridas 8 semanas.

Durante la búsqueda de muestras de pacientes con crecimiento de bacilos gramnegativos resistentes a colistina, únicamente se observó un caso de cultivo positivo. Se trató de una cepa de *Klebsiella*

oxytoca aislada a partir de la muestra de postratamiento de un paciente tratado con vancomicina, con una CMI de 4 µg/mL para la colistina superior al punto de corte de 2 µg/mL establecido por Eucast. La diferencia entre el porcentaje de microorganismos resistentes a la colistina aislados en pacientes tratados con vancomicina (1,4%) y el número de aislamientos en los pacientes tratados con fidaxomicina (0,0%) no es significativa ($p > 0,999$).

D Cultivos LNZ positivos

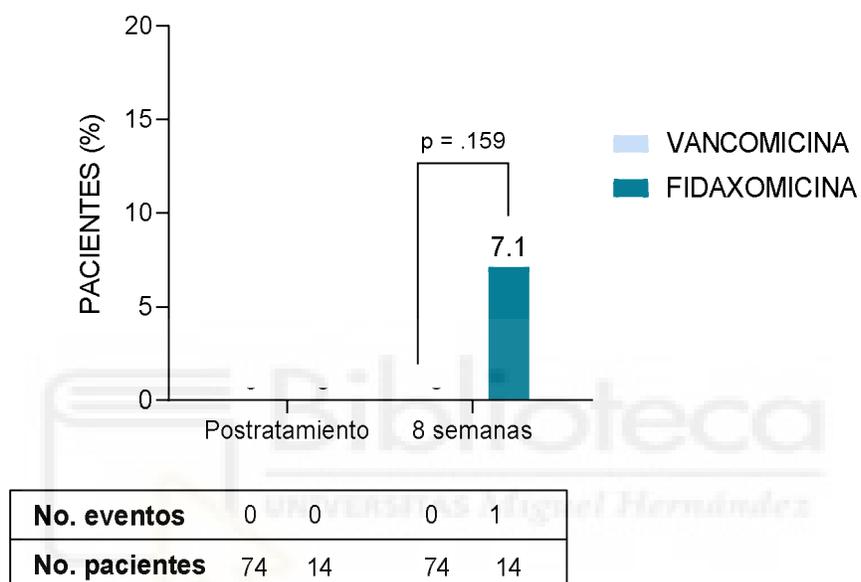
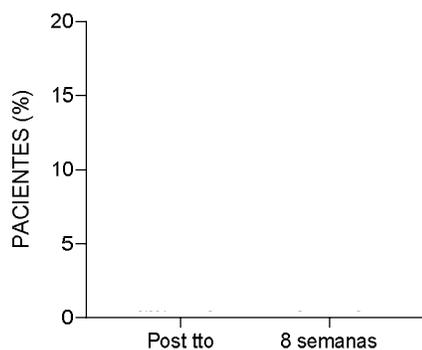


Figura 5: Porcentaje de pacientes con cultivo positivo de cocos grampositivos resistentes a linezolid una vez aplicado del tratamiento de la ICD con vancomicina o fidaxomicina y una vez transcurridas 8 semanas.

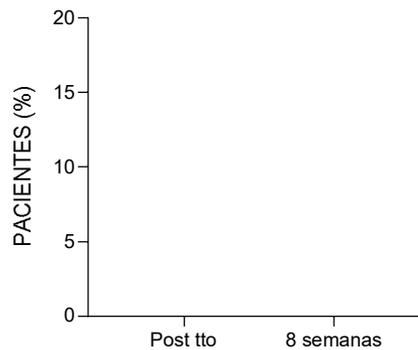
En el caso de los cocos grampositivos resistentes a linezolid, se aisló en una ocasión (7,1%) al microorganismo *Staphylococcus epidermidis* a partir de una muestra correspondiente a la semana 8 tras la aplicación del tratamiento con fidaxomicina. Su CMI fue superior a 256 µg/mL para el linezolid, siendo el límite establecido por EUCAST de 8 µg/mL. La diferencia con respecto al porcentaje de cultivos positivos en pacientes tratados con vancomicina (0,0%) no fue significativa una vez más ($p = 0,159$).

E Cultivos VRE positivos



No. eventos	0	0	0	0
No. pacientes	73	14	73	14

F Cultivos SARM positivos



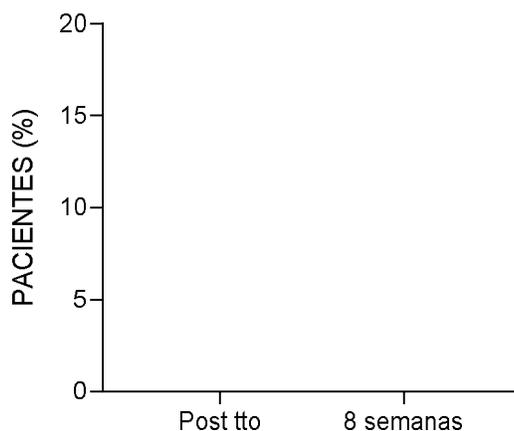
No. eventos	0	0	0	0
No. pacientes	74	14	74	14

Figura 6E. Porcentaje de pacientes con cultivo positivo de enterococos resistentes a vancomicina una vez aplicado del tratamiento de la ICD con vancomicina o fidaxomicina y una vez transcurridas 8 semanas. **Figura 6F:** Porcentaje de pacientes con cultivo positivo de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina una vez aplicado del tratamiento de la ICD con vancomicina o fidaxomicina y una vez transcurridas 8 semanas.

Un paciente presentó crecimiento positivo de *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina y teicoplanina en su muestra de postratamiento, con una CMI superior a 256 µg/mL para ambos antibióticos. Sin embargo, este crecimiento también se dio en su muestra de pretratamiento, por lo que se excluyó del análisis al no haber sido posible conocer si el tratamiento con vancomicina tuvo alguna repercusión sobre esta colonización. Ninguno del resto de los pacientes presentó cultivo de VRE positivo.

No hubo ningún caso de cultivo positivo para *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina.

G Cultivos *Candida* spp. positivos



No. eventos	0	0	0	0
No. pacientes	74	14	74	14

Figura 7G. Porcentaje de pacientes con cultivo positivo de *Candida parapsilosis* o *Candida auris* resistentes a fluconazol una vez aplicado del tratamiento de la ICD con vancomicina o fidaxomicina y una vez transcurridas 8 semanas.

Dos pacientes tratados con vancomicina mostraron cultivo positivo para *Candida parapsilosis* a partir de sus muestras de postratamiento. Sin embargo, según su CMI a fluconazol de 0,75 µg/mL, fueron clasificados como sensibles a este antifúngico. Lo mismo ocurrió con otro paciente tratado también con vancomicina que presentó un cultivo positivo de esta levadura en la semana 8, con una CMI de nuevo de 0,75 µg/mL. Por tanto, ninguno de los aislamientos superó la CMI de 4 µg/mL a partir de la cual *C. parapsilosis* puede ser considerado resistente a fluconazol. No se detectó ningún cultivo positivo de *Candida auris*.

Análisis complementario: integridad del microbioma medida por cultivo (culturoma).

La forma más informativa de analizar el microbioma de un paciente y la evolución de su composición a lo largo de un tratamiento antibacteriano es la aplicación de técnicas de secuenciación. Estas técnicas genéticas presentan una cobertura más amplia al permitir la identificación de la presencia microorganismos no cultivables.

El análisis de la composición del microbioma no era objeto de estudio en esta ocasión. Sin embargo, puesto que se ha hecho uso de placas de agar MacConkey y de agar Columbia CNA durante los experimentos, se puede obtener alguna conclusión acerca del estado de la microbiota de estos pacientes a lo largo del tratamiento, analizando su culturoma. El agar MacConkey permite identificar el crecimiento de bacterias gramnegativas aerobias o aerobias facultativas. De la misma manera, en el agar Columbia CNA crecerán las bacterias grampositivas aerobias o aerobias facultativas cultivables. No se cuantificaron ni se identificaron con MALDI-TOF las colonias crecidas en estas placas. Se realizó un análisis cualitativo y se consideraron como “positivas” todas aquellas placas en las que existió cualquier tipo de crecimiento.

A Cultivos positivos de bacterias gramnegativas

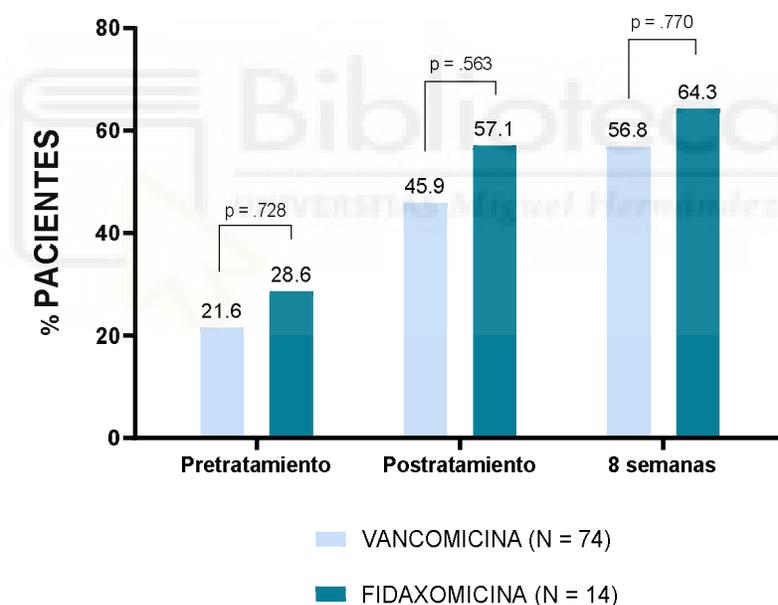


Figura 8. Porcentaje de pacientes con presencia de bacterias gramnegativas a nivel de culturoma.

Con respecto al crecimiento en las placas de agar MacConkey, observamos que la tendencia es similar para la vancomicina y la fidaxomicina. El número de pacientes con cultivo positivo de bacterias gramnegativas alcanza su mínimo en el momento de pretratamiento, observándose crecimiento en un 21,6% de pacientes tratados con vancomicina y en un 28,6% de pacientes tratados con fidaxomicina ($p=0,728$). Una vez terminado el tratamiento, el porcentaje de cultivos positivos aumenta a un 45,9%

en el caso de la vancomicina y a un 57,1% en el caso de la fidaxomicina ($p=0,563$). En la semana 8, momento en el que se supone que el microbioma debería de encontrarse más cerca del estado de eubiosis, observamos un 56,8% de pacientes con crecimiento de gramnegativos para la vancomicina y un 64,3% para la fidaxomicina ($p=0,770$). No se observan diferencias significativas entre ambos tratamientos, pero se observan unos porcentajes más altos en el caso de la fidaxomicina.

B Cultivos positivos de bacterias grampositivas

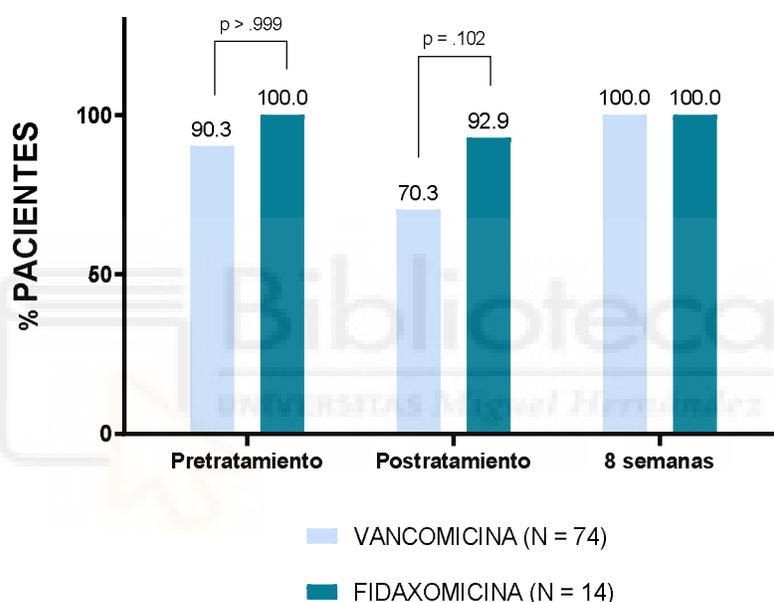


Figura 9. Porcentaje de pacientes con presencia de bacterias grampositivas a nivel de culturoma.

Por parte de las placas de Columbia CNA inoculadas con las muestras pretratamiento, postratamiento y de 8 semanas, observamos que generalmente un mayor número de pacientes presentaron cultivo positivo en este medio, lo que indica que gran parte de ellos presentaron bacterias grampositivas cultivables en su microbioma.

Un 90,3% de los pacientes tratados con vancomicina mostró crecimiento en el momento del diagnóstico. Los pacientes tratados con fidaxomicina presentaron en su totalidad crecimiento positivo de gramnegativas previamente al tratamiento ($p > 0,999$). Una vez aplicados los antibióticos, se observó una reducción del número de positivos al 70,3% en el caso de la vancomicina y a un 92,9% tras el

tratamiento con fidaxomicina ($p=0,102$). El porcentaje volvió a incrementarse una vez pasadas 8 semanas y la totalidad de los pacientes presentaron cultivo de gramnegativas positivo. De nuevo, no hay diferencias significativas.

7. DISCUSIÓN

El objetivo de esta investigación fue analizar si existía alguna diferencia entre la vancomicina y la fidaxomicina como tratamientos para la infección por *Clostridioides difficile* a la hora de exacerbar el grado de disbiosis que poseían los pacientes, promoviendo la colonización por parte de microorganismos resistentes. Es especialmente preocupante la detección de patógenos resistentes a tratamientos tanto de primera como de segunda línea en el microbioma de un paciente.

Las características clínicas de los 88 pacientes incluidos en este estudio se corresponden con lo expuesto en la literatura reciente. Pese a que anteriormente la ICD se consideraba una infección meramente nosocomial y asociada a personas con edad superior a los 65 años, se está observando un cambio de tendencia. En los últimos años, se ha observado un aumento en los casos de adquisición comunitaria de *C. difficile*, afectando a personas más jóvenes y con menor exposición a antibióticos.

De las 88 personas que se incluyeron en nuestro estudio, un 45% tenía una edad menor a 65 años y solo el 41% había sufrido una hospitalización previa durante el año anterior a la detección de la ICD. De hecho, el origen del 46 % de las infecciones fue notificado como comunitario y únicamente el 26,1% se encontraba en medio de una pauta de tratamiento antibiótico en el momento del diagnóstico. Estas cifras se corresponden con las estimadas por el estudio de Khanna et al. (2012).

Se dieron 9 casos de recurrencias entre los 88 pacientes estudiados (10,2%). Estos nueve pacientes habían sido tratados de la ICD con vancomicina. Esto concuerda con lo esperado debido a que la fidaxomicina se asocia en menor medida a casos de recurrencia (Merchante et al., 2023).

Varios estudios previos a la aprobación en 2011 de la fidaxomicina como fármaco para el tratamiento de la ICD estudiaron la capacidad de la vancomicina para promover la adquisición de VRE en comparación con el metronidazol. La investigación de Donskey et al. (2000) notificó que tras el tratamiento con antibióticos selectivos para los microorganismos anaerobios tales como *C. difficile*, se detectaron altos niveles de colonización por parte de enterococos resistentes a la vancomicina en los pacientes. Unos años más tarde, el estudio llevado a cabo por Al-Nassir et al. (2008) analizó a una cohorte de 82 pacientes confirmando que, una vez aplicado el tratamiento con vancomicina, se detectaba un sobrecrecimiento de VRE en las muestras de heces postratamiento con respecto a las muestras de heces recogidas de forma previa al inicio del tratamiento, en las ya había sido detectada

la presencia de VRE. Sin embargo, para aquellos pacientes con ausencia de VRE en el momento del diagnóstico, el autor expuso que no fue frecuente observar una nueva detección de este patógeno tras aplicar el tratamiento con vancomicina oral.

Con respecto a los estudios posteriores a la aparición de la fidaxomicina como posible tratamiento, Nerandzic et al. (2012) mostraron que el 31% de los pacientes tratados con vancomicina con cultivo negativo de VRE en el pretratamiento presentaron colonización por este patógeno en el postratamiento, tratándose de un 7% en el caso de los pacientes tratados con fidaxomicina. Esto contradice lo expuesto por Al-Nassir et al. El estudio más reciente encontrado, llevado a cabo en Alemania, mostró que 11 de las 133 personas tratadas con vancomicina estudiadas (8,3%) adquirieron colonización por VRE durante su tratamiento (Correa-Martínez et al., 2021).

Nuestro estudio podría corroborar lo expuesto por Al-Nassir (2008), ya que ningún paciente con ausencia de crecimiento de VRE en el pretratamiento mostró crecimiento de este tipo de patógenos durante el postratamiento. Hubiese sido interesante valorar la evolución de la concentración de VRE en el paciente que presentó crecimiento previo al tratamiento, para analizar si existió sobrecrecimiento de este patógeno estimulado por la aplicación de la vancomicina tal y como expone este autor.

En nuestro caso, la ausencia de detección de colonizaciones por VRE entre las 88 personas participantes a diferencia de lo ocurrido en otros estudios, podría deberse a que en España se observa una menor incidencia de este patógeno en comparación con los países en los que se han llevado a cabo los estudios mencionados. La OMS ha determinado que el porcentaje de cepas de *Enterococcus faecium* resistentes a vancomicina aisladas en España a partir de muestras invasivas fue del 1,2% en el año 2020, mientras que este mismo porcentaje en Alemania fue del 22,3% (AMR Dashboard (Beta), n.d.).

Por otro lado, Nerandzic también demostró un significativo aumento durante el postratamiento en el número de cultivos de *Candida spp.* positivos, siendo del 29% en pacientes tratados con vancomicina y del 19% en pacientes tratados con fidaxomicina. En nuestro caso, únicamente se analizó la presencia de *C. parapsilosis* y de *C. auris*. Se obtuvieron tres aislamientos de *C. parapsilosis* y en los tres casos se trató de cepas sensibles a fluconazol. Se estima que en España entre el 10 y el 20% de aislados de esta especie son resistentes (Daneshnia et al., 2023).

Al margen de estos estudios sobre la incidencia de VRE y de *Candida spp.* en pacientes con ICD, no se ha encontrado ningún otro análisis de la presencia de patógenos resistentes a betalactámicos, linezolid o colistina en pacientes con ICD. En nuestro estudio, solo se ha producido el aislamiento de microorganismos resistentes a estos antibióticos de forma muy puntual. Lo más llamativo ha sido el total de 10 pacientes que han mostrado colonización por *E. coli* productor de BLEE en sus heces. Fue el

microorganismo más numerosamente aislado en nuestro estudio. La OMS ha informado de que en el año 2020 en España se produjeron un 14,1 % de aislamientos de *E. coli* productor de BLEE a partir de muestras invasivas, lo que es consistente con nuestros datos. (*AMR Dashboard (Beta)*, n.d.).

Con respecto al análisis complementario llevado a cabo, aquellas personas que mostraron un cultivo negativo de bacterias gramnegativas en la placa de agar MacConkey poseerán un microbioma considerablemente alterado. El crecimiento en cultivo de bacterias gramnegativas es un marcador asociado a un microbioma menos alterado, debido a que estos microorganismos son fácilmente cultivables y cualquier persona sana mostraría crecimiento de estos. Concretamente, un mayor número de personas tratadas con fidaxomicina mostraron crecimiento de gramnegativos, lo que indica que estos pacientes poseerán un menor grado de disbiosis que los tratados con vancomicina. El valor-p no mostró diferencias lo suficientemente significativas con respecto a los pacientes tratados con vancomicina, pero esto se podría deberse a que solo se analizaron 14 pacientes tratados con fidaxomicina. Si se ampliase el tamaño muestral seguramente los valores pasarían a mostrar significaciones más notorias. De los cultivos de grampositivas no se pueden sacar destacables conclusiones puesto que estos no permitieron el crecimiento de grampositivas anaerobias.

Nuestra hipótesis no pudo ser validada, ya que no se ha encontrado suficiente evidencia en nuestro medio de que la vancomicina promueva la selección de microorganismos resistentes en mayor medida que la fidaxomicina. Los resultados muestran una ausencia de relación entre el tratamiento elegido y la selección de microorganismos resistentes, principalmente debido a que no ha habido suficientes aislamientos de patógenos como para establecer una posible relación entre ambas variables.

Por último, es necesario puntualizar las limitaciones del estudio llevado a cabo. En primer lugar, destaca la diferencia entre el número de pacientes que optaban a participar en el análisis (290 pacientes), frente al número de ellos que finalmente pudieron ser incluidos (88 pacientes). Solo se disponía de la totalidad de las muestras del 30% de los pacientes. Los estudios similares llevados a cabo hasta el momento contaban con una muestra de aproximadamente 100 personas, por lo que este análisis tenía el potencial de ser el que más individuos había incluido hasta la fecha. Sin embargo, llevar a cabo un seguimiento de los pacientes con ICD no es sencillo. La coordinación entre la multitud de hospitales participantes tampoco es simple. Es fácil que se produzca la pérdida de muestras o que diversos factores no permitan llevar a cabo un perfecto seguimiento del paciente, perdiendo información durante el proceso. Por otro lado, lo ideal hubiese sido poseer un control positivo para analizar la prevalencia de los microorganismos resistentes estudiados en pacientes con otras afecciones no-ICD. También hubiese sido interesante realizar la siembra de cada muestra por triplicado, para asegurar los resultados y evitar posibles sesgos durante la ejecución de los experimentos.

El principal factor limitante que ha impedido la observación de diferencias significativas entre ambos tratamientos ha sido la diferencia entre el número de pacientes incluidos en este estudio tratados con vancomicina y el número de ellos que habían sido tratados con fidaxomicina. Únicamente se han podido comparar 74 pacientes tratados con vancomicina con 14 tratados con fidaxomicina. Esto se debe a que la significativa diferencia de precio entre ambos tratamientos da lugar a que la mayoría de los pacientes sean tratados con vancomicina. Por ello, lo ideal sería intentar incorporar a este estudio nuevos pacientes tratados con fidaxomicina.

7. CONCLUSIONES

- No se ha podido validar, en pacientes tratados de ICD en la Comunidad Valencia y Andalucía, la hipótesis de que la vancomicina sea un fármaco con mayor capacidad de selección de microorganismos resistentes que la fidaxomicina.
- El aislamiento de microorganismos resistentes no ha sido frecuente durante este estudio, lo que podría indicar que no existe una alta prevalencia de estos entre los pacientes con ICD en nuestro medio.
- El microorganismo resistente de mayor incidencia en esta cohorte fue *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido. Sin embargo, no se encontró una asociación significativa entre la presencia de este microorganismo y haber recibido tratamiento con vancomicina.
- Una mayor proporción de pacientes tratados con fidaxomicina mostró presencia de bacterias gramnegativas cultivables, lo cual puede ser asociado a una menor alteración del microbioma.

8. PROYECCIÓN FUTURA

Existen varios aspectos de este estudio en los que se podría profundizar en un futuro. En primer lugar, se debe tratar de ampliar el tamaño muestral de este análisis mediante el reclutamiento de nuevos pacientes con ICD. Sería interesante incluir una mayor cantidad de pacientes tratados con fidaxomicina para obtener unos resultados más representativos y con mayor significación. En caso de que en futuros estudios se aislase un mayor número de patógenos, sería fructífero analizar cuál es el motivo genético de su resistencia. Por otro lado, un análisis cuantitativo podría ser enriquecedor para este estudio. Puesto que en esta ocasión únicamente se han aplicado metodologías de carácter cualitativo, no se ha determinado la concentración bacteriana de patógenos resistentes en distintas muestras. Esto podría ser muy útil a la hora de estudiar la influencia de la vancomicina sobre la proliferación de patógenos

que ya se encontraban en el microbioma del paciente de forma previa a la aplicación del tratamiento para la ICD. Por último, podría ser de gran interés llevar a cabo este estudio en otras regiones de España y con nuevas cohortes para poder llegar a conclusiones más sólidas. Debido a que el tratamiento con fidaxomicina posee un precio notablemente superior, se debe fundamentar de forma consolidada la inversión sanitaria en este recurso. Se debería seguir profundizando en esta investigación para ayudar a los clínicos a determinar con mayor precisión qué tratamiento es óptimo aplicar en cada caso de infección por *Clostridioides difficile*.



9. BIBLIOGRAFÍA

- Al-Nassir, W. N., Sethi, A. K., Li, Y., Pultz, M. J., Riggs, M. M., & Donskey, C. J. (2008). Both Oral Metronidazole and Oral Vancomycin Promote Persistent Overgrowth of Vancomycin-Resistant Enterococci during Treatment of *Clostridium difficile*-Associated Disease. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *52*(7), 2403–2406. <https://doi.org/10.1128/AAC.00090-08>
- AMR Dashboard (beta). (s. f.). <https://worldhealthorg.shinyapps.io/WHO-AMR-Dashboard-main/>
- Barantsevich, N., & Barantsevich, E. (2022). Diagnosis and Treatment of Invasive Candidiasis. *Antibiotics*, *11*(6), 718. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11060718>
- Buddle, J. E., & Fagan, R. P. (2023). Pathogenicity and virulence of *Clostridioides difficile*. *Virulence*, *14*(1). <https://doi.org/10.1080/21505594.2022.2150452>
- Cantón, R., Akóva, M., Carmeli, Y., Giske, C. G., Glupczynski, Y., Gniadkowski, M., Livermore, D. M., Miriagou, V., Naas, T., Rossolini, G. M., Samuelsen, Ø., Seifert, H., Woodford, N., & Nordmann, P. (2012). Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, *18*(5), 413–431. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03821.x>
- Chandrasekaran, R., & Lacy, D. B. (2017). The role of toxins in *Clostridium difficile* infection. *FEMS Microbiology Reviews*, *41*(6), 723–750. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux048>
- Correa-Martínez, C. L., Hagemeyer, N. C. J., Froböse, N. J., & Kampmeier, S. (2021). Impact of *Clostridioides difficile* Therapy on Nosocomial Acquisition of Vancomycin-Resistant Enterococci. *Pharmaceuticals*, *14*(11), 1066. <https://doi.org/10.3390/ph14111066>
- Crobach, M. J. T., Vernon, J. J., Loo, V. G., Kong, L. Y., Péchiné, S., Wilcox, M. H., & Kuijper, E. J. (2018). Understanding *Clostridium difficile* Colonization. *Clinical Microbiology Reviews*, *31*(2). <https://doi.org/10.1128/CMR.00021-17>
- Daneshnia, F., de Almeida Júnior, J. N., Ilkit, M., Lombardi, L., Perry, A. M., Gao, M., Nobile, C. J., Egger, M., Perlin, D. S., Zhai, B., Hohl, T. M., Gabaldón, T., Colombo, A. L., Hoenigl, M., & Arastehfar, A. (2023). Worldwide emergence of fluconazole-resistant *Candida parapsilosis*: current framework and future research roadmap. *The Lancet Microbe*, *4*(6), e470–e480. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(23\)00067-8](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(23)00067-8)
- Donskey, C. J., Chowdhry, T. K., Hecker, M. T., Hoyer, C. K., Hanrahan, J. A., Hujer, A. M., Hutton-Thomas, R. A., Whalen, C. C., Bonomo, R. A., & Rice, L. B. (2000). Effect of Antibiotic Therapy on the Density of Vancomycin-Resistant Enterococci in the Stool of Colonized Patients. *New England Journal of Medicine*, *343*(26), 1925–1932. <https://doi.org/10.1056/NEJM200012283432604>
- Feuerstadt, P., Louie, T. J., Lashner, B., Wang, E. E. L., Diao, L., Bryant, J. A., Sims, M., Kraft, C. S., Cohen, S. H., Berenson, C. S., Korman, L. Y., Ford, C. B., Litcofsky, K. D., Lombardo, M.-J., Wortman, J. R., Wu, H., Auničič, J. G., McChalicher, C. W. J., Winkler, J. A., ... von Moltke, L. (2022). SER-109, an Oral Microbiome Therapy for Recurrent *Clostridioides difficile* Infection. *New England Journal of Medicine*, *386*(3), 220–229. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2106516>

- Fresnadillo Martínez, M. J., García García, M. I., García Sánchez, E., & García Sánchez, J. E. (2010). Los carbapenems disponibles: Propiedades y diferencias. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28(SUPPL. 2), 53–64. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(10\)70031-8](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(10)70031-8)
- Fridkin, S. K., Edwards, J. R., Courval, J. M., Hill, H., Tenover, F. C., Lawton, R., Gaynes, R. P., & McGowan, J. E. (2001). The Effect of Vancomycin and Third-Generation Cephalosporins on Prevalence of Vancomycin-Resistant Enterococci in 126 U.S. Adult Intensive Care Units. *Annals of Internal Medicine*, 135(3), 175. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-135-3-200108070-00009>
- García, C. S., de la Gándara, M. P., & García, F. J. C. (2010). Betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias distintas de *Escherichia coli* y *Klebsiella*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28(SUPPL. 1), 12–18. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(10\)70003-3](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(10)70003-3)
- Goldstein, E. J. C., Babakhani, F., & Citron, D. M. (2012). Antimicrobial Activities of Fidaxomicin. *Clinical Infectious Diseases*, 55(suppl_2), S143–S148. <https://doi.org/10.1093/cid/cis339>
- Hashemian, S. M., Farhadi, T., & Ganjparvar, M. (2018). Linezolid: a review of its properties, function, and use in critical care. *Drug Design, Development and Therapy*, Volume 12, 1759–1767. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S164515>
- Khanna, S., Pardi, D. S., Aronson, S. L., Kammer, P. P., Orenstein, R., St Sauver, J. L., Harmsen, S. W., & Zinsmeister, A. R. (2012). The Epidemiology of Community-Acquired *Clostridium difficile* Infection: A Population-Based Study. *American Journal of Gastroenterology*, 107(1), 89–95. <https://doi.org/10.1038/ajg.2011.398>
- Kordus, S. L., Thomas, A. K., & Lacy, D. B. (2022). *Clostridioides difficile* toxins: mechanisms of action and antitoxin therapeutics. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 20, Issue 5, pp. 285–298). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00660-2>
- Kunishima, H., Ishibashi, N., Wada, K., Oka, K., Takahashi, M., Yamasaki, Y., Aoyagi, T., Takemura, H., Kitagawa, M., & Kaku, M. (2019). The effect of gut microbiota and probiotic organisms on the properties of extended spectrum beta-lactamase producing and carbapenem resistant Enterobacteriaceae including growth, beta-lactamase activity and gene transmissibility. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 25(11), 894–900. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2019.04.021>
- Lakhundi, S., & Zhang, K. (2018). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(4). <https://doi.org/10.1128/CMR.00020-18>
- Lepe, J. A., & Martínez-Martínez, L. (2022). Mecanismos de resistencia en bacterias gramnegativas. *Medicina Intensiva*, 46(7), 392–402. <https://doi.org/10.1016/j.medin.2022.02.004>
- Lim, S. C., Knight, D. R., & Riley, T. V. (2020). *Clostridium difficile* and One Health. *Clinical Microbiology and Infection*, 26(7), 857–863. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.10.023>
- Louie, T. J., Miller, M. A., Mullane, K. M., Weiss, K., Lentnek, A., Golan, Y., Gorbach, S., Sears, P., & Shue, Y.-K. (2011). Fidaxomicin versus Vancomycin for *Clostridium difficile* Infection. *New England Journal of Medicine*, 364(5), 422–431. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0910812>

- Martinez-Martinez, L., Cantón Spain, R., Stefani, S., Skov, R., Glupczynski, Y., Nordmann, P., Wootton, M., Miriagou, V., & Skov Simonsen, G. (2017). *EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance*.
- Melgarejo Touchet, N. L. (2022). Colistin Resistance in Enterobacterales. *Revista de Salud Publica Del Paraguay*, 12(2), 48–61. <https://doi.org/10.18004/rspp.diciembre.48>
- Merchante, N., Herrero, R., Valverde-Fredet, M. D., Rodríguez-Fernández, M., Pinargote, H., Martínez-Marcos, F. J., Gil-Anguita, C., García-López, M., Tasiás Pitarch, M., Abril López De Medrano, V., Navarrete Lorite, M. N., Gómez-Ayerbe, C., León, E., González-De La Aleja, P., Ruiz Castillo, A., Aller, A. I., Rodríguez, J. C., Ternero Fonseca, J., Corzo, J. E., ... Merino, E. (2023). Role of previous systemic antibiotic therapy on the probability of recurrence after an initial episode of *Clostridioides difficile* infection treated with vancomycin. *JAC-Antimicrobial Resistance*, 5(2). <https://doi.org/10.1093/jacamr/dlad033>
- Miranda García, M. C. (2013). Escherichia coli portador de betalactamasas de espectro extendido: resistencia. *Sanidad Militar*, 69(4), 244–248. <https://doi.org/10.4321/S1887-85712013000400003>
- Mullane, K. M., Miller, M. A., Weiss, K., Lentnek, A., Golan, Y., Sears, P. S., Shue, Y.-K., Louie, T. J., & Gorbach, S. L. (2011). Efficacy of Fidaxomicin Versus Vancomycin as Therapy for Clostridium difficile Infection in Individuals Taking Concomitant Antibiotics for Other Concurrent Infections. *Clinical Infectious Diseases*, 53(5), 440–447. <https://doi.org/10.1093/cid/cir404>
- Nerandzic, M. M., Mullane, K., Miller, M. A., Babakhani, F., & Donskey, C. J. (2012). Reduced acquisition and overgrowth of vancomycin-resistant enterococci and Candida species in patients treated with fidaxomicin versus vancomycin for clostridium difficile infection. *Clinical Infectious Diseases*, 55(SUPPL.2). <https://doi.org/10.1093/cid/cis440>
- Ofori, E., Ramai, D., Dhawan, M., Mustafa, F., Gasperino, J., & Reddy, M. (2018). Community-acquired Clostridium difficile: epidemiology, ribotype, risk factors, hospital and intensive care unit outcomes, and current and emerging therapies. In *Journal of Hospital Infection* (Vol. 99, Issue 4, pp. 436–442). W.B. Saunders Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2018.01.015>
- Pallotta, F., Viale, P., & Barchiesi, F. (2023). Candida auris: the new fungal threat. *Le Infezioni in Medicina*, 31(3), 323–328. <https://doi.org/10.53854/liim-3103-6>
- Ray, P., Pandey, U., & Aich, P. (2021). Comparative analysis of beneficial effects of vancomycin treatment on Th1- and Th2-biased mice and the role of gut microbiota. *Journal of Applied Microbiology*, 130(4), 1337–1356. <https://doi.org/10.1111/jam.14853>
- Rivera, A., Larrosa, N., Mirelis, B., & Navarro, F. (2014). Importancia de los controles de calidad para la detección de la resistencia a antibióticos β -lactámicos en enterobacterias. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 32, 30–36. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(14\)70147-8](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(14)70147-8)
- Suárez, C., & Gudíol, F. (2009). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(2), 116–129. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.12.001>
- Tortorano, A. M., Prigitano, A., Morroni, G., Brescini, L., & Barchiesi, F. (2021). Candidemia: Evolution of Drug Resistance and Novel Therapeutic Approaches. *Infection and Drug Resistance*, Volume 14, 5543–5553. <https://doi.org/10.2147/IDR.S274872>

- Tzouveleakis, L. S., Markogiannakis, A., Psychogiou, M., Tassios, P. T., & Daikos, G. L. (2012). Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and Other Enterobacteriaceae: an Evolving Crisis of Global Dimensions. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(4), 682–707. <https://doi.org/10.1128/CMR.05035-11>
- van Prehn, J., Reigadas, E., Vogelzang, E. H., Bouza, E., Hristea, A., Guery, B., Krutova, M., Norén, T., Allerberger, F., Coia, J. E., Goorhuis, A., van Rossen, T. M., Ooijevaar, R. E., Burns, K., Scharvik Olesen, B. R., Tschudin-Sutter, S., Wilcox, M. H., Vehreschild, M. J. G. T., Fitzpatrick, F., & Kuijper, E. J. (2021). European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: 2021 update on the treatment guidance document for *Clostridioides difficile* infection in adults. *Clinical Microbiology and Infection*, 27, S1–S21. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.09.038>
- Venugopal, A. A., & Johnson, S. (2012). Fidaxomicin: A Novel Macrocyclic Antibiotic Approved for Treatment of *Clostridium difficile* Infection. *Clinical Infectious Diseases*, 54(4), 568–574. <https://doi.org/10.1093/cid/cir830>
- WHO bacterial priority pathogens list, 2024: Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance.* (2024, mayo 17). Who.int; World Health Organization. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461>
- Wuethrich, I., W. Pelzer, B., Khodamoradi, Y., & Vehreschild, M. J. G. T. (2021). The role of the human gut microbiota in colonization and infection with multidrug-resistant bacteria. *Gut Microbes*, 13(1). <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1911279>
- Zhanel, G. G., Walkty, A. J., & Karlowsky, J. A. (2015). Fidaxomicin: A Novel Agent for the Treatment of *Clostridium difficile* Infection. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 26(6), 305–312. <https://doi.org/10.1155/2015/934594>