

Evaluación de la resistencia antibiótica de Clostridioides difficile

TRABAJO DE FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN VEGETAL Y MICROBIOLOGÍA
UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ

AUTORA: ELIA GOSÁLBEZ IBÁÑEZ

TUTOR: MARIO LÓPEZ PÉREZ

COTUTORES: JUAN CARLOS RODRÍGUEZ DÍAZ

CURSO ACADÉMICO: 2024-2025

CONVOCATORIA: FEBRERO 2025

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentaje
µl	Microlitros
A	
Ala	Alanina
ARN	Ácido ribonucleico
ARNt	Ácido ribonucleico transferente
C	
Caco-2	Células derivadas de adenocarcinoma de colon humano
<i>C. difficile</i>	<i>Clostridioides difficile</i>
CDT	Toxina Binaria
CI	Ciprofloxacina
CLSI	Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio
CMI	Concentración mínima inhibitoria
E	
ECOFF	(Epidemiological Cut-Off Value) Valor de corte epidemiológico
EUCAST	Comité Europeo de Pruebas de Sensibilidad a Antibióticos
F	
FDX	Fidaxomicina
G	
GHD	Glutamato deshidrogenasa
H	
h	Hora
I	
IAAS	Infecciones asociadas a la atención en salud
IAC-CD	Infecciones adquiridas en la comunidad por <i>Clostridioides difficile</i>
ICD	Infección por <i>Clostridioides difficile</i>
IRAS-CD	Infecciones asociadas a la atención sanitaria por <i>Clostridioides difficile</i>
L	
L	litro
M	

ml	Militros
MP	Meropenem
MZ	Metronidazol
P	
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PTZ	Piperacilina – tazobactam
R	
RT027	Ribotipo 027
S	
SCS (placas)	Placas agar Schaedler + sangre de oveja al 5%
T	
TcdA	Toxina A
TcdB	Toxina B
TGC	Tigeciclina
TMF	Trasplante de microbiota fecal
TZ	Ceftriaxona
U	
UV	Ultravioleta
V	
VA	Vancomicina
VRE	Enterococci resistentes a Vancomicina



RESUMEN

Clostridioides difficile (*C. difficile*) es una bacteria anaerobia formadora de esporas y la principal responsable de la diarrea nosocomial, lo que la convierte en un problema global de salud pública. Este estudio se centra en la evaluación de la resistencia y sensibilidad de la bacteria frente a diversos antibióticos. En el marco de un proyecto multicéntrico se analizaron cepas aisladas de pacientes en 9 hospitales de la Comunidad Valenciana y Andalucía. Se llevaron a cabo antibiogramas para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de antibióticos utilizados tanto en el tratamiento directo de infecciones por *C. difficile* como en aquellos que favorecen su proliferación. Los resultados obtenidos se analizaron siguiendo los puntos de corte clínicos y epidemiológicos (ECOFF) establecidos por la EUCAST y CLSI. Los antibióticos terapéuticos como fidaxomicina y vancomicina mostraron buena actividad frente a *C. difficile*, con bajas tasas de resistencia, destacando la fidaxomicina como la opción más eficaz. Metronidazol sigue siendo efectivo, pero su uso debería ser secundario debido a posibles efectos adversos. Tigeciclina presentó la CMI más baja; sin embargo, la falta de puntos de corte clínicos impide evaluar su resistencia con precisión. En contraste, los antibióticos no específicos para *C. difficile* presentan valores más elevados de CMI y mayores tasas de resistencia, especialmente ciprofloxacina y ceftriaxona, lo que podría favorecer la disbiosis intestinal y el desarrollo de *C. difficile*.

PALABRAS CLAVE: *Clostridioides difficile*, resistencia antimicrobiana, CMI, EUCAST, CLSI, ECOFF.

ABSTRACT:

Clostridioides difficile (*C. difficile*) is a spore-forming anaerobic bacterium and the main cause of nosocomial diarrhea, making it a global public health concern. This study focuses on evaluating the resistance and susceptibility of the bacterium to various antibiotics. As part of a multicenter project, strains isolated from patients in 9 hospitals in the Valencian Community and Andalucía were analyzed. Antibiotic susceptibility tests were conducted to determine the minimum inhibitory concentration (CMI) of antibiotics used both in the direct treatment of *C. difficile* infections and those that promote its proliferation. The results were analyzed following the clinical and epidemiological cutoff values (ECOFF) established by EUCAST and CLSI. Therapeutic antibiotics such as fidaxomicin and vancomycin showed good activity against *C. difficile*, with low resistance rates, highlighting fidaxomicin as the most effective option. Metronidazole remains effective, but its use should be secondary due to potential adverse effects. Tigecycline showed the lowest MIC; however, the lack of clinical cutoff values prevents an accurate assessment of its resistance. In contrast, antibiotics not specifically targeting *C. difficile* showed higher MIC values and higher resistance rates, especially ciprofloxacin and ceftriaxone, which could promote intestinal dysbiosis and *C. difficile* development.

KEY WORDS: *Clostridioides difficile*, antimicrobial resistance, CMI, EUCAST, CLSI, ECOFF.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	8
1.1. <i>Caracterización de Clostridioides difficile</i>	8
1.2. <i>Desarrollo de Clostridioides difficile</i>	8
1.3. <i>Toxinas y mecanismos de patogénesis</i>	10
1.4. <i>Epidemiología: Ribotipos y su impacto en la enfermedad</i>	11
1.5. <i>Prevalencia de las infecciones de Clostridioides difficile</i>	11
1.5.1. <i>España</i>	11
1.5.2. <i>Nivel mundial</i>	11
1.6. <i>Diagnóstico de la infección por Clostridioides difficile</i>	12
1.7. <i>Antibióticos</i>	13
1.7.1.1. <i>Grupo 1. Antibióticos utilizados para el tratamiento directo de la infección por Clostridioides difficile</i>	13
1.7.1.2. <i>Grupo 2. Antibióticos no específicos para ICD</i>	14
1.7.2. <i>Relación de las ICD con el uso prolongado de antibióticos</i>	15
1.7.3. <i>Desafíos relacionados con la resistencia</i>	15
1.7.4. <i>Alternativas terapéuticas</i>	16
2. OBJETIVO	17
3. MATERIALES Y MÉTODOS	18
3.1. <i>Cepas de Clostridioides difficile</i>	18
3.2. <i>Antibióticos</i>	18
3.3. <i>Material de laboratorio</i>	19
3.4. <i>Equipo y maquinaria</i>	19
3.5. <i>Diseño experimental</i>	19
3.5.1. <i>Preparación de las muestras</i>	20
3.5.2. <i>Aislamiento de colonias</i>	20
3.5.3. <i>Preparación del cultivo para el antibiograma</i>	20
3.5.4. <i>Antibiograma</i>	21
3.5.5. <i>Datos y análisis</i>	23
4. RESULTADOS	25
5. DISCUSIÓN	31
6. CONCLUSIÓN	37
7. FUTURAS PERSPECTIVAS	37
8. BIBLIOGRAFÍA	38

FIGURAS

<i>Figura 1. Siembra de C. difficile en placas SCS.</i>	8
<i>Figura 2. Esquema del desarrollo de C.difficile en el tracto digestivo (2).</i>	9
<i>Figura 3. Esquema del ciclo de vida y los mecanismos patogénicos de C. difficile (1).</i>	10
<i>Figura 4. Esquema del algoritmo de 2 pasos que se utiliza para el diagnóstico de ICD (15).</i>	13
<i>Figura 5. Imagen de una placa de agar-sangre con fidaxomicina en la que se observan las marcas que delimitan la sección en la que se depositará en cada muestra.</i>	18
<i>Figura 6. E-Test comerciales almacenados en la nevera para su posterior uso.</i>	19
<i>Figura 7. Imagen de una placa SCS con un E-Test de ciprofloxacina al que C. difficile mostró resistencia y otro de ceftriaxona en el que se observa un halo de inhibición. El resto de la placa creció en césped.</i>	19
<i>Figura 8. Imagen de una placa SCS con un E-Test de ceftriaxona en la que se observa el halo de inhibición.</i>	19
<i>Figura 9. Colonias crecidas de C. difficile tras su siembra e incubación en condiciones de anaerobiosis en placas específicas para esta bacteria.</i>	20
<i>Figura 10. C. difficile crecida en una placas específica para esta bacteria en la que se observan las colonias seleccionadas para MALDI-TOFF.</i>	20
<i>Figura 11. Resultados del MALDI-TOFF para comprobar que la bacteria que ha crecido es C. difficile. Cada fila es una colonia analizada y a la derecha hay una columna con la bacteria detectada según el perfil proteico, y la puntuación.</i>	20
<i>Figura 12. C. difficile crecida en placas SCS tras 48h en bolsas y condiciones de anaerobiosis.</i>	21
<i>Figura 13. Densitómetro McFarland del que se hacía uso para conseguir una concentración bacteriana igual para cada muestra antes de realizarles la prueba de sensibilidad a los antibióticos.</i>	21
<i>Figura 14. Tubos Falcon en los que se preparaban las concentraciones de muestra para sembrar en los E-Tests y placas de fidaxomicina.</i>	21
<i>Figura 15. E-Test en el que se observa el halo de inhibición de C. difficile al meropenem y resistencia a la ciprofloxacina.</i>	22
<i>Figura 16. Sangre fresca desfibrilada de caballo utilizada para preparar las placas de agar-sangre con fidaxomicina.</i>	22
<i>Figura 17. Imagen de una placa agar-sangre control, es decir, sin fidaxomicina, en la que se observa la distribución de las ocho muestras de los pacientes crecidas.</i>	23
<i>Figura 18. Representación del número de cepas de pacientes de 60 años o más, de menores de 60, mujeres y hombres que han resultado resistentes a cada antibiótico..</i>	28
<i>Figura 19. Representación del número de cepas de pacientes de 60 años o más, de menores de 60, mujeres y hombres que han resultado de sensibilidad intermedia cada antibiótico.</i>	28
<i>Figura 20. Representación del número de cepas de pacientes de 60 años o más, de menores de 60, mujeres y hombres que han resultado sensibles a cada antibiótico.</i>	29
<i>Figura 21. Número de cepas totales del estudio que mostraron resistencia a cada antibiótico. Cada barra está subdividida en colores según a que hospital pertenezcan las muestras halladas resistentes. Para TGC no hay puntos de corte por lo que no se puede hacer dicha clasificación resistente-sensible.</i>	30
<i>Figura 22. Número de cepas totales del estudio que mostraron sensibilidad intermedia a cada antibiótico. Cada barra está subdividida en colores, representando la cantidad de muestras de cada hospital dentro de esta categoría.</i>	30
<i>Figura 23. Número de cepas totales del estudio que se mostraron sensibles a cada antibiótico. Cada barra está subdividida en colores según a que hospital pertenezcan las</i>	31

muestras halladas resistentes. Para TGC no hay puntos de corte por lo que no se puede hacer dicha clasificación resistente-sensible.

TABLAS

<i>Tabla 1. Puntos de corte para los diferentes antibióticos según EUCAST (clínicos y ECOFF) y CLSI (26) (27) (28).</i>	24
<i>Tabla 2. Número y porcentaje de muestras sensibles, resistentes e intermedias a cada antibiótico de las 169 muestras estudiadas.</i>	26
<i>Tabla 3. Resultados obtenidos de la CMI50%, CMI90% y porcentaje de resistencia de las muestras de C. difficile.</i>	26



1. INTRODUCCIÓN

1.1. Caracterización de *Clostridioides difficile*

Clostridioides difficile (*C. difficile*) es una bacteria anaerobia Gram-positiva, formadora de esporas y productora de toxinas, reconocida como el principal agente etiológico de diarrea nosocomial en adultos y una de las causas más relevantes de infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS), especialmente en pacientes vulnerables o aquellos que han recibido tratamientos antibióticos prolongados (1) (2). Fue descubierta en 1935 en heces de recién nacidos sanos y fue inicialmente caracterizada como parte de la microbiota intestinal normal, ya que dichos neonatos portaban la bacteria sin desarrollar síntomas debido a su baja tasa de replicación (3). Sin embargo, estudios posteriores revelaron su capacidad de liberar exotoxinas solubles, sugiriendo su potencial patogénico (4). Desde entonces, *C. difficile* ha demostrado ser responsable de una amplia gama de manifestaciones clínicas que van desde cuadros leves de diarrea hasta complicaciones graves como la colitis pseudomembranosa y, en algunos casos, megacolon tóxico, una condición potencialmente mortal si no se trata de forma oportuna (3).

Desde los inicios, *C. difficile* ha sido difícil de aislar debido a que es muy poco competitiva, lo que facilita el sobrecrecimiento de otros microorganismos. Además, su anaerobiosis estricta exige unas características muy específicas para su desarrollo y su crecimiento es relativamente lento (de unos 40-70 minutos) en comparación con otros miembros del género *Clostridium* (5). No obstante, los avances en medios selectivos han facilitado su aislamiento a partir de muestras fecales y ambientales. Para ello, se incorporan al medio antibióticos como la cefoxitina o la cicloserina, a los cuales la bacteria es intrínsecamente resistente, así como carbohidratos como la fructosa y el manitol. Los aminoácidos son metabolizados por la bacteria mediante las reacciones de Stickland, esenciales para sus vías biosintéticas y obtención de energía, y los azúcares los fermenta pudiendo liberar compuestos alcalinos que modifican el pH del medio, lo que facilita su detección y ayuda a diferenciarla de otras bacterias en muestras clínicas (5). Otro componente clave en este ámbito es el taurocolato de sodio, un ácido biliar útil para la germinación de las endosporas de *C. difficile* (5).



Figura 1. Siembra de *C. difficile* en placas SCS.

El crecimiento de *C. difficile* es visible en medios líquidos y en agar, generalmente en las primeras 48 horas de incubación, al metabolizar nutrientes en el medio de cultivo como los mencionados anteriormente y presenta un olor distintivo similar a “estiércol de caballo” debido a la fermentación de tirosina en *p*-cresol. También emite fluorescencia bajo UV, por lo que en medios específicos es de fácil detección. Si bien, la morfología de *C. difficile* en medios sólidos como el agar sangre al 5% ya es distintiva por el aspecto irregular, tipo “vidrio esmerilado” que se distingue visualmente en sus colonias (Figura 1) (3).

1.2. Desarrollo de *Clostridioides difficile*

La transmisión de *C. difficile* es vía fecal-oral y, en circunstancias saludables, la mayoría de las formas vegetativas ingeridas son eliminadas en el estómago gracias a los ácidos biliares

secundarios y los metabolitos producidos por las bacterias comensales. Estas actúan como barrera natural, dificultando que produzcan la infección, ya que solo un 1% del inóculo llega al intestino delgado (6). Sin embargo, son sus esporas las responsables de que la transmisión de este patógeno sea altamente contagiosa. Estas son resistentes a la acidez del estómago y tras su entrada vía oral al organismo pueden germinar en el intestino delgado gracias a las sales biliares primarias sintetizadas en el hígado y secretadas en el tracto gastrointestinal (Figura 2) (2,6).

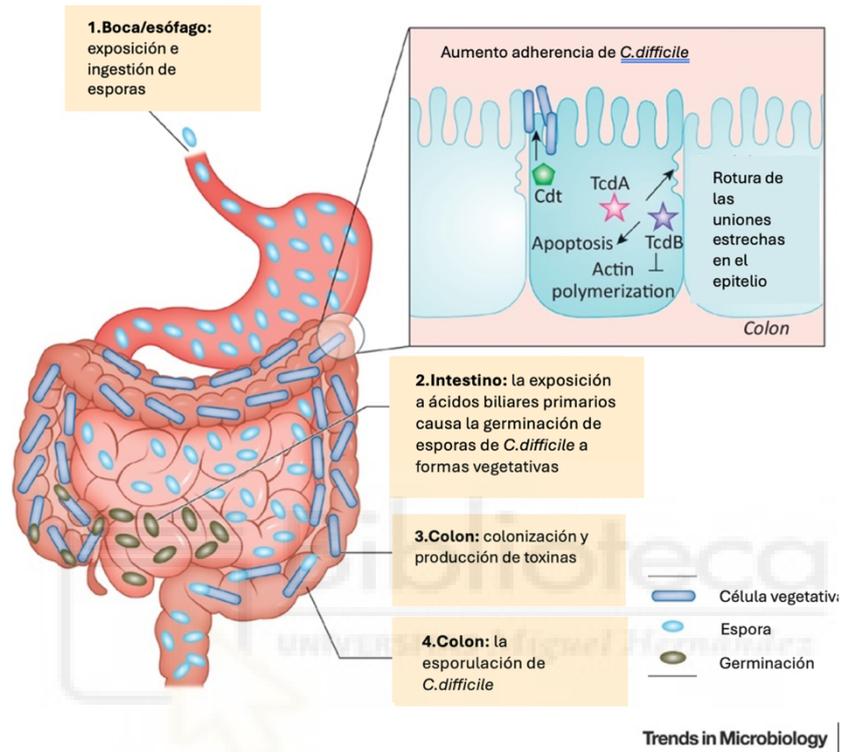


Figura 2. Esquema del desarrollo de *C. difficile* en el tracto digestivo (2).

Una vez activas pueden proliferar y expandirse en el ambiente anaerobio del ciego y colon, colonizando la mucosa. Además, bajo ciertas condiciones ambientales liberan toxinas capaces de modular numerosas características fisiológicas provocando inflamación, daño en el epitelio intestinal o diarrea. A nivel celular, causan la desregulación del movimiento y la polaridad celular de forma que las células pierden su orientación y capacidad de organizarse adecuadamente, afectando a su función normal, además de desestabilizar la dinámica de los microtúbulos y por tanto su capacidad de mantener la forma de la célula y el transporte interno. También puede influir en la progresión del ciclo celular. Todo esto lleva al debilitamiento de las uniones celulares, dañando la barrera intestinal y resultando en la acumulación de neutrófilos en el área afectada que generará dicha inflamación y contribuirá al daño tisular (Figura 3) (2). Esta colonización es muy común en casos donde la microbiota normal ha sido alterada (por ejemplo, por la toma de antibióticos durante largos periodos), ya que los ácidos biliares secundarios y los productos metabólicos de las bacterias comensales que inhiben el crecimiento de las formas vegetativas se reducen durante el tratamiento con estos (2). Finalmente, *C. difficile* puede esporular en el colon, formando

nuevas esporas que son eliminadas del cuerpo a través de la heces, perpetuando el ciclo infeccioso (2).

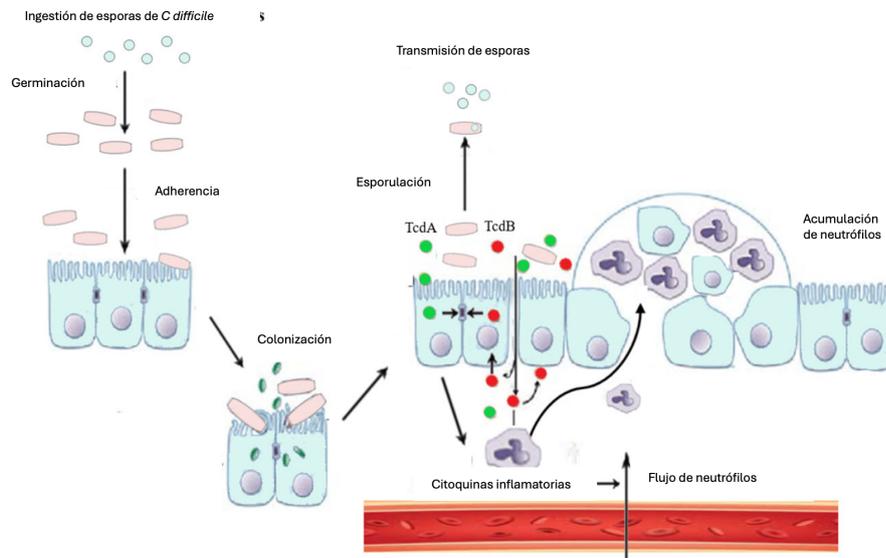


Figura 3. Esquema del ciclo de vida y los mecanismos patogénicos de *C. difficile* (1).

1.3. Toxinas y mecanismos de patogénesis

La patogénesis de *C. difficile* está íntimamente ligada a su capacidad para producir exotoxinas, principalmente la Toxina A (TcdA), una enterotoxina y la Toxina B (TcdB) considerada citotóxica. Son liberadas como respuesta a una gran variedad de estímulos ambientales, principalmente al final de la fase de crecimiento exponencial y durante la fase estacionaria del desarrollo de la bacteria (7).

TcdA y TcdB son glucosiltransferasas cuya actividad es capaz de alterar la estructura del citoesqueleto de las células epiteliales intestinales, descomponiendo las uniones estrechas entre estas (7). Esto favorece la adhesión de las células bacterianas vegetativas al epitelio del huésped, además de desencadenar una respuesta inmunitaria que incluye la liberación de citocinas y quimiocinas proinflamatorias. Estas activan y atraen a células como neutrófilos, mastocitos, monocitos y células linfoides innatas que tienen un papel clave en la muestra de síntomas clínicos por ICD (7). Así, la liberación de histamina por los mastocitos es un ejemplo de ello, ya que esta incrementa la permeabilidad intestinal, que deriva en una gran pérdida de líquidos hacia el lumen intestinal y provoca síntomas como la diarrea intensa, calambres abdominales o deshidratación (4).

Además, algunas cepas producen una tercera toxina, la Toxina Binaria (CDT), que, aunque no está presente en todas las cepas, podría actuar en sinergia con las otras toxinas y potenciar la patogenicidad de la bacteria al aumentar la adherencia de la bacteria al epitelio, y, por ende, su potencial virulento (4). Desde su descubrimiento, se ha observado que *C. difficile* es capaz de colonizar y causar infección en múltiples tipos de huéspedes, incluidos los humanos y algunos mamíferos, lo cual resalta su capacidad adaptativa y de diseminación (4,8).

En cuanto a su morfología, una característica clave de *C. difficile* es su flagelo. Generalmente la capacidad de las bacterias de moverse gracias a este les concede cierta ventaja

en términos de supervivencia ya que les permite desplazarse y encontrar nutrientes. Sin embargo, en el caso de *C. difficile* la relación es más compleja debido a su naturaleza anaeróbica (9). Estudios recientes sugieren que este desempeña un papel importante en la patogenicidad de la bacteria más allá del simple movimiento, influyendo en la adhesión a las células del huésped y colonización del intestino, ya que se han observado mutantes flagelares que aunque presentan menos movilidad muestran mayor adhesión (9). De esta forma, los flagelos podrían actuar como “adhesinas” permitiendo la adherencia de la bacteria a las células intestinales y presentar propiedades inmunomoduladoras que influyen en cómo el sistema inmunológico responde a la infección, agravando la enfermedad (9).

1.4. Epidemiología: Ribotipos y su impacto en la enfermedad

Desde principio de siglo, la prevalencia de ICD ha mostrado un notable incremento en todo el mundo (10). Se han identificado diversos ribotipos de *C. difficile* con diferencias en su nivel de virulencia y capacidad de producir toxinas. En particular, el ribotipo 027 (RT027) se ha identificado como un ribotipo hipervirulento (10). Emergió en Canadá en 2003 y se extendió a Europa, siendo asociado a brotes epidémicos debido a su capacidad de producir niveles significativamente elevados de TcdA y TcdB, lo que aumenta tanto la severidad de la enfermedad como la mortalidad (11). Estos ribotipos pueden diferenciarse mediante técnicas como la ribotipificación por PCR y toxinotipificación, métodos utilizados para evaluar la variabilidad genética y el potencial patogénico de distintas cepas en diferentes regiones geográficas.

1.5. Prevalencia de las infecciones de *C. difficile*

1.5.1. España

El aumento de ICD ha generado preocupación debido a su impacto en la morbilidad y mortalidad en hospitales, así como por su alta tasa de recurrencia. En España, entre 2012 y 2019, las infecciones pasaron del 14,1% al 35,9% por cada 10,000 pacientes hospitalizados, con casi dos tercios de los casos de origen nosocomial, aunque el aumento ha sido tanto en infecciones asociadas a la atención sanitaria (IRAS-CD) como en comunitarias (IAC-CD) (12). Los principales afectados son los pacientes mayores de 50 años y personas con condiciones preexistentes como neoplasias, inmunodeficiencia, neutropenia, cirrosis o insuficiencia renal crónica, lo que las hace especialmente vulnerables (12).

1.5.2. A nivel mundial

Los datos de vigilancia muestran un aumento global en la incidencia de IAC-CD. Actualmente, estos representan el 41 % de los casos de CDI en Estados Unidos, el 30 % en Australia y el 14 % en Europa (10).

A nivel Europeo, una encuesta realizada en 2022 reporta una incidencia de CDI con una mayoría de casos asociados a la atención sanitaria (60.9%) y una media de 3.48 casos por cada 10,000 días-paciente (esto significa que por cada 10,000 días que los pacientes estuvieron en el hospital, se registraron 3.48 casos) (13). Además, se observó una mayor heterogeneidad en los

ribotipos ya que el ribotipo dominante RT027 pasó a ser el tercero más reportado, mientras que ribotipos asociados al ganado, como el 014 y el 078, emergieron como patógenos más virulentos, siendo responsables del 16.8% y entre el 7% y 11% de los casos, respectivamente (13). Las prevalencias más altas del ribotipo 027 se hallaron en Hungría, Polonia y Eslovenia con un 67.6%, 63% y 44.4% respectivamente. El resto de los países mostraron proporciones menores (2.5% aproximadamente) (13). Estos datos indican un aumento en la incidencia respecto a 2020, cuando se reportaron 2,58 casos por cada 10.000 días-paciente (13). Es importante señalar que, en 2020, la pandemia COVID-19 afectó a la epidemiología de ICD, alterando el comportamiento de los paciente y las prácticas de control de infecciones. Pero también existen datos de 2016 y 2017, donde la incidencia fue de 2,87 y 1,91 casos por cada 10.000 días-paciente, respectivamente, cifras igualmente inferiores (13).

En Estados Unidos, según el informe anual del programa de infecciones emergentes, la incidencia global de ICD en 2020 se situó en 101.3 casos por cada 100,000 personas (14). Los casos asociados a la comunidad fueron ligeramente más frecuentes, alcanzando 51.2 casos por cada 100,000 personas, en comparación con los casos relacionados con la atención sanitaria, que representaron 50.1 casos por cada 100,000 personas (14) Se observó que la incidencia de ICD aumentaba con la edad y era más elevada en mujeres que en hombres. Por otro lado, un porcentaje significativo de los pacientes presentaba condiciones subyacentes, ya que el 40% tenía un índice de comorbilidad de Charlson ≥ 2 . Además, el uso de antibióticos en las 12 semanas previas fue reportado en el 61% de los casos. La mayoría de los pacientes (84%) recibió tratamiento, siendo la vancomicina el fármaco más utilizado. Las complicaciones graves asociadas a la ICD, como megacolon tóxico e íleo, fueron poco comunes (14).

1.6. Diagnóstico de ICD

El diagnóstico de ICD se realiza mediante el algoritmo de dos pasos que combina diferentes pruebas para garantizar precisión y fiabilidad. Como se muestra en la Figura 4 , el primer paso consiste en una prueba inicial de alta sensibilidad, como la detección de glutamato deshidrogenasa (GDH). Esta enzima es producida en grandes cantidades por cepas de *C. difficile* tanto toxigénicas como no toxigénicas, lo que la convierte en un marcador inicial ideal para ICD debido a su elevada sensibilidad, de aproximadamente un 90%, siendo así un método fiable. Alternativamente, también se pueden emplear pruebas de amplificación de ácidos nucleicos, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para identificar rápidamente la presencia del patógeno (15). Sin embargo, estas pruebas iniciales no distinguen entre cepas productoras de toxinas, donde se confirmaría la infección activa, y no toxigénicas, por lo que un resultado positivo debe confirmarse mediante una segunda prueba específica para la detección de toxinas (TcdA/TcdB) utilizando técnicas de inmunoensayo o análisis molecular por PCR. Este enfoque permite confirmar una infección activa y asegura un diagnóstico preciso, evitando posibles casos de sobretratamiento (15).

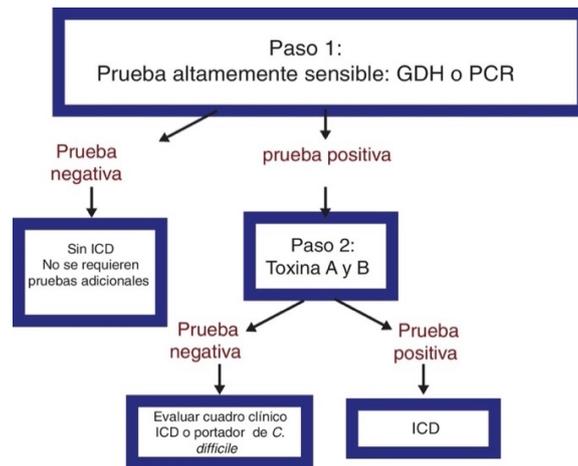


Figura 4. Esquema del algoritmo de 2 pasos que se utiliza para el diagnóstico de ICD (15).

1.7. Antibióticos

El abordaje terapéutico de *C. difficile* se determina en función de la gravedad del cuadro clínico. En pacientes que presentan un primer episodio de infección sin antecedentes de recurrencia, la primera línea de tratamiento es vancomicina, administrada a una dosis de 125 mg cada 6 horas por vía oral o a través de una sonda nasogástrica (16). Como alternativa también de primera línea, se puede emplear fidaxomicina, con una pauta de 200 mg cada 12 horas vía oral (16). En casos leves donde no se disponga de vancomicina ni fidaxomicina, se recomienda el uso de metronidazol, con una dosis de 500 mg cada 8 horas también vía oral o vía intravenosa con la misma dosificación si la administración oral no es posible (16). En pacientes con insuficiencia hepática o renal grave, la dosis de metronidazol debe reducirse a 250 mg cada 8 horas (16). Independientemente del antibiótico utilizado, la duración del tratamiento para un primer episodio de ICD es de 10 días. No obstante, en casos donde persista la sintomatología sin una resolución completa, el tratamiento puede extenderse hasta 14 días (16).

El manejo de la ICD fulminante o complicada difiere del abordaje convencional. Se considera fulminante cuando el paciente presenta criterios de gravedad junto con hipotensión, shock, íleo o megacolon tóxico(16). En estos casos, el tratamiento de elección es vancomicina a dosis elevada (500 mg cada 6 horas por vía oral), en combinación con metronidazol intravenoso a 500 mg cada 8 horas (16). Si la administración oral de vancomicina no es posible, se recomienda la vía rectal, con una dosificación de 500 mg cada 6 horas (16). En pacientes que no responden a este régimen, se han propuesto enfoques alternativos como la tigeciclina oral, en sustitución del metronidazol (16). En casos seleccionados, cuando el tratamiento médico no es efectivo, puede ser necesaria la intervención quirúrgica (16).

1.7.1.1. Grupo 1. Antibióticos utilizados para el tratamiento directo de la infección por *C. difficile*.

Este grupo está compuesto por los antibióticos que se emplean específicamente para combatir la infección activa de *C. difficile*. Los antibióticos principales de este grupo son:

- Vancomicina (VA): Actualmente es el tratamiento de elección en un primer episodio de ICD por vía oral o sonda nasogástrica, y para casos de ICD muy graves, donde se suele aumentar la dosis o combinar con metronidazol (16). La vancomicina es un antibiótico glicopéptido que interfiere en la construcción de la pared celular bacteriana uniéndose al D-Ala-D-Ala terminal de precursores del peptidoglicano bacteriano (18). Alcanza altas concentraciones en el intestino, el principal sitio de infección, motivo por el cual es un tratamiento ideal para los casos complicados de *C. difficile* (16).

- Fidaxomicina (FDX): un macrólido de espectro estrecho que no se absorbe en el tracto gastrointestinal, actuando principalmente en el intestino, donde se concentra en el tratamiento de ICD. Es una opción más reciente, siendo uno de los tratamientos de primera línea y eficaz para reducir las recaídas de la infección (incluso menor que el de la vancomicina, aunque muy similar) debido a su menor impacto sobre la flora intestinal protectora (16). Inhibe la ARN polimerasa de la bacteria al inicio de la transcripción. Su acción limitada a *C. difficile* minimiza el daño en la microbiota intestinal, lo que es crucial para la recuperación y prevención de recurrencias (19).

- Metronidazol (MZ): Utilizado en casos de infección leve por *C. difficile* si no hay vancomicina o fidaxomicina disponible, ya que aunque el metronidazol también es efectivo, los otros dos antibióticos muestran mejor recuperación (16). También es útil en infecciones graves porque alcanza altas concentraciones en el intestino, lugar donde se necesita su efecto (16). Para impedir la reproducción bacteriana, el metronidazol se activa dentro de las bacterias para generar radicales libres que dañan componentes celulares esenciales como el ADN, los metaloclastos de proteínas y los tioles de bajo peso molecular (17). En cuanto a la resistencia de *C. difficile* a este antibiótico, se reportó por primera vez en los 2000 y aunque no tiene cifras significativas, estudios mencionan que está surgiendo debido a múltiples mecanismos genéticos, que incluyen la alteración de rutas metabólicas dependientes del hierro, la presencia de plásmidos con genes de resistencia y mutaciones en genes clave que afectan la activación del fármaco (17).

- Tigeciclina (TGC): Aunque no es una primera elección, tigeciclina es una alternativa valiosa en infecciones graves y resistentes, sobre todo en casos en los que la vancomicina no ha funcionado por sí sola, pudiendo ser combinada con esta (en vez de combinarla con metronidazol) (16). Su mecanismo es de amplio espectro y bloquea la síntesis proteica bacteriana. Al unirse a la subunidad 30S del ribosoma, evita la unión del ARNt y por tanto, la elongación del péptido y su proliferación (20,21).

Los antibióticos de este grupo fueron evaluados para determinar su sensibilidad *in vitro* frente a las cepas de *C. difficile* aisladas en este estudio, un paso esencial para confirmar su efectividad y garantizar que continúan siendo adecuados en el tratamiento de infecciones resistentes.

1.7.1.2. Grupo 2. Antibióticos no específicos para ICD:

Este segundo grupo se compone de antibióticos que, aunque no se destinan a tratar *C. difficile*, su uso en infecciones bacterianas distintas altera el equilibrio de la flora intestinal, aumentando la vulnerabilidad a infecciones por *C. difficile*. Los antibióticos de este grupo incluyen:

- Meropenem (MP): Como carbapenem de amplio espectro, meropenem es muy eficaz frente a bacterias resistentes. Inhibe la síntesis de la pared celular bacteriana tanto en bacterias Gram-positivas como negativas al ligarse a las proteínas de unión a la penicilina (17). Sin embargo, su amplio rango de acción también afecta a la flora intestinal protectora, incrementando el riesgo de infecciones oportunistas como *C. difficile* (17).

- Piperacilina-tazobactam (PTZ): Este antibiótico, una combinación de piperacilina con el inhibidor de beta-lactamasa tazobactam, se emplea en infecciones complejas (22). No obstante, su impacto sobre la microbiota benéfica del intestino puede predisponer a los pacientes a ICD (22).

- Ciprofloxacina (CI): Este antibiótico, forma parte de las fluoroquinolonas. Estas ejercen su acción bactericida al inhibir la ADN girasa bacteriana y la topoisomerasa II, impidiendo la formación de una superbobina negativa en el ADN, un proceso esencial para la replicación y transcripción. El uso extendido de estas sustancias y la consecuente aparición de resistencia han sido vinculados con la propagación de cepas epidémicas RT027 (10).

- Ceftriaxona (TZ): Como cefalosporina de tercera generación, la ceftriaxona es común en el tratamiento de infecciones respiratorias y urinarias. Impide la formación de la pared celular bacteriana al unirse a las transpeptidasas PBP, evitando así la reacción de entrecruzamiento necesaria para la síntesis del peptidoglicano. No obstante, su impacto prolongado sobre la flora intestinal puede favorecer el crecimiento de *C. difficile* (10).

1.7.2.Relación de las ICD con el uso prolongado de antibióticos

El uso prolongado de antibióticos de amplio espectro, como las fluoroquinolonas o cefalosporinas, es un factor de riesgo clave en el desarrollo de ICD ya que estos antibióticos alteran la microbiota intestinal y generan un ambiente favorable para la colonización de *C. difficile* (1). Esta disbiosis permite que las esporas de *C. difficile*, resistentes a muchos antimicrobianos, germinen en el intestino y se conviertan en células activas que producen toxinas, desencadenando la infección (8). Además, la capacidad de *C. difficile* para esporular incrementa el riesgo de recurrencias tras el tratamiento inicial, ya que las esporas pueden permanecer en el intestino y reactivar la infección una vez que cesa el efecto del tratamiento (23). Este ciclo de recurrencia es particularmente preocupante en pacientes que requieren el uso continuado de antibióticos, lo que perpetúa la disbiosis, favorece la persistencia de *C. difficile* y limita la efectividad del tratamiento a largo plazo.

1.7.3.Desafíos relacionados con la resistencia

La resistencia a antibióticos es uno de los problemas de salud pública más apremiantes a nivel mundial (24). La emergencia de cepas resistentes reduce la efectividad de los tratamientos convencionales y aumenta la gravedad de las infecciones. *C. difficile* ha desarrollado resistencia a múltiples clases de antibióticos, tales como fluoroquinolonas y cefalosporinas, exacerbando su propagación en entornos hospitalarios y dificultando los esfuerzos de control. En particular, el RT027, resistente a fluoroquinolonas, ha sido vinculado a brotes epidémicos, y su capacidad de adaptación en entornos donde se utilizan ampliamente estos antibióticos subraya la relación entre la resistencia antimicrobiana y la virulencia de la cepa (10).

Indicios de los mecanismos de resistencia adquiridos por *C. difficile*:

1. Vancomicina: La resistencia a vancomicina se relaciona con modificaciones en el operón vanG de las bacterias que altera los precursores de la pared celular, reduciendo su afinidad a este antibiótico y disminuyendo su efectividad (17). Por otro lado, se ha relacionado a la vancomicina con la aparición de *Enterococci* resistentes a vancomicina (VRE) y aunque sea efectiva para *C. difficile*, existe preocupación por si una toma oral pudiera provocar una alta concentración de este fármaco en el intestino y favorecer el desarrollo y propagación de VRE ahí mientras se controla la ICD, aunque no hay evidencia clara hasta hoy (25).
2. Metronidazol: La resistencia a metronidazol en cepas de *C. difficile* está relacionada con alteraciones en las rutas de activación reductiva de esta droga, como mutaciones en el transportador de hierro FeoB1 y en otras proteínas esenciales para las reacciones redox de la bacteria (17).
3. Fidaxomicina: Las cepas resistentes a fidaxomicina presentan mutaciones en la subunidad RpoB de la ARN polimerasa, lo que disminuye la afinidad de unión del antibiótico. También se han identificado modificaciones en genes reguladores, como MarR, que contribuyen a la resistencia (17).
4. Ciprofloxacina (Fluoroquinolonas): Mutaciones en la DNA girasa, particularmente la mutación Thr82Ile, confieren resistencia a fluoroquinolonas, permitiendo a cepas como RT027 proliferar incluso bajo presión antibiótica (17).

La formación de *biofilms* es otro mecanismo de resistencia que permite a *C. difficile* sobrevivir en entornos con alta concentración de antibióticos, protegiendo a las células bacterianas y contribuyendo a la recurrencia de la infección después de la finalización del tratamiento (17).

1.7.4. Alternativas terapéuticas

Dada la alta tasa de recurrencia y la resistencia de *C. difficile*, se han explorado alternativas terapéuticas innovadoras, entre las que destaca el trasplante de microbiota fecal (TMF). Este procedimiento consiste en restaurar la microbiota intestinal mediante la transferencia de microbiota saludable de un donante a un paciente afectado, mostrando tasas de éxito de el 90% (4). Así, TMF ha demostrado ser una estrategia efectiva para reestablecer el equilibrio microbiano

intestinal y reducir la recurrencia de ICD, aunque aún existen desafíos en cuanto a la estandarización del procedimiento y la selección de donantes. Actualmente se siguen realizando investigaciones para establecer protocolos más claros y seguros para su aplicación en la práctica clínica (4).

Otros enfoques emergentes incluyen el uso de consorcios bacterianos definidos, probióticos específicos y bacteriófagos, así como inhibidores de esporulación y *biofilm*, todos diseñados para reducir la prevalencia de *C. difficile* y restaurar la microbiota sin causar disbiosis adicional (23). Estos tratamientos alternativos buscan ofrecer opciones menos dependientes de los antibióticos convencionales y minimizar los riesgos de recurrencia y resistencia, aunque no hay suficiente evidencia para recomendar su uso como tratamiento o medida preventiva efectiva contra *C. difficile* en la actualidad.

2. OBJETIVO

Este trabajo tiene como objetivo estudiar la resistencia y sensibilidad de *C. difficile* a diversos antibióticos. En el marco de un proyecto multicéntrico que incluye 9 hospitales de la Comunidad Valenciana y Andalucía, hemos analizado la actividad *in vitro* de los antibióticos, relacionándola con las características clínicas de los pacientes.

Los estudios de resistencia son esenciales para:

- Monitoreo de nuevas resistencias: la evaluación continua permite detectar emergentes mecanismos de resistencia que podrían reducir las opciones terapéuticas disponibles, dado que *C. difficile* puede adquirir resistencia a antibióticos previamente efectivos.
- Identificación de opciones terapéuticas efectivas: conocer qué antibióticos aún muestran efectividad contra *C. difficile* permite a los médicos elegir tratamientos que maximizan el éxito y reducen el uso de medicamentos ineficaces.
- Control de brotes en hospitales: en entornos hospitalarios, donde esta infección puede diseminarse rápidamente, conocer los perfiles de resistencia ayuda a ajustar los protocolos de tratamiento y prevención, evitando el uso de antibióticos que favorezcan la propagación de cepas resistentes.
- Preservación de antibióticos efectivos: el estudio de la sensibilidad permite limitar el uso de antibióticos de amplio espectro, reduciendo la presión selectiva que favorece la resistencia y reservando los antibióticos más efectivos para los casos realmente necesarios.

En conjunto, el objetivo principal es estudiar la CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) de *C. difficile* para evaluar la efectividad de antibióticos y detectar posibles resistencias. Esto permite identificar opciones terapéuticas efectivas para las ICD, controlar brotes en hospitales y preservar antibióticos, minimizando el riesgo de resistencia.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Cepas de *C. difficile*:

Las cepas de *C. difficile* que se incluyeron en este estudio fueron aisladas de muestras fecales de 169 pacientes previamente diagnosticados con ICD. Las muestras fueron recolectadas siguiendo los protocolos de bioseguridad establecidos y posteriormente procesadas para el aislamiento y cultivo de la bacteria en condiciones anaeróbicas. Así, las muestras se inocularon en agar selectivo (Biomerieux) y se incubaron durante 48 horas en ambiente anaerobio. Trascurrido ese tiempo, se comprobó que las bacterias que crecieron fueran *C. difficile* identificándolas mediante MALDI-TOF (Bruker) y finalmente se conservaron a -80°C hasta su análisis.

Las muestras fecales fueron de pacientes de los siguientes hospitales de la Comunidad Valenciana y Andalucía: Hospital Universitario Virgen de Valme, Sevilla, Hospital General Universitario Dr. Balmis - ISABIAL, Alicante, Hospital Universitario Sant Joan d'Alacant, Alicante, Hospital Vega Baja de Orihuela, Orihuela, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia, Hospital Marina Baixa, Villajoyosa, Hospital Universitario de San Cecilio, Granada, Hospital Universitario Virgen Macarena, Sevilla y Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba.

El promedio de edad de los pacientes fue de 67 años y el porcentaje de hombres fue del 36% (61 hombres y 108 mujeres). El 77.7% habían tomado antibioterapia en los 3 meses previos, y los principales tratamiento administrados fueron vancomicina en un 56,8%, y fidaxomicina en un 25.4% respectivamente. El 28,4% sufrió alguna recurrencia: 37 pacientes sufrieron una recurrencia, y 11, dos recaídas.

3.2. Antibióticos

Como se ha mencionado en la introducción, se probaron tanto los antibióticos para el tratamiento primario de ICD como los no específicos para ICD. La evaluación de estos dos grupos ayuda a diferenciar entre aquellos que se usan activamente para tratar ICD y aquellos que, si bien no tratan directamente a este patógeno, pueden contribuir indirectamente a su desarrollo en pacientes expuestos, resaltando la importancia de un manejo adecuado en el uso de antibióticos.



Figura 5. Imagen de una placa de agar-sangre con fidaxomicina en la que se observan las marcas que delimitan la sección en la que se depositará cada muestra.

En cuanto a la aplicación de los antibióticos, se utilizaron técnicas diferentes para la evaluación de la sensibilidad en *C. difficile* dependiendo del fármaco en cuestión. En el caso de la fidaxomicina se prepararon placas de agar sangre en el laboratorio en las que se difundió el antibiótico (Figura 5). Se prepararon varias diluciones del fármaco (que se explicarán con detalle en el apartado 3.5), que se añadieron a las placas para estudiar el crecimiento bacteriano en función de la concentración, lo que permite determinar la eficacia del antibiótico y su CMI. Las concentraciones que se prepararon fueron: [32µg/ml], [16µg/ml],



Figura 6. E-Test comerciales almacenados en la nevera para su posterior uso.



Figura 7. Imagen de una placa SCS con un E-Test de ciprofloxacina al que *C. difficile* mostró resistencia y otro de ceftriaxona en el que se observa un halo de inhibición. El resto de la placa creció en césped.



Figura 8. Imagen de una placa SCS con un E-Test de ceftriaxona en la que se observa el halo de inhibición.

[8µg/ml], [4µg/ml], [2µg/ml], [1µg/ml], [0.5µg/ml], [0.25µg/ml], [0.125µg/ml], [0.06µg/ml], [0.03µg/ml] y [Control]

Por otro lado, el resto de los antibióticos se estudiaron mediante la tecnología E-Test (de marca *bioMérieux*) (Figura 6), que consiste en una tira plástica rectangular impregnada con el antibiótico en estudio (Figura 7, Figura 8). Esta tira presenta un gradiente estable predefinido de 15 concentraciones del antibiótico a lo largo de su longitud que permite determinar la CMI de cada uno frente a las cepas bacterianas. En el caso de MZ, VA, TGC, PTZ y TZ, el gradiente de antibiótico en el E-Test va de 0,016µg/ml a 256 µg/ml; mientras que para CI y MP es de 0,002µg/ml a 32µg/ml.

3.3. Material de laboratorio

Se hizo uso de asas de siembra, placas de crecimiento específico para *C. difficile* (placas *C. Difficile*), placas SCS (placas agar Schaedler + sangre de oveja al 5%) , placas de agar sangre, placas petri, sangre desfibrilada de caballo, tubos Falcon, suero fisiológico, bolsas de anaerobiosis.

3.4. Equipos

MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization): equipo utilizado para la identificación de microorganismos mediante la espectrofotometría de masas. Cada especie presentará una serie de picos característicos en su espectro correspondiente a las proteínas que esta presente, y así, se compara automáticamente con la base de datos y se emite un resultado junto a un puntaje o *score*.

-Densitómetro McFarland: mide la turbidez de la solución en unidades McFarland, lo cual se relaciona con la medición de la concentración celular.

-Autoclave: es un equipo de esterilización que se utiliza para generar calor húmedo. Este calor, en forma de vapor saturado, alcanza temperaturas superiores al punto de ebullición, llegando a los 135-137°C, lo que permite eliminar microorganismos como bacterias, virus, hongos y esporas.

-Cabina de anaerobiosis: proporciona las condiciones ideales sin exposición al oxígeno atmosférico para el crecimiento de bacterias anaerobias

3.5. Diseño experimental

3.5.1. Preparación de las muestras

En primer lugar, se inocularon por triple estría las muestras fecales de los pacientes que habían dado positivo en *C. difficile* en placas de agar selectivo diseñadas específicamente para el crecimiento de esta bacteria. El proceso se llevó a cabo en condiciones estériles trabajando con las placas en el autoclave para asegurar la eliminación de cualquier posible contaminante.

Una vez se sembraron las placas, estas se colocaron en bolsas herméticas junto con sobres secuestradores de oxígeno, se introdujeron en una estufa a 35° garantizando un ambiente libre de oxígeno, ideal para el crecimiento de bacterias anaerobias como *C. difficile* y se dejaron incubando durante 48 horas.

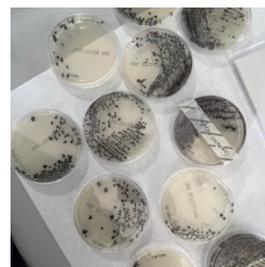


Figura 9. Colonias crecidas de *C. difficile* tras su siembra e incubación en condiciones de anaerobiosis en placas específicas para esta bacteria.

3.5.2. Aislamiento de colonias

Tras 48 horas de incubación se recogían las placas (Figura 9) y se había de confirmar que las bacterias que habían crecido en el agar eran *C. difficile*, ya que aunque se utilice un medio selectivo, a menudo crecen otros microorganismos en la placa, y por lo tanto, es necesario realizar una prueba adicional. Para ello, se seleccionaba una de las colonias crecidas por cada placa (Figura 10) y se introducía en el MALDI-TOF. Este dispositivo analiza el espectro proteico de la muestra y dice a qué bacteria corresponde, además de dar una puntuación. Se aceptaron las colonias identificadas como *C. difficile* con una puntuación superior o igual a 1'6, aunque lo óptimo es que de una puntuación de 2 o superior (Figura 11). Una vez identificada la colonia, se le hacía un pase de esta a otra placa selectiva de *C. difficile* para conseguir definitivamente un crecimiento aislado de la bacteria. Al igual que en el paso anterior, estas placas se dejaban incubar durante 48 horas en condiciones de anaerobiosis.



Figura 10. *C. difficile* crecida en una placas específica para esta bacteria en la que se observan las colonias seleccionadas para MALDI-TOFF.

3.5.3. Preparación del cultivo para el antibiograma

Una vez crecían las placas con la bacteria aislada se preparaba el cultivo para el antibiograma. De cada placa se congeló y almacenó una parte del cultivo para disponer de las cepas aisladas en caso de fuera necesario en el futuro, y con el resto se realizó un subcultivo de la bacteria en una placa SCS que se incubó como las anteriores durante 48h en anaerobiosis (Figura 12). Este traspase del cultivo a placas SCS era necesario porque en ellas

A screenshot of a MALDI-TOF mass spectrometry software interface. It shows a grid of colored spots representing different samples. Below the grid is a table with columns for ID, Puntuación, Nombre, Tipo de muestra, Especies detectadas, and Puntuación. The table lists various samples, some identified as Clostridium difficile with scores of 2.06, 2.08, 2.03, 2.10, 1.83, 2.13, 2.21, 2.13, 2.15, and 1.71. Other samples are marked as 'no se han encontrado picos' or 'Sin identificación posible'.

ID	Puntuación	Nombre	Tipo de muestra	Especies detectadas	Puntuación
4953		A1	Estándar	no se han encontrado picos	
2	A2	A2	Estándar	no se han encontrado picos	
3	A3	A3	Estándar	Sin identificación posible	1.64
4075	A4	A4	Estándar	Bacteroides spirochaetae	1.96
2	A5	A5	Estándar	no se han encontrado picos	
3	A6	A6	Estándar	no se han encontrado picos	
1885	A7	A7	Estándar	no se han encontrado picos	
2	A8	A8	Estándar	no se han encontrado picos	
7471	A9	A9	Estándar	Clostridium difficile	2.18
2	A10	A10	Estándar	Clostridium difficile	2.06
3	A11	A11	Estándar	Clostridium difficile	2.08
4633	A12	A12	Estándar	Clostridium difficile	2.03
2	B1	B1	Estándar	Clostridium difficile	2.10
3	B2	B2	Estándar	no se han encontrado picos	
4	B3	B3	Estándar	no se han encontrado picos	
7278	B4	B4	Estándar	no se han encontrado picos	
2	B5	B5	Estándar	Clostridium difficile	1.83
7738.2	B6	B6	Estándar	Clostridium difficile	2.13
1	B7	B7	Estándar	Clostridium difficile	2.13
3	B8	B8	Estándar	Clostridium difficile	2.21
0704	B9	B9	Estándar	Clostridium difficile	2.13
2	B10	B10	Estándar	Clostridium difficile	2.15
4208	B11	B11	Estándar	no se han encontrado picos	
2	B12	B12	Estándar	Clostridium perfringens	1.71
6170	C1	C1	Estándar	no se han encontrado picos	

Figura 11. Resultados del MALDI-TOFF para comprobar que la bacteria que ha crecido es *C. difficile*. Cada fila es una colonia analizada y a la derecha hay una columna con la bacteria detectada según el perfil proteico, y la puntuación.

C. difficile crece de color blanco, lo que evitaba posibles errores en la medición de la densidad bacteriana en el densitómetro ya que en las placas selectivas para *C. difficile*, la bacteria crece de color negro pudiendo interferir en la lectura y cuantificación. A partir de este cultivo se realizó el antibiograma.

3.5.4. Antibiograma

Para realizar el antibiograma de *C. difficile* y así evaluar la sensibilidad antibiótica *in vitro*, se aplicaron las normas EUCAST (Comité Europeo de Pruebas de Sensibilidad a Antibióticos). Además, como se ha mencionado anteriormente, se emplearon dos metodologías diferentes: E-Test para 7 de los antibióticos (Metronidazol, Vancomicina, Tigeciclina, Meropenem, Piperacilina-tazobactam, Ciprofloxacina, Ceftriaxona) y por difusión en placa para Fidaxomicina debido a la ausencia de E-Test comerciales para este antibiótico.

- E-Test: El primer paso para la determinación de la CMI del antibiótico utilizando la tecnología E-Test fue la estandarización del proceso con la preparación de las muestras. Se preparó por cada placa de *C. difficile* una disolución en un tubo Falcon cuya densidad celular bacteriana fuera 0'5 haciendo uso del densitómetro (Figura 13, Figura 14). Si este marcaba una concentración que superaba dicho valor, se añadía suero fisiológico a la disolución para diluirla y si era inferior, más muestra de la placa, con ayuda de un asa de siembra, para concentrarla. Inicialmente se añadían 2ml de suero y luego se ajustaba. Dicha estandarización era necesaria para evitar falsos positivos o negativos (si la concentración celular era muy baja podría diagnosticarse erróneamente como si fuera muy susceptible al antibiótico y viceversa) y para que los resultados fueran reproducibles.

Antes de cada medición en el densitómetro, las muestras se pasaban por el vórtex para asegurar que la muestra fuera homogénea. Este sistema medía la densidad celular en función de la turbidez de la suspensión bacteriana por lo que agrupaciones celulares podrían reflejar menos la luz y resultar en una subestimación de la concentración celular real. Para evitar errores instrumentales también se realizaba una muestra control solo con suero fisiológico comprobando que para ella, el densitómetro marcara una concentración de cero.

Cada una de estas disoluciones estandarizadas se sembraron en cuatro placas de agar SCS en césped y con ayuda de un hisopo de algodón. Una vez se realizaba la siembra, se



Figura 12. *C. difficile* crecida en placas SCS tras 48h en bolsas y condiciones de anaerobiosis.

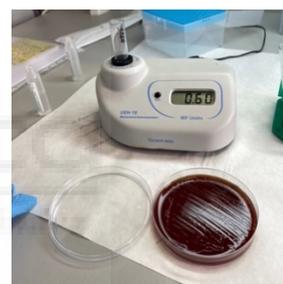


Figura 13. Densitómetro McFarland del que se hacía uso para conseguir una concentración bacteriana igual para cada muestra antes de realizarles la prueba de sensibilidad a los antibióticos



Figura 14. Tubos Falcon en los que se preparaban las concentraciones de muestra para sembrar en los E-Tests y placas de fidaxomicina.



Figura 15. E-Test en el que se observa el halo de inhibición de *C. difficile* al meropenem y resistencia a la ciprofloxacina.

depositaban dos tiras de E-Test (de dos antibióticos diferentes) por cada placa y de nuevo, se volvían a guardar en bolsas herméticas con el secuestrador de oxígeno y en condiciones de anaerobiosis durante 48h a 35°C.

Finalmente, cuando el periodo de incubación concluía, el antibiótico había difundido, las bacterias habían crecido y se realizaba la lectura del antibiograma. Solo se dieron por válidas las placas en las que se observó un crecimiento continuo, suficientemente denso y uniforme. La lectura consistió en mirar la placa y observar el halo de inhibición (el área) en el que las bacterias no han podido crecer por la presencia del antibiótico (Figura15). La CMI corresponde al valor del antibiótico en el que la bacteria dejó de crecer, es decir, la concentración mínima a la que *C. difficile* se inhibió. Las placas que mostraron un crecimiento celular heterogéneo o contaminaciones no se dieron por válidas y se les repitió el proceso; y a las que mostraron un patrón que resultaba extraño se les realizó una prueba en el MALDI-TOF para comprobar que la bacteria sí era *C. difficile*.

- Difusión en placas Agar-sangre para la Fidaxomicina: Para realizar los antibiogramas de Fidaxomicina se prepararon placas de agar-sangre a diferentes concentraciones de antibiótico y su lectura se realizó observando en qué placas creció la bacteria, en cuales no y anotando la concentración de antibiótico que contenía la primera placa en la que hay inhibición de la bacteria (CMI).

Las placas se preparaban en tandas de 12, para lo cual se usaron 13,8g de *Agar fastidiosus* mezclado con 300ml de agua destilada. Esta preparación se dejaba en el autoclave durante 45 minutos para esterilizarla y permitir que el agar se disolviera correctamente. Mientras tanto, se preparaban las distintas concentraciones a las que se quería estudiar del antibiótico, que como se mencionó anteriormente son [32µg/ml], [16µg/ml], [8µg/ml], [4µg/ml], [2µg/ml], [1µg/ml], [0.5µg/ml], [0.25µg/ml], [0.125µg/ml], [0.06µg/ml], [0.03µg/ml] y [Control]. Cada concentración se consigue realizando diluciones del antibiótico con agua destilada. En primer lugar, se separaron 250 µl del stock de fidaxomicina en un tubo *ependorf* y se prepararon las diluciones: 1:10, 1:100 y 1:1000. Posteriormente, se tomaron las cantidades necesarias de cada dilución para preparar las distintas concentraciones de antibiótico, que se añadieron a tubos Falcon: [32µg/ml]: 64µl del stock de Fidaxomicina ; [16µg/ml]: 32µl del stock de Fidaxomicina; [8µg/ml]: 16µl del stock de Fidaxomicina; [4µg/ml]: 80µl de dilución 1:10; [2µg/ml]: 40µl de dilución 1:10; [0.5µg/ml]: 100µl de dilución 1:100; [0.25µg/ml]: 50µl de dilución 1:100; [0.125µg/ml]: 25µl de dilución 1:1000; [0,06µg/ml]: 125µl de dilución 1:1000; [0.03µg/ml]: 62µl de dilución 1:1000; [Control]: sin antibiótico.



Figura 16. Sangre fresca desfibrilada de caballo utilizada para preparar las placas de agar-sangre con fidaxomicina.

Cuando el programa del autoclave finalizaba, se dejaba que el medio de cultivo se atemperara. Del mismo modo, la sangre desfibrilada de caballo que se utilizaba, ya que se trata de un agar-sangre, también se dejaba atemperar para facilitar una mezcla homogénea sacándola de la nevera. Una vez ambos se habían atemperado, se desechaban 21ml del agar y se le añadían 21ml de la sangre desfibrilada (Figura 16). A continuación, se mezclaba con una agitación suave y se añadía a cada tubo Falcon, que ya contenía las distintas concentraciones y cantidades del antibiótico, 20ml del agar-sangre. Los tubos se rotaban con suavidad para mezclar el antibiótico con el agar y se vertía el contenido en una placa *petri* antes de que comenzara a solidificarse. De esta forma, las placas que se utilizaron para el antibiograma de la fidaxomicina portaron incorporado el antibiótico en el agar. En ese momento, las placas se dejaron reposar hasta que solidificasen, y después se almacenaron en la nevera hasta su uso.

Para realizar el antibiograma, la placa se subdividió en ocho secciones triangulares equitativas, empleando un rotulador para trazar las divisiones radiales desde el centro hasta el borde, de modo que cada sección correspondía a una muestra diferente. Es decir, cada 8 muestras bacterianas se habían de depositar en cada una de las 12 placas, de forma que podamos estudiar el crecimiento de estas para cada concentración de fidaxomicina (Figura 17). Al igual que en el caso de la tecnología E-Test, una vez se sembraban las bacterias en las placas, durante 48h estas se introducían en bolsas herméticas con un secuestrador de oxígeno y se dejaban en cámaras de anaerobiosis. Trascurrido ese tiempo, se recogían y se procedía a la



Figura 17. Imagen de una placa agar-sangre control (sin fidaxomicina), en la que se observa la distribución de las ocho muestras de los pacientes crecidas.

lectura del antibiograma. Para ello, con buena luz se observaba cada placa y se anotaba para cada una, qué muestras habían crecido y cuáles no. La CMI de cada muestra bacteriana es la concentración de fidaxomicina de la placa menos concentrada en la que esta no creció. Si la muestra mostraba irregularidades o posibles contaminaciones, se repetía. De la misma forma, si se observaba inhibición de una muestra bacteriana en una placa y crecimiento en la siguiente a más concentración de fidaxomicina, ambos crecimientos se estudiaban en el MALDI-TOF para asegurar que el crecimiento es de *C. difficile* y se repetía si era necesario.

3.5.5. Datos y análisis

Al completar el antibiograma para las 169 muestras, los resultados se registraron e ingresaron en Excel para su posterior análisis conforme a las directrices de la EUCAST. Esta organización proporciona los estándares que determinan la sensibilidad bacteriana a los antibióticos, basados en evidencia microbiológica, farmacodinámica y farmacocinética, criterios esenciales para la interpretación de los resultados de los antibiogramas. Clasifican las bacterias en dos categorías: susceptibles (S) o resistentes (R) (26). La clasificación se basa en los *breakpoints*, unos valores establecidos de concentración mínima de antibiótico que se necesita para evitar el crecimiento de una bacteria. Según si la bacteria responde favorablemente o no a esa concentración, se clasifica como susceptible (el antibiótico será eficaz) o resistente (el antibiótico no será eficaz).

Los *breakpoints* son revisados y actualizados periódicamente para adaptarse a los cambios en la resistencia bacteriana y a la introducción de nuevos antibióticos.

Para los antibióticos sin puntos de corte clínicos establecidos, se utilizaron los *breakpoints* epidemiológicos (ECOFF), también definidos por la EUCAST. Los ECOFF permiten distinguir entre poblaciones bacterianas sin mecanismos de resistencia adquirida (fenotipo silvestre) y aquellas con posibles mecanismos de resistencia. Estos valores, basados en la distribución de las CMI, son útiles para identificar la aparición temprana de resistencia antes de que se establezcan puntos de corte clínicos específicos. Para los antibióticos sin puntos de corte por parte de la EUCAST, se consultaron los datos del CLSI (Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio), que también evalúa la efectividad clínica de los antibióticos, basándose en datos farmacológicos, resultados clínicos y microbiología (27)(28).

Se utilizaron los puntos de corte clínicos de la EUCAST para la clasificación de la sensibilidad de las cepas a metronidazol, vancomicina y fidaxomicina. Para metronidazol y vancomicina, el punto de corte se estableció en 2 µg/ml, mientras que para fidaxomicina se fijó en 0,5 µg/ml. Las cepas con una CMI igual o inferior a estos valores se consideraron sensibles, mientras que las que superaban estos valores fueron clasificadas como resistentes. Para ciprofloxacina, se utilizaron los puntos ECOFF, con un umbral de 32 µg/ml, siguiendo el mismo criterio: sensibles si la CMI es igual o menor que este valor, y resistentes si la CMI es superior (Tabla 1). Por último, para meropenem, piperacilina-tazobactam y ceftriaxona, la clasificación se realizó con los puntos de corte del CLSI, considerando un tercer grupo de clasificación además de sensible y resistente: las cepas intermedias. En el caso de meropenem, se considera sensible una cepa con CMI ≤ 4 µg/ml, intermedia entre 4 y 16 µg/ml (incluido 16 µg/ml), y resistente si la CMI es >16 µg/ml. Para piperacilina-tazobactam, una cepa es sensible si la CMI ≤ 16 µg/ml, intermedia entre 16 y 128 µg/ml (incluido 128 µg/ml), y resistente si la CMI >128 µg/ml. Para ceftriaxona, una cepa es sensible con CMI ≤ 16 µg/ml, intermedia entre 16 y 64 µg/ml (incluido 64 µg/ml), y resistente si la CMI >64 µg/ml (Tabla 1).

Tabla 1. Puntos de corte para los diferentes antibióticos según EUCAST (clínicos y ECOFF) y CLSI (26) (27) (28).

ANTIBIÓTICO	EUCAST (µg/ml)	ECOFF (µg/ml)	CLSI (µg/ml)
MZ	Sensible: CMI ≤2 Resistente: CMI>2		
VA	Sensible: CMI ≤2 Resistente: CMI>2		
FDX	Sensible: ≤ 0.5 Resistente: CMI>0.5		
TGC	-	-	-
MP			Sensible: CMI ≤ 4 Intermedio: 16 ≥ CMI >4 Resistente: CMI>16
P/T			Sensible: CMI ≤ 16 Intermedio: 128 ≥ CMI >16

CI	Sensible: CMI ≤32 Resistente: CMI >32	Resistente: CMI > 128
TZ		Sensible: CMI ≤ 16 Intermedio: 64 ≥ CMI > 16 Resistente: CMI ≥ 64

En el caso de la TGC no hay *breakpoints* clínicos establecidos por falta de evidencia clínica suficiente, ya que aunque tiene actividad *in vitro* contra *C. difficile* los datos sobre su eficacia en infecciones reales son limitados. Igualmente, estudiar su CMI permitirá explorar su potencial terapéutico y vigilar la posible aparición de resistencia.

Se ha de mencionar que hay antibióticos para los que también existe la categoría “intermedio”. Esta categoría indica que la eficacia clínica del antibiótico depende de ciertos factores específicos, es decir, el porcentaje de cepas que aunque no cumplen los criterios como para considerarse sensibles al antibiótico, podrían combatirse en ciertas condiciones determinadas como el uso de dosis más altas del antibiótico o la concentración del antibiótico en sitios específicos del cuerpo. Es una zona de amortiguación para minimizar errores técnicos en las pruebas y evitar clasificaciones erróneas.

4. RESULTADOS

De los 169 pacientes, 12 pertenecen al Hospital Universitario Virgen Macarena, 29 al Virgen del Valme, 14 a San Juan de Alicante, 22 a Orihuela, 7 a Marina Baixa de Villajoyosa, 13 a La Fe de Valencia, 1 al San Cecilio de Granada, 3 al Reina Sofía de Córdoba y 68 al Dr. Balmis de Alicante. Los resultados se clasificaron según los breakpoints (Tabla 1) en sensibles, resistentes o intermedias, excepto para la tigeciclina, que carece de puntos de corte definidos por su CMI. Para un análisis integral, se agruparon los datos de los 169 pacientes de los 9 hospitales, proporcionando una evaluación más representativa (Tabla 2). Además, se calculó el porcentaje de cepas resistentes para contextualizar la magnitud de la resistencia, dividiendo el número de cepas con CMI superior al breakpoint entre el total de muestras:

$$\% \text{ Cepas resistentes} = (N^{\circ} \text{ cepas con CMI superior al breakpoint} / 169) \times 100$$

El porcentaje de cepas sensibles y de categoría intermedia se calcula de la misma forma, pero basándonos en los puntos de corte pertenecientes a dicha clasificación.

Entre las muestras analizadas, 166 (98,22%) presentaron resistencia a la ciprofloxacina, siendo el antibiótico con la mayor tasa de resistencia dentro del estudio. En segundo lugar, se encontró la ceftriaxona, con 33 muestras resistentes (19,53%) y 51 muestras con sensibilidad intermedia (30,18%). El resto de los antibióticos evaluados mostraron tasas de resistencia considerablemente más bajas. Se identificaron 2 muestras resistentes a metronidazol (1,18%), 3 a vancomicina (1,78%) y 1 a fidaxomicina (0,59%). Además, se detectaron dos muestras con sensibilidad intermedia a meropenem (1,18%) y una a piperacilina-tazobactam (0,59%). De esta

forma, la mayoría de las muestras, en particular para metronidazol (98,82%), vancomicina (98,22%), piperacilina-tazobactam (99,4%), meropenem (98,82%) y fidaxomicina (99,4%), fueron sensibles. En cuanto a ceftriaxona, solo un 50,3% de las cepas resultaron sensibles y un 1,78% para la ciprofloxacina (Tabla 2).

Tabla 2. Número y porcentaje de muestras sensibles, resistentes e intermedias a cada antibiótico de las 169 muestras estudiadas.

	MZ	VA	TGC	PTZ	MP	CI	TZ	FDX
Resistente	2 (1,18%)	3 (1,78%)	-	0	0	166 (98,22%)	33 (19,53%)	1 (0,59%)
Sensible	167 (98,82%)	166 (98,22%)	-	168 (99,4%)	167 (98,82%)	3 (1,78%)	85 (50,3%)	168 (99,4%)
Intermedia	-	-	-	1 (0,59%)	2 (1,18%)	-	51 (30,18%)	-
Total	169 (100%)	169 (100%)	-	169 (100%)	169 (100%)	169 (100%)	169 (100%)	169 (100%)

Por otro lado, se calculó la CMI50% (Concentración Mínima Inhibitoria al 50%) y la CMI90% (Concentración Mínima Inhibitoria al 90%), representando las concentraciones mínimas que inhiben el 50% y 90% de la población respectivamente. Además, el porcentaje de resistencia indica la proporción de cepas que no fueron inhibidas y crecieron normalmente, siendo útil para evaluar la eficacia del antibiótico. Es útil para comprender la eficacia de un antibiótico. Para el cálculo de estas se ordenan las CMI obtenidas de las 169 muestras de menor a mayor y la que ocupe la posición de la mitad, corresponderá a la CMI que inhibe el 50%.

$$\text{Posición} = (50/100) \times 169 = 85$$

Para la del 90%:

$$\text{Posición} = (90/100) \times 169 = 152$$

El resultado más bajo de CMI50% correspondió a la tigeciclina y fue de 0,016 µg/ml, seguida por el metronidazol con un 0,094 µg/ml, la fidaxomicina con 0,125 µg/ml y tanto la vancomicina como el meropenem con 0,38 µg/ml. Por último, la piperacilina-tazobactam y la ceftriaxona presentaron valores de CMI50% de 2 µg/ml y 16 µg/ml respectivamente. En el caso de la ciprofloxacina, la concentración máxima alcanzada por el E-Test (32 µg/ml) no fue suficiente como para inhibir el 50% de las muestras, y por tanto, tampoco para el 90% (CMI90%) (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados obtenidos de la CMI50%, CMI90% y porcentaje de resistencia de las muestras de *C. difficile*.

	CMI50% (µg/ml)	CMI90% (µg/ml)	Resistencia (%)	Puntos de corte (µg/ml)
MZ	0,094	0,25	1,18 %	(EUCAST) Sensible: CMI ≤2 Resistente: CMI >2
VA	0,38	0,5	1,78%	(EUCAST) Sensible: CMI ≤2 Resistente: CMI >2
FDX	0,125	0,5	0,59%	(EUCAST) Sensible: ≤ 0.5 Resistente: CMI >0.5

TGC	0,016	0,032	-	-
MP	0,38	0,75	0% R ; 1,18% Intermedio	(CLSI) Sensible: CMI ≤ 4 Intermedio: 16 ≥ CMI >4 Resistente: CMI >16
P/T	2	6	0%R ; 0,59% Intermedio	(CLSI) Sensible: CMI ≤ 16 Intermedio: 1 28 ≥ CMI >16 Resistente: CMI > 128
CI	>32	>32	98,22% R	(ECOFF) Sensible: CMI ≤32 Resistente: CMI >32
TZ	16	>256	19,53% R ; 30,18% Intermedio	(CLSI) Sensible: CMI ≤ 16 Intermedio: 64 ≥ CMI > 16 Resistente: CMI ≥ 64

Respecto a la CMI90%, la tigeciclina y el metronidazol presentaron de nuevo los valores más bajos con 0,032 µg/ml y 0,25 µg/ml respectivamente. A continuación, se situaron la vancomicina y la fidaxomicina con un 0,5 µg/ml, seguidas del meropenem con un 0,75 µg/ml. Al igual que para la CMI50%, las CMI90% más altas fueron para la piperacilina-tazobactam, la ceftriaxona y la ciprofloxacina. La CMI90% de la piperacilina-tazobactam fue de 6 µg/ml y para la ceftriaxona, al igual que pasa con la ciprofloxacina, la concentración máxima de antibiótico que presenta el E-Test (256 µg/ml) no consiguió inhibir al 90% de las muestras (*Tabla 3*).

Se analizaron las muestras según el rango de edad y sexo para evaluar su relación con la resistencia a *C. difficile*. Se agruparon en dos categorías de edad (≥60 años y <60 años) y por sexo, calculando los porcentajes de cepas resistentes, intermedias y sensibles en cada grupo (*Figuras 18, Figura 19, Figura 20*). En cuanto a la edad, las mayores tasas de resistencia se observaron en ciprofloxacina y ceftriaxona para ambos grupos, siendo más altas en menores de 60 años (100% y 32,2%, respectivamente) que en ≥60 años (97,58% y 12,73%). Con cifras más bajas, la resistencia a vancomicina también fue mayor en <60 años (4,26% vs. 0,82%), mientras que la de fidaxomicina y metronidazol fue superior en ≥60 años (0,82% y 1,65%, respectivamente), sin casos en menores de 60. No se hallaron resistencias a piperacilina-tazobactam ni meropenem en ningún grupo. En la sensibilidad intermedia (*Figura 19*), un 2,13% de muestras de <60 años fueron intermedias para piperacilina-tazobactam, sin casos en ≥60 años. Para meropenem, ocurrió lo contrario: 1,85% de cepas intermedias en ≥60 años y ninguna en <60 años. La mayor proporción de cepas intermedias en ambos grupos se encontró en ceftriaxona (33,64% en ≥60 años y 23,73% en <60 años).

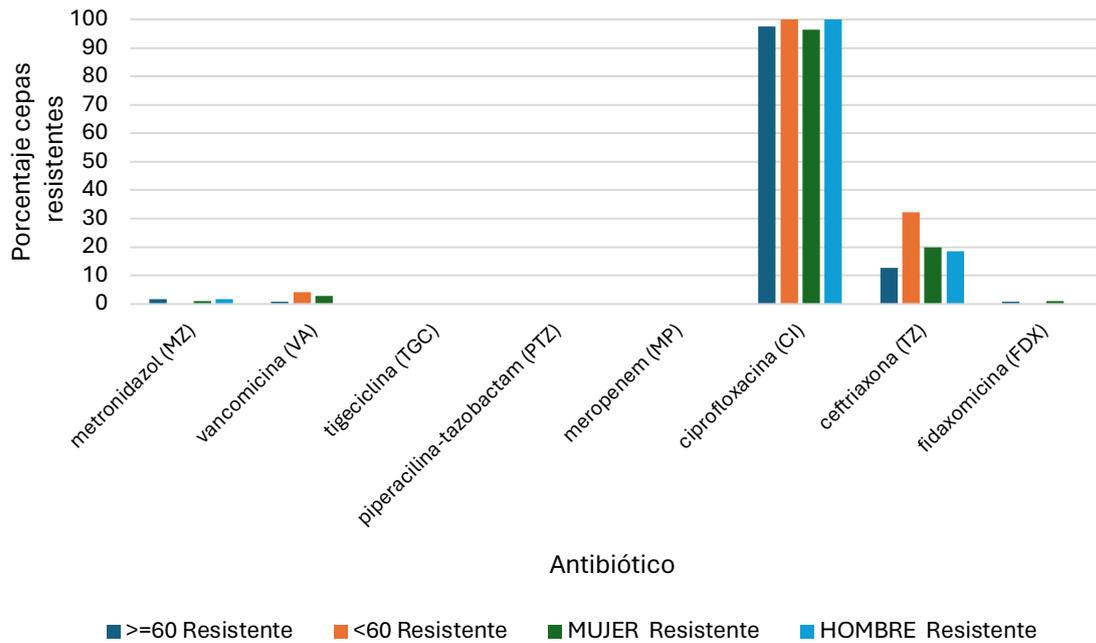


Figura 18. Representación del número de cepas de pacientes de 60 años o más, de menores de 60, mujeres y hombres que han resultado resistentes a cada antibiótico.

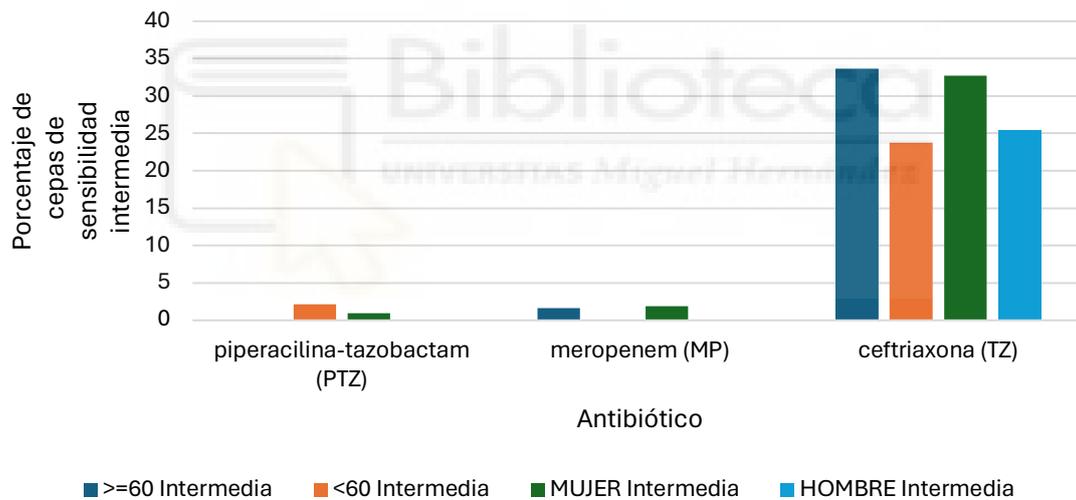


Figura 19. Representación del número de cepas de pacientes de 60 años o más, de menores de 60, mujeres y hombres que han resultado de sensibilidad intermedia cada antibiótico.

En términos de sensibilidad, ambos rangos de edades mostraron gran sensibilidad al metronidazol, vancomicina, piperacilina-tazobactam, meropenem y fidaxomicina y cifras similares (Figura 20). En pacientes de 60 años o más, el porcentaje de sensibilidad a estos antibióticos fue del 98,35%, 99,18%, 100%, 98,36%, y 99,18%, respectivamente; y en menores de 60 fue del 100%, 95,74%, 97,87%, 100%, y 100%. La sensibilidad a la ciprofloxacina en ambas es baja, pero mayor en el grupo de ≥ 60 años que es de 2,42%, mientras que en menores de 60 la sensibilidad es nula.

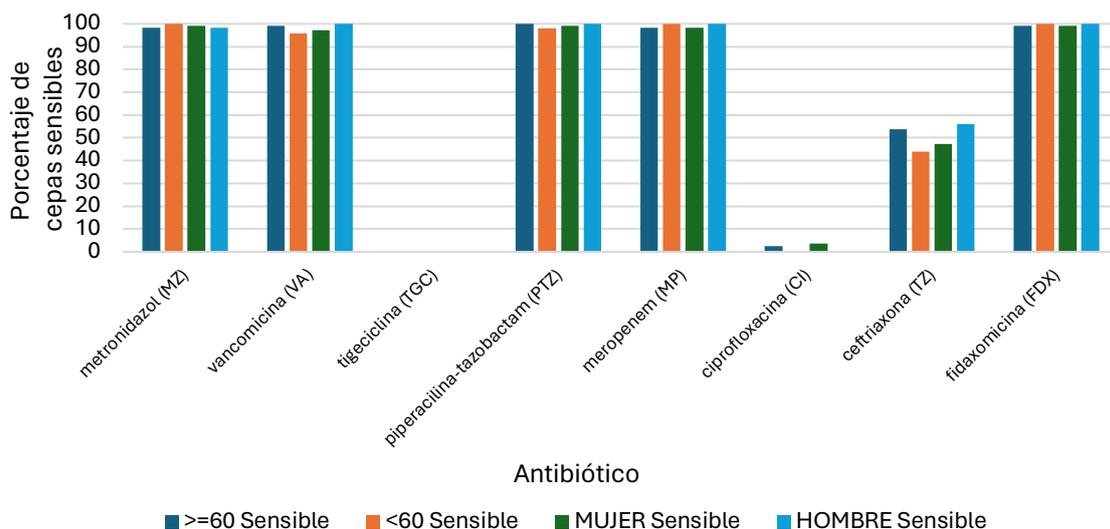


Figura 20. Representación del número de cepas de pacientes de 60 años o más, de menores de 60, mujeres y hombres que han resultado sensibles a cada antibiótico.

Para ambos sexos las mayores tasas de resistencia se observan en ciprofloxacina (96,39% en mujeres, 100% en hombres) y ceftriaxona (20% en mujeres, 18,64% en hombres), con ligeras diferencias entre ellos (Figura 18). La resistencia al metronidazol es mayor en hombres (1,64% vs. 0,95%), mientras que las mujeres presentan mayor resistencia a vancomicina (2,78%) y fidaxomicina (0,98%), sin casos en hombres. No se hallaron resistencias a piperacilina-tazobactam ni al meropenem en ningún grupo. En lo referente al número de cepas con sensibilidad intermedia es menor en hombres para los tres antibióticos con esta categoría. La mayor diferencia se da en ceftriaxona (32,73% en mujeres, 8,88% en hombres), mientras que en piperacilina-tazobactam y meropenem, los valores femeninos (0,93% y 1,85%) superan el 0% en hombres (Figura 20). Ambos sexos muestran alta sensibilidad al metronidazol, vancomicina, piperacilina-tazobactam, meropenem y fidaxomicina (Figura 21). Las mujeres presentan mayor sensibilidad a metronidazol (99,05% vs. 98,36% en hombres) y ciprofloxacina (3,61% vs. 0%), aunque las diferencias son mínimas. En el resto de antibióticos, la sensibilidad es mayor en hombres, con un 100% en vancomicina, piperacilina-tazobactam, meropenem y fidaxomicina, superando los valores femeninos (98,35%, 98,35% y 99,18% respectivamente). En ceftriaxona, la sensibilidad es baja en ambos sexos, pero mayor en hombres (55,93% vs. 47,27% en mujeres).

Según la procedencia hospitalaria (Figura 21), la única cepa resistente a fidaxomicina y dos de las tres resistentes a metronidazol pertenecieron al Hospital General Universitario Dr. Balmis de Alicante. La tercera resistente a metronidazol perteneció al Hospital de San Cecilio. Además, una de las tres cepas resistentes a vancomicina provino de este hospital, mientras que las otras dos se hallaron en el Hospital Universitario de San Cecilio de Granada y el Hospital Universitario Virgen del Valme de Sevilla. No se detectaron resistencias a piperacilina-tazobactam ni meropenem, y en casi todos los hospitales hubo muestras resistentes a ciprofloxacina y ceftriaxona.

Respecto a las muestras con sensibilidad intermedia (Figura 22), la única de piperacilina-tazobactam se halló en el Hospital Virgen Macarena de Sevilla, mientras que las dos de meropenem provinieron del Hospital Dr. Balmis de Alicante. En ceftriaxona, se identificaron muestras intermedias en todos los hospitales, excepto en el Reina Sofía de Córdoba y San Cecilio de Granada. Se registraron 3 en el Virgen Macarena, 9 en el Virgen del Valme, 5 en San Juan de Alicante, 6 en Vega Baja de Orihuela, 2 en Marina Baixa, 2 en La Fe de Valencia y 24 en el Dr. Balmis de Alicante.

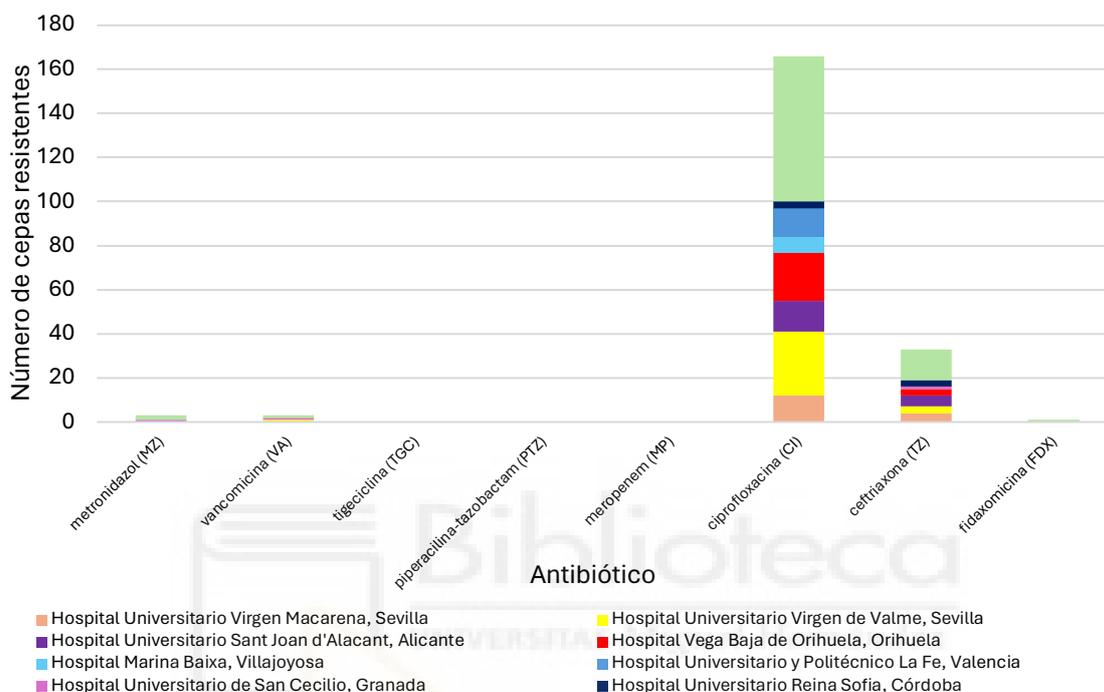


Figura 21. Número de cepas totales del estudio que mostraron resistencia a cada antibiótico. Cada barra está subdividida en colores según a que hospital pertenezcan las muestras halladas resistentes. Para TGC no hay puntos de corte por lo que no se puede hacer dicha clasificación resistente-sensible.

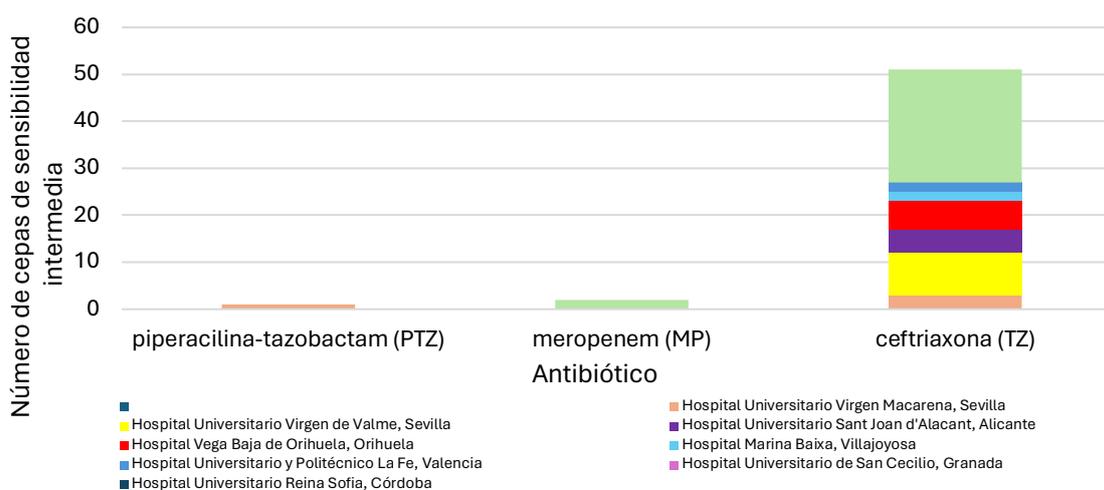


Figura 22. Número de cepas totales del estudio que mostraron sensibilidad intermedia a cada antibiótico. Cada barra está subdividida en colores, representando la cantidad de muestras de cada hospital dentro de esta categoría.

En todos los hospitales, la sensibilidad al metronidazol fue similar a la de vancomicina, piperacilina-tazobactam, meropenem y fidaxomicina, abarcando casi todas las muestras (Figura 23). Todas las muestras de los hospitales de San Juan de Alicante, Vega Baja de Orihuela, Marina Baixa de Villajoyosa, La Fe de Valencia y Reina Sofía de Córdoba fueron sensibles a estos cinco antibióticos. En el Hospital Virgen Macarena, 11 de 12 muestras fueron sensibles a piperacilina-tazobactam, y en el Virgen del Valme, 28 de 29 lo fueron a vancomicina. La única muestra del Hospital San Cecilio de Granada no fue sensible a metronidazol ni vancomicina. Respecto a ciprofloxacina, solo tres muestras fueron sensibles: dos del Hospital Dr. Balmis y una de San Cecilio. En ceftriaxona, hubo sensibilidad en 5 muestras del Virgen Macarena, 17 del Virgen del Valme, 4 de San Juan de Alicante, 13 de Vega Baja, 5 de Marina Baixa, 11 de La Fe y 30 del Dr. Balmis. Ninguna muestra del Hospital San Cecilio ni del Reina Sofía fue sensible a este antibiótico.

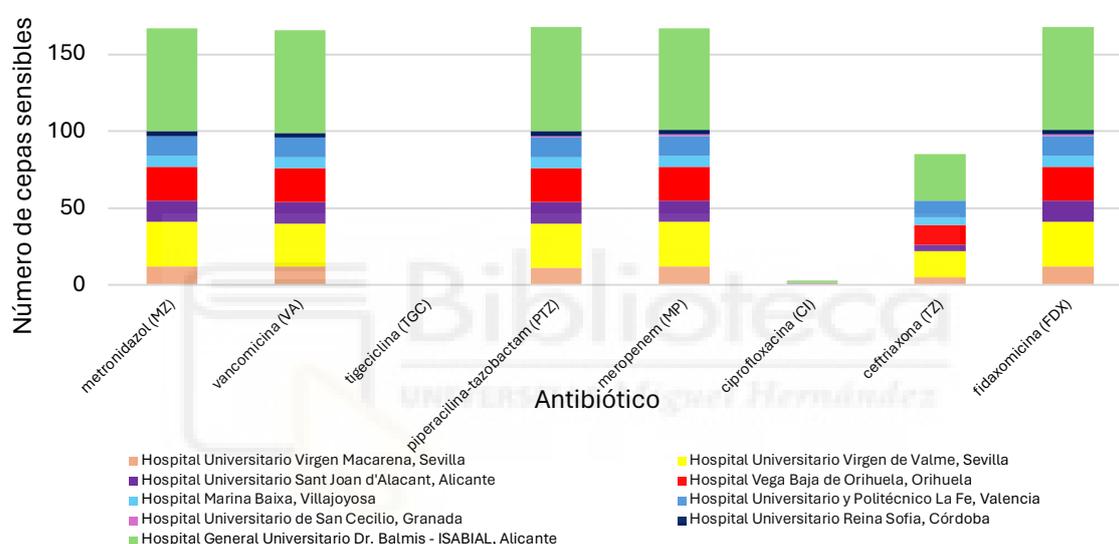


Figura 23. Número de cepas totales del estudio que se mostraron sensibles a cada antibiótico. Cada barra está subdividida en colores según a que hospital pertenezcan las muestras halladas resistentes. Para TGC no hay puntos de corte por lo que no se puede hacer dicha clasificación resistente-sensible.

5. DISCUSIÓN

Comparando la resistencia según la edad, los pacientes menores de 60 años muestran tasas más altas en vancomicina, ciprofloxacina y ceftriaxona, mientras que los de 60 años o más presentan mayor resistencia al metronidazol y la fidaxomicina. Sin embargo, las diferencias son mínimas, sin evidenciar una relación clara entre edad y resistencia. La mayor diferencia se observa en ceftriaxona: 32,2% en menores de 60 vs. 12,73% en mayores. Estos corresponden a 14 pacientes de ≥ 60 años de las 110 muestras que pertenecen a este grupo, frente a 19 de las 59 de los menores de 60, lo que podría sugerir una tendencia en jóvenes, pero harían falta más estudios para confirmarlo, ya que nuestros datos son limitados y no pueden representar a una población. Si bien, aunque el porcentaje de resistencia a este antibiótico es superior en menores de 60, sucede al contrario en el de cepas intermedias, ya que hay más en mayores de 60 (33,64%) que en menores (23,73%). Si se tienen en cuenta ambas, la diferencia es de un 46,37%

de cepas resistentes o intermedias en pacientes de ≥ 60 años, frente a un 55,95% en menores de 60. Sigue existiendo diferencia entre los porcentajes, aunque no tan llamativa.

En cuanto a las cepas intermedias, tampoco se observa una relación definida: los menores de 60 tienen mayor porcentaje en piperacilina-tazobactam (2,13% vs. 0%), mientras que los mayores lo presentan en meropenem (1,64% vs. 0%). Además, se trata de 1 muestra resistente a piperacilina-tazobactam y 2 al meropenem. No son muestras suficientes como para ser significativas. Finalmente, respecto a la sensibilidad, las muestras de ≥ 60 años son más sensibles a vancomicina, piperacilina-tazobactam, ciprofloxacina y ceftriaxona, mientras que los menores lo son a metronidazol, meropenem y fidaxomicina, pero a excepción de la ceftriaxona (9,57% más en ≥ 60 años), las diferencias son menores al 3%. Aunque hay algunas diferencias destacables, no son suficientes para establecer una relación definitiva entre sensibilidad y edad, requiriéndose más estudios.

Es importante destacar que las diferencias podrían estar influenciadas por el azar debido al tamaño limitado de la muestra (169 muestras), lo que podría generar variabilidad en los resultados, como en el caso de la ciprofloxacina, donde solo tres muestras muestran sensibilidad, todas de pacientes mayores de 60 años. Este hallazgo podría ser aleatorio, por lo que se necesitan más estudios para confirmar conclusiones firmes.

En cuanto al sexo, el porcentaje de muestras resistentes es mayor en mujeres para tres antibióticos: vancomicina (2,78% en mujeres frente a un 0% en hombres), ceftriaxona (20% en mujeres frente a un 18,64% en hombres) y fidaxomicina (0,98% en mujeres frente a un 0% en hombres); mientras que es mayor en hombres para dos de los antibióticos estudiados: el metronidazol (1,64% en hombres frente a un 0,95% en mujeres) y la ciprofloxacina (100% en hombres frente a un 96,39% en mujeres). De cualquier modo, en ninguno de los antibióticos la diferencia de porcentaje de resistencia supera el 4%, no mostrando indicios de una relación sexo-resistencia. Sin embargo, los tres porcentajes de sensibilidad intermedia (para la piperacilina-tazobactam, el meropenem y la ceftriaxona) son más altos en mujeres. Para la piperacilina-tazobactam y el meropenem la diferencia no es tanta, siendo un 0,93% y un 1,85% para cada antibiótico respectivamente en mujeres, frente a un 0% en ambos para hombres. Pero en la ceftriaxona la diferencia es de un 32,73% frente a un 8,88% en hombres. Estas cifras son significativas, aunque habría que llevar a cabo más estudios para poder garantizar una relación del sexo con la sensibilidad intermedia a este antibiótico.

Finalmente, las cifras más distantes entre hombres y mujeres al examinar los porcentajes de sensibilidad corresponden nuevamente a la ceftriaxona (un 3,61% en mujeres frente a un 0% en hombres). Esto implica que las tres únicas muestras sensibles a ciprofloxacina en todo el estudio, que además pertenecen al grupo de edad ≥ 60 años, son de mujeres. Al ser una diferencia limitada a solo tres muestras, podría sugerir que no es un hallazgo estadísticamente significativo, sin embargo, también resulta inusual que se encuentren cepas sensibles a ciprofloxacina en un contexto en el que la resistencia es generalmente prevalente. De esta forma, se requerirían más estudios para descartar la posibilidad del azar o de una relación sexo-resistencia a la ciprofloxacina.

También es relevante considerar la procedencia hospitalaria de las cepas para estudiar la distribución de la resistencia y sensibilidad a los antibióticos. De esta manera, se observa que la resistencia a la ciprofloxacina está establecida independientemente del hospital. Lo mismo pasa para la ceftriaxona aunque en menor grado y con excepción del Hospital Marina Baja y Universitario y Politécnico La Fe. Para el resto de fármacos, las muestras resistentes fueron puntuales, con la mayoría provenientes del Hospital General Universitario Dr. Balmis. Dos de las tres cepas resistentes al metronidazol pertenecen a este hospital, al igual que 1 de las 3 resistentes a la vancomicina además de la única resistente a vancomicina. Sin embargo, se nos proporcionaron más muestras de este hospital que del resto, aumentando la probabilidad de encontrar más variedad de cepas, además de que las cifras no son preocupantes. Del Hospital Universitario Reina Sofía solo estudiamos una muestra, pero esta resultó resistente al metronidazol y la vancomicina. Sin embargo, una muestra no es suficiente como para asociar la resistencia a una zona. Finalmente, la tercera muestra resistente a la vancomicina provino del Hospital Universitario Virgen del Valme, pero nuevamente, la cantidad de muestras es insuficiente.

Respecto a las cepas intermedias, detectamos presencia de estas para la ceftriaxona en todos los hospitales a excepción del Hospital Universitario de San Cecilio y el Hospital Universitario Reina Sofía. Estos datos podrían sugerir una variabilidad de los patrones de resistencia intermedia en esas ciudades, pero harían falta más muestras y más estudios para poder confirmarlo. Para los otros dos antibióticos, encontramos una muestra intermedia a la piperacilina-tazobactam en el Hospital Universitario Virgen Macarena y 2 al meropenem en el Hospital Universitario Dr. Balmis. En ningún caso los valores son preocupantes.

Por otro lado, no se detectaron diferencias relevantes en la sensibilidad al metronidazol, vancomicina, piperacilina-tazobactam, meropenem y fidaxomicina por hospitales. En todas las muestras fueron sensibles a ellos, con muy pocas excepciones como en el Hospital Universitario de San Cecilio cuya única muestra no fue sensible a metronidazol ni vancomicina. Sin embargo, una única muestra es insuficiente como para sospechar una relación con la zona geográfica. En cuanto a la ciprofloxacina, las tres muestras sensibles se distribuyen entre dos hospitales: el Hospital General Universitario Dr. Balmis (con dos muestras) y el Hospital Universitario de San Cecilio de Granada (con una muestra). Esta distribución sugiere que la sensibilidad a la ciprofloxacina es limitada y no tan común, incluso en hospitales donde la mayoría de las cepas son sensibles a otros antibióticos. Finalmente, la cifra de cepas sensibles a ceftriaxona fue generalizada en todos los hospitales, a excepción del Hospital Universitario de San Cecilio de Granada y el Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba, de los cuales no se encontraron muestras resistentes. Si bien, estos hospitales son de los que menos muestras utilizamos (1 en el de Granada, 3 en el de Córdoba) por lo que pudo haber sido azar. Por ello, en este estudio no se puede relacionar del desarrollo de la resistencia con la zona geográfica.

Con relación a los antibióticos utilizados para el tratamiento directo se han analizado sus valores de CMI50%, CMI90% y las tasas de resistencia para evaluar su efectividad. A continuación, se presentan los resultados obtenidos para cada uno de ellos:

- Metronidazol: Los resultados de metronidazol en nuestro estudio muestran una CMI50% de 0,094 µg/ml y una CMI90% de 0,25 mg/L, con una tasa de resistencia del 1,18%. Estos valores muestran una gran efectividad de este antibiótico contra la bacteria que con una concentración baja de metronidazol (0,25 µg/ml) se consiguieron inhibir casi todas las muestras. Estos resultados coinciden con los obtenidos en otros estudios a lo largo del tiempo, lo que indica que el metronidazol sigue siendo una opción terapéutica viable para *C. difficile*, y que está manteniendo su efectividad (1,29).

Sin embargo, a pesar de su buena actividad contra la bacteria, hoy en día no es el tratamiento favorito debido a su alta absorción en el tracto intestinal que predispone al paciente a un mayor riesgo de tener efectos sistémicos adversos, como por ejemplo la intolerancia digestiva (16). Por ello, no recomiendan tratamientos prolongados con metronidazol por el riesgo de neurotoxicidad y no se receta a gestantes y en la lactancia, además de que otros antibióticos como la vancomicina o la fidaxomicina muestran mejores resultados clínicos en general (16).

Por otro lado, aunque la literatura reporta tasas de resistencia globalmente bajas, un estudio en el Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid, halló una resistencia del 6,3% (29). No es una cifra preocupante, pero destacan la heterogeneidad de la resistencia y con ello la posibilidad de que cepas heterorresistentes contribuyan al fracaso terapéutico en situaciones clínicas específicas, por lo que recomiendan una vigilancia continua (29).

- Vancomicina: La vancomicina muestra una CMI50% de 0,38 mg/L y una CMI90% de 0,5 mg/L. En nuestro medio, un 1,78% de las muestras mostraron resistencia a este antibiótico, una cifra también baja. Aunque las CMI sean ligeramente más altas que las del metronidazol, también respaldan la eficacia de este antibiótico contra *C. difficile*, siendo actualmente el tratamiento de elección para infecciones graves por *C. difficile*.

Si bien, en algunas regiones han comenzado a reportarse tasas de resistencia a la vancomicina, como 5,7% en un estudio en Australia y más altas en algunas áreas de EE. UU. (26% en una investigación en Houton) y Kenia, (67% en un estudio en Nairobi) la vancomicina sigue siendo un tratamiento eficaz y seguro en la mayoría de los casos (30,31). Estas cifras sugieren que, aunque es importante seguir vigilando las tendencias de resistencia, con un uso adecuado y en seguimiento de los protocolos médicos, la vancomicina continúa siendo una opción válida y confiable para tratar infecciones por *C. difficile*.

- Fidaxomicina: En cuanto a fidaxomicina, los resultados obtenidos muestran una CMI50% de 0,125 mg/L y una CMI90% de 0,5 mg/L, y un 0,59% de cepas resistentes, que corresponde a una única muestra resistente a este antibiótico de las 169. Según estos resultados, la fidaxomicina es eficaz y segura para el tratamiento de infecciones causadas por *C. difficile*. Estudios similares recomiendan este antibiótico para el tratamiento de

pacientes críticos, inmunodeprimidos o con insuficiencia renal crónica (22). Así, explican que esto es debido principalmente a su estrecho espectro de acción, que le permite actuar de manera más dirigida, minimizando el impacto sobre la microbiota intestinal, siendo útil también en los casos de recurrencia, ya que permite una mayor preservación de la microbiota intestinal saludable, algo crucial para la recuperación ya que evita que se cree un ambiente favorable para el desarrollo de la bacteria (17). Además, el hecho de que no se absorba en el tracto intestinal evita efectos adversos sistémicos como pasaba con el metronidazol (16).

También se ha de tener en cuenta que otros estudios han señalado la falta de documentación y la aparición de casos aislados de *C. difficile* con resistencia emergente, sin olvidar que el principal inconveniente de la fidaxomicina es su alto costo, de forma que los comprimidos de fidaxomicina son más caros que los viales de vancomicina (1,16). A pesar de esto, algunos estudios han sugerido que la fidaxomicina podría ser rentable a largo plazo debido a su menor tasa de recaídas, lo que podría reducir la necesidad de tratamientos repetidos (16).

Por otro lado, también se evaluaron los valores de CMI50%, CMI90% y las tasas de resistencia de antibióticos no específicos para el tratamiento de *C. difficile*:

- Tigeciclina: La tigeciclina, con una CMI50% de 0,016 mg/L y una CMI90% de 0,032 mg/l, representando los valores de CMI más bajos hallados en este experimento. Estos resultados sugieren una actividad in vitro muy potente de la tigeciclina contra *C. difficile*, ya que las se inhibió el crecimiento de las bacterias con concentraciones muy bajas de antibiótico como se observa con la CMI90%. Sin embargo, la ausencia de puntos de corte establecidos por organizaciones como EUCAST o CLSI hace difícil su aplicación clínica, ya que no existen *breakpoints* que permitan clasificar las muestras en sensibles o resistentes. A pesar de ello, estudios previos han mostrado que la tigeciclina tiene una excelente actividad frente a cepas resistentes y podría ser útil como alternativa en infecciones graves o multirresistentes (32). Se requiere más investigación para definir su papel clínico y los parámetros adecuados para su uso.
- Meropenem: No se detectaron muestras de *C. difficile* resistentes al meropenem (0% de resistencia), se identificaron un 1,18% de cepas clasificadas como intermedias según la CLSI, y los resultados de sensibilidad a este antibiótico fueron de una CMI50% de 0,38 mg/L y una CMI90% de 0,75 mg/l, mostrando eficacia contra *C. difficile*, aunque relativamente menor en comparación con los antibióticos mencionados anteriormente. Si bien, otros artículos asocian el meropenem a una ICD de inicio tardío (33). Reportan que es cierto que *C. difficile* sigue siendo susceptible este antibiótico de amplio espectro de actividad bactericida cuya actividad betalactámica inhibe la síntesis del peptidoglicano de la pared celular de las bacterias gram-positivas, como es su caso, además de que alcanza concentraciones suficientes en el colon como para controlar la bacteria durante el tratamiento. Sin embargo, al finalizarlo, produce un post-tratamiento con condiciones

favorecedoras para la proliferación de *C. difficile* en el momento en el que la flora intestinal está en recuperación (33). Por otro lado, aunque el porcentaje de cepas resistentes es nulo en nuestro estudio y el de cepas intermedias es muy bajo, han surgido ribotipos resistentes a carbapenems como el 017 que es la principal cepa de linaje en Asia (10).

En conjunto, estos resultados sugieren que, aunque el meropenem no induzca resistencia de manera inmediata y sí tenga actividad contra *C. difficile*, su uso no es ideal para el tratamiento de infecciones por *C. difficile*, y deben considerarse enfoques terapéuticos más dirigidos y efectivos para evitar el riesgo de complicaciones y la alteración de la microbiota intestinal y así, la aparición de una ICD tardía.

- Piperacilina/Tazobactam: La piperacilina/tazobactam se posiciona como el tercer antibiótico menos eficaz frente a *C. difficile*, con una CMI50% de 2 mg/L y una CMI90% de 6 mg/L. Aunque estos resultados no son del todo desfavorables y su tasa de resistencia es prácticamente nula (0% de cepas resistentes y 0,59 % de cepas con sensibilidad intermedia) existen otros antibióticos con mejores perfiles de eficacia frente a *C. difficile*, resultando ser el tercero menos eficaz de los probados. Según la literatura, P/T puede mostrar cierta efectividad, pero no se considera una opción de primera línea debido a su efecto dual, por el cual, durante el tratamiento, alcanza concentraciones intestinales suficientes para inhibir *C. difficile*, pero tras la interrupción del tratamiento, puede favorecer la colonización al alterar la microbiota intestinal, un efecto que puede persistir durante semanas, algo similar a lo que sucedía con el meropenem (16). Por estas razones, a pesar de no tener malos resultados, se prefiere optar por alternativas con mejores perfiles de eficacia como terapia de primera elección frente a *C. difficile*.
- Ciprofloxacina: Los resultados obtenidos muestran una eficacia nula de la ciprofloxacina, con unas CMI50% y CMI90% superiores a 32 mg/l, además de que el 97,97% de las muestras mostraron resistencia a este antibiótico. En otras palabras, a excepción de 3, todas las muestras resultaron resistentes a este antibiótico. Estas altas tasas de resistencia preocupan y resuenan con estudios previos que muestran una resistencia creciente a las fluoroquinolonas en *C. difficile* debido probablemente a su uso de forma indiscriminada, incluso asociándolo a brotes epidémicos (10). Por ello se ha de controlar este antibiótico incluso en el tratamiento de otras infecciones, ya que la resistencia que ha desarrollado le supone una ventaja evolutiva que parece provocar que, en ambientes donde este antibiótico esté presente, se cree una presión selectiva y la cepa resistente se expanda, aprovechando que otras bacterias no pueden competir en esas condiciones (10).
- Ceftriaxona: Finalmente, los resultados para la ceftriaxona fueron de CMI50% de 16 mg/L y CMI90% de >256 mg/L. Además, se obtuvo un 19,53% de cepas resistentes a este antibiótico y un 30,18% de cepas intermedias. Estos datos indican que, aunque la CMI50% es moderada, el conjunto muestra una tasa de resistencia elevada ya que prácticamente la mitad de las cepas fueron resistentes e intermedias y la concentración más alta del E-Test

no consiguió inhibir el crecimiento del 90% de las muestras. Estudios similares relacionan estos resultados a mecanismos de resistencia que algunas cepas de *C. difficile* han desarrollado contra cefalosporinas de tercera generación, como es el caso de este antibiótico, como la producción de β -lactamasas (enzimas que destruyen el anillo β -lactámico de las cefalosporinas, volviéndolas ineficaces) y el uso de bombas de eflujo (para expulsar las cefalosporinas fuera de sus células) que las hace menos susceptibles a las cefalosporina (10). Así, resalta el riesgo del uso de este antibiótico y la necesidad de desarrollar estrategias terapéuticas que minimicen la diseminación de cepas resistentes.

6. CONCLUSIÓN

Este estudio resalta la importancia de una vigilancia microbiológica y clínica constante en la infección por *C. difficile*. Los antibióticos terapéuticos como metronidazol, vancomicina, fidaxomicina y tigeciclina presentan en general bajas tasas de resistencia. Fidaxomicina destaca por su alta eficacia y bajo desarrollo de resistencias, consolidándose como primera línea en casos graves o recurrentes. Vancomicina es efectiva, aunque ligeramente inferior. Metronidazol, pese a su sensibilidad, podría relegarse a un segundo plano debido a efectos adversos. Tigeciclina muestra gran actividad y potencial para ICD, pero requiere más estudios y la definición de puntos de corte de CMI. Los antibióticos no específicos para ICD presentan mayores valores de CMI y resistencia. Meropenem y piperacilina-tazobactam tienen diferencias notables, pero menos drásticas. En contraste, casi todas las cepas fueron resistentes a ciprofloxacina y un 49,71% resistentes o intermedias a ceftriaxona, lo que es relevante, ya que estos antibióticos pueden alterar el microbioma intestinal y favorecer *C. difficile*. Los datos sugieren una posible mayor resistencia a ceftriaxona en mujeres, aunque se requieren más estudios. Curiosamente, las únicas cepas sensibles a ciprofloxacina fueron de mujeres, un hallazgo inusual que también requiere mayor investigación. Finalmente, las diferencias entre hospitales no permiten establecer relaciones concluyentes.

7. FUTURAS PERSPECTIVAS

Es necesario seguir evaluando y actualizando los puntos de corte para antibióticos como para el metronidazol y vancomicina, para adaptar los tratamientos a la evolución de las cepas resistentes. La tigeciclina, por su potencial prometedor, requiere más investigación clínica que determine su papel y parámetros de uso. Además, la vigilancia constante y el uso racional de antibióticos seguirán siendo fundamentales para controlar las tasas de infección y resistencia. La identificación y caracterización genética sería de *C. difficile* será un estudio que permitirá un manejo más preciso de las cepas resistentes, y las nuevas terapias, como los agentes antimicrobianos dirigidos o las intervenciones microbiológicas, podrían ofrecer nuevas vías para mejorar los resultados a largo plazo.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Vitiello, A.; Sabbatucci, M.; Zovi, A.; Salzano, A.; Ponzio, A.; Boccellino, M. Advances in Therapeutic Strategies for the Management of *Clostridioides difficile* Infection. *J. Clin. Med.* 2024, 13, 1331. <https://doi.org/10.3390/jcm13051331>
2. Brindar K. Sandhu, Shonna M. McBride, *Clostridioides difficile*, Trends in Microbiology, Volume 26, Issue 12, 2018, Pages 1049-1050, ISSN 0966-842X, <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.09.004>
3. Markantonis JE, Fallon JT, Madan R, Alam MZ. *Clostridioides difficile* Infection: Diagnosis and Treatment Challenges. *Pathogens.* 2024 Jan 27;13(2):118. doi: <http://doi.org/10.3390/pathogens13020118>
4. Joanna Giles, April Roberts, Chapter Seven - *Clostridioides difficile*: Current overview and future perspectives, Editor(s): Rossen Donev, Advances in Protein Chemistry and Structural Biology, Academic Press, Volume 129, 2022, Pages 215-245, ISSN 1876-1623, ISBN 9780323992275, <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2021.11.003>
5. Curry S. *Clostridium difficile*. *Clin Lab Med.* 2010 Mar;30(1):329-42. doi: <http://doi.org/10.1016/j.cll.2010.04.001>
6. Meyer, S. L., Espinoza, A. R., & Quera, P. R. (2014). Infección por *Clostridium difficile*: epidemiología, diagnóstico y estrategias terapéuticas. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 25(3), 473–484. [https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(14\)70064-1](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(14)70064-1)
7. Voth DE, Ballard JD. *Clostridium difficile* Toxins: Mechanism of Action and Role in Disease. *Clin Microbiol Rev* 18: <https://doi.org/10.1128/cmr.18.2.247-263.2005>
8. Hernández M, de Frutos M, Rodríguez-Lázaro D, López-Urrutia L, Quijada NM and Eiros JM (2019). Fecal Microbiota of Toxigenic *Clostridioides difficile*-Associated Diarrhea. *Front. Microbiol.* 9:3331. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03331>
9. Baban, S. T., Kuehne, S. A., Barketi-Klai, A., Cartman, S. T., Kelly, M. L., Hardie, K. R., Kansau, I., Collignon, A., & Minton, N. P. (2013). The Role of Flagella in *Clostridium difficile* Pathogenesis: Comparison between a Non-Epidemic and an Epidemic Strain. *PLoS ONE*, 8(9), e73026. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073026>
10. Ishani Wickramage, Patrizia Spigaglia, Xingmin Sun, Mechanisms of antibiotic resistance of *Clostridioides difficile*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Volume 76, Issue 12, December 2021, Pages 3077–3090, <https://doi.org/10.1093/jac/dkab231>
11. Oleastro, M., Coelho, M., Gião, M. *et al.* Outbreak of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 - the recent experience of a regional hospital. *BMC Infect Dis* 14, 209 (2014). <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-209>
12. Ángel Asensio, Alberto Vallejo-Plaza, Lina M. Parra, Rafael Ortí-Lucas, Inmaculada Salcedo, Antonio Ramos, Mireia Cantero, Epidemiology of *Clostridioides difficile* infection in hospitalized patients in Spain: An eight-year review (2012–2019). *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica (English ed.)*, Volume 40, Issue 3, 2022, Pages 125-130, ISSN 2529-993X, <https://doi.org/10.1016/j.eimce.2021.04.008>

13. Liu C, Monaghan T, Yadegar A, Louie T, Kao D. Insights into the Evolving Epidemiology of *Clostridioides difficile* Infection and Treatment: A Global Perspective. *Antibiotics* (Basel). 2023 Jul 1;12(7):1141. doi: 10.3390/antibiotics12071141. PMID: 37508237; PMCID: PMC10376792.
14. Centers for Disease Control and Prevention. (2020). *Annual *Clostridioides difficile* infection (CDI) report, 2020*. Retrieved from <https://www.cdc.gov/hai/eip/Annual-CDI-Report-2020.html>
15. A.T. Abreu y Abreu, J.A. Velarde-Ruiz Velasco, M.R. Zavala-Solares, J.M. Remes-Troche, R.I. Carmona-Sánchez, J.M. Aldana-Ledesma, A. Camacho-Ortiz, R. Contreras-Omaña, R. Díaz-Seoane, C.T. Elizondo-Vázquez, E. Garza-González, G. Grajales-Figueroa, O. Gómez-Escudero, J.S. Jacobo-Karam, M. Morales-Arámbula, L.O. Olivares-Guzmán, J. Sifuentes-Osornio, A.G. Siu-Moguel, R. Soto-Solís, L.R. Valdovinos-García, M.A. Valdovinos-Díaz, G. Vázquez-Elizondo, S.A. Lazo-de la Vega Jasso, Consenso sobre prevención, diagnóstico y tratamiento de la infección por *Clostridium difficile*, *Revista de Gastroenterología de México*, Volume 84, Issue 2, 2019, Pages 204-219, ISSN 0375-0906, <https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2018.12.001>
16. Mateu, L., Fernández-Rivas, G., & Sopena, N. (2020). Diagnóstico y tratamiento de la infección por *Clostridioides difficile* [Diagnosis and treatment of *Clostridioides difficile* infection]. *Medicina Clínica*, 155(12), 514–523. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2020.02.005>
17. Chetna Dureja, Abiola O Olaitan, Julian G Hurdle, Mechanisms and impact of antimicrobial resistance in *Clostridioides difficile*, *Current Opinion in Microbiology*, Volume 66, 2022, Pages 63-72, ISSN 1369-5274, <https://doi.org/10.1016/j.mib.2022.01.004>
18. Eubank, T. A., Gonzales-Luna, A. J., Hurdle, J. G., & Garey, K. W. (2022). Genetic Mechanisms of Vancomycin Resistance in *Clostridioides difficile*: A Systematic Review. *Antibiotics*, 11(2), 258. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11020258>
19. Anilrudh A. Venugopal, Stuart Johnson, Fidaxomicin: A Novel Macrocyclic Antibiotic Approved for Treatment of *Clostridium difficile* Infection, *Clinical Infectious Diseases*, Volume 54, Issue 4, 15 February 2012, Pages 568–574, <https://doi.org/10.1093/cid/cir830>
20. DrugBank(n.d.). Tigecycline. Retrieved from <https://go.drugbank.com/drugs/DB08874>
21. Kounatidis D, Dalamaga M, Grivakou E, Karampela I, Koufopoulos P, Dalopoulos V, Adamidis N, Mylona E, Kaziani A, Vallianou NG. Third-Generation Tetracyclines: Current Knowledge and Therapeutic Potential. *Biomolecules*. 2024 Jun 30;14(7):783. doi: <http://doi.org/10.3390/biom14070783>
22. Kundrapu S, Sunkesula VC, Jury LA, Cadnum JL, Nerandzic MM, Musuuza JS, Sethi AK, Donskey CJ. Do piperacillin/tazobactam and other antibiotics with inhibitory activity against *Clostridium difficile* reduce the risk for acquisition of *C. difficile* colonization? *BMC Infect Dis*. 2016 Apr 18;16:159. doi: 10.1186/s12879-016-1514-2. PMID: 27091232; PMCID: PMC4835867.

23. A. Romero-Rodríguez, C. Martínez de la Peña, S. Troncoso-Cotal, C. Guzmán, S. Sánchez, Emerging alternatives against *Clostridioides difficile* infection, *Anaerobe*, Volume 78, 2022, 102638, ISSN 1075-9964, <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2022.102638>
24. World Health Organization. (2020, July 31). *Antibiotic resistance*. World Health Organization. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>
25. Stevens VW, Khader K, Echevarria K, Nelson RE, Zhang Y, Jones M, Timbrook TT, Samore MH, Rubin MA. Use of Oral Vancomycin for *Clostridioides difficile* Infection and the Risk of Vancomycin-Resistant Enterococci. *Clin Infect Dis*. 2020 Jul 27;71(3):645-651. doi: <https://doi.org/10.1093/cid/ciz871>
26. EUCAST. (2024). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 14.0. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Retrieved from <https://www.eucast.org>
27. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2012). *Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria; Approved standard—Eighth edition*. CLSI document M11-A8. Wayne, PA: CLSI.
28. EUCAST. (s.f.). *MIC and zone distributions and ECOFFs*. Recuperado de https://www.eucast.org/mic_and_zone_distributions_and_ecoffs
29. Peláez T, Cercenado E, Alcalá L, Marín M, Martín-López A, Martínez-Alarcón J, Catalán P, Sánchez-Somolinos M, Bouza E. Metronidazole resistance in *Clostridium difficile* is heterogeneous. *J Clin Microbiol*. 2008 Sep;46(9):3028-32. doi: 10.1128/JCM.00524-08. Epub 2008 Jul 23. PMID: 18650353; PMCID: PMC2546748.
30. Putsathit P, Hong S, George N, Hemphill C, Huntington PG, Korman TM, Kotsanas D, Lahra M, McDougall R, McGlinchey A, Moore CV, Nimmo GR, Prendergast L, Robson J, Waring L, Wehrhahn MC, Weldhagen GF, Wilson RM, Riley TV, Knight DR. Antimicrobial resistance surveillance of *Clostridioides difficile* in Australia, 2015-18. *J Antimicrob Chemother*. 2021 Jun 18;76(7):1815-1821. doi: <http://doi.org/10.1093/jac/dkab099>
31. Darkoh C, Keita K, Odo C, Oyaro M, Brown EL, Arias CA, Hanson BM, DuPont HL. Emergence of Clinical *Clostridioides difficile* Isolates With Decreased Susceptibility to Vancomycin. *Clin Infect Dis*. 2022 Jan 7;74(1):120-126. doi: <http://doi.org/10.1093/cid/ciaa912> PMID: 35016207; PMCID: PMC8752249
32. Lachowicz D, Pituch H, Wultańska D, Kuijper E, Obuch-Woszczyński P. Surveillance of antimicrobial susceptibilities reveals high proportions of multidrug resistance in toxigenic *Clostridium difficile* strains in different areas of Poland. *Anaerobe*. 2020 Apr;62:102167. doi: <http://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2020.102167> Epub 2020 Feb 13. PMID: 32109736.
33. Vardakas, K. Z., Trigkidis, K. K., Boukouvala, E., & Falagas, M. E. (2016). *Clostridium difficile* infection following systemic antibiotic administration in randomised controlled trials: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 48(1), 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.03.008>