



UNIVERSITAS
Miguel Hernández

Facultad de Ciencias Experimentales

Grado en Biotecnología

Curso académico 2024-2025

Interacción entre patógenos y antibióticos:
modelos *in vitro* para caracterizar la generación de
resistencias.

Autor: Andrea Ortiz Rodríguez

Tutor: Juan Carlos Rodríguez Díaz

Cotutora: María Paz Ventero Marín

Departamento: Producción Vegetal y Microbiología

Área: Microbiología

ÍNDICE

1. Índice de acrónimos	2
2. Resumen y palabras clave	3
3. Introducción	4
3.1 Patogenicidad	4
3.1.1 Toxinas A (TcdA) y B (TcdB)	5
3.1.2 Toxina binaria (CDT)	6
3.2 Esporas: producción y germinación	7
3.3 Transmisión y epidemiología	9
3.4 Diagnóstico	10
3.4.1 Detección de la GDH	11
3.4.2 Detección de TcdA y TcdB	11
3.4.3 Cultivo toxigénico	12
3.5 Tratamiento	12
3.5.1 Metronidazol	13
3.5.2 Vancomicina	13
3.5.3 Fidaxomicina	14
3.5.4 Tigeciclina	14
3.5.5 Transferencia de microbiota fecal	14
4. Antecedentes y objetivos	15
5. Materiales y métodos	16
5.1 Aislados clínicos	16
5.2 Medio de cultivo	17
5.3 Esterilidad del proceso	18
5.4 Siembra y crecimiento	18
5.5 Métodos de determinación de las CMI	20
5.6 Conservación de las cepas	21
5.7 Extracción y validación de ácidos nucleicos para la secuenciación masiva de fragmentos largos mediante ONT	21
6. Resultados y discusión	23
6.1 Vancomicina	23
6.2 Fidaxomicina	26
6.3 Origen de los cambios fenotípicos	28
7. Conclusiones y proyección futura	30
8. Bibliografía	31

1. Índice de acrónimos

ADP – Adenosín difosfato

ADN – Ácido desoxirribonucleico

ADNg – ADN genómico

Agar SDS – Agar Schaedler

AMR – Aumento de la Resistencia Antibiótica

ARN – Ácido ribonucleico

ARNpol – ARN polimerasa

C. difficile – *Clostridioides difficile*

CDT – Toxina binaria de *C.difficile*

CMI – Concentración Mínima Inhibitoria

DIN – DNA integrity number

FDX – Fidaxomicina

GDH – Enzima Glutamato Deshidrogenasa

GTD – Glucosiltransferasa

GTP – Guanosina trifosfato

ICD – Infección por *C. difficile*

IE – Inmunoensayos

MALDI-TOF – Matriz Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight

MTasas – Metiltransferasas

MTZ – Metronidazol

PBPs – Proteínas Fijadoras de penicilina

R-M – Sistema de restricción-modificación

SNP – Polimorfismos de nucleótidos únicos

TcdA/TcdB – Toxinas A y B de *C. difficile*

TGC – Tigeciclina

VNC – Vancomicina

2. Resumen

La infección causada por el patógeno anaerobio *Clostridioides difficile* es la principal causa de diarrea nosocomial y conlleva elevadas tasas de morbilidad, mortalidad y gasto sanitario. A pesar de la existencia de tratamiento antibiótico, existen un elevado porcentaje de fracasos con aparición de recurrencias. El antibiótico Metronidazol, considerado como principal opción durante años, ha demostrado ser menos eficiente que otros fármacos, por lo que hoy por hoy, en primera línea se encuentran los antibióticos Vancomicina y Fidaxomicina. La Microbiología clínica no analiza la sensibilidad antibiótica ya que esta patología no se diagnostica mediante cultivo, y por tanto, no se puede realizar el antibiograma. En este contexto, se consideraban todas las cepas como sensibles, aunque han aparecido trabajos que comunican la presencia de cepas resistentes a estos fármacos. Este trabajo analiza la barrera genética de estos fármacos mediante la exposición repetida a concentraciones subinhibitorias de los mismos; pretendiendo simular con este modelo *in vitro* una pauta posológica incorrecta. A pesar de la repetida exposición a los fármacos, ambos tienen gran dificultad para seleccionar mutantes resistentes, destacando que la Fidaxomicina cuenta con una mayor barrera genética que la Vancomicina.

PALABRAS CLAVE: *Clostridioides difficile*, ICD, Fidaxomicina, Vancomicina, resistencia

Abstract

Infection caused by the anaerobe pathogen *Clostridioides difficile* is the main cause of nosocomial diarrhoea, and implies high rates of morbidity, mortality and health input. Although it does exist antibiotic treatment, there is also a great rate of failure and recurrence appearing. Metronidazol, considered as the main option for years, has demonstrated to be less efficient than other treatments, therefore, currently only Vancomycin and Fidaxomicin are found in first line. Clinical microbiology does not analyse sensibility, since this pathology is not diagnosed through culture, and therefore, the antibiogram cannot be done; though all strains were considered sensible, some studies have communicated the existence of resistant strains to these antibiotics. This study analyses the genetic barrier of these treatments through the repeated exposure to subinhibitory concentrations of both; intending to simulate with this *in vitro* model an incorrect dosage. In spite of the repeated exposure, both have great difficulties in selecting resistant mutants, highlighting the great genetic barrier that Fidaxomicin has over Vancomycin.

KEY WORDS: *Clostridioides difficile*, CDI, Fidaxomicin, Vancomycin, resistance

3. Introducción

Clostridioides difficile fue reclasificado tras evidenciar la distancia filogenética con el género *Clostridium* (Lawson et al., 2016) en el que antes se encontraba incluido. Se trata de una bacteria anaerobia, Gram positiva, generadora de toxinas y esporas.

La infección por *Clostridioides difficile* (ICD), se considera un problema de salud pública; debido a sus elevadas tasas de morbilidad, mortalidad y recurrencia, uniendo a todo ello la presencia de variables que incrementan el riesgo como la estancia hospitalaria prolongada o edad avanzada (Alcalá-Hernández et al., 2016).

Su ciclo presenta tanto la forma vegetativa potencialmente productora de toxinas, y por tanto patógena; como la spora de resistencia, presente cuando las condiciones del medio se vuelven desfavorables. Se encuentra principalmente en muestras de heces humanas, suelo y agua (Sinnathamby et al., 2023); lo que se relaciona directamente con el hecho de que la ICD sea una de las infecciones nosocomiales más comunes. Un inadecuado procedimiento de higiene hospitalaria puede llevar a la transmisión fecal-oral entre pacientes; esto, unido a la mayor probabilidad de disbiosis del microbioma intestinal por hospitalización, acaba por provocar la germinación de las esporas en el colon dando lugar a la aparición de la infección (Buddle & Fagan, 2023).

La principal causa disbiosis intestinal resulta de la exposición a antibióticos de amplio espectro. El tratamiento con este tipo de antibióticos altera la eubiosis natural, situación aprovechada por *C. difficile* para colonizar el intestino. Dicha proliferación resulta en la aparición de sintomatología siempre y cuando estas cepas sean patógenas, productoras de toxinas. Las toxinas A y B, se integran en los colonocitos y alteran su metabolismo, causando la muerte celular; y por consiguiente produciendo diarrea, colitis e incluso colitis pseudomembranosa en los casos más extremos (Wang et al., 2025).

El p-cresol compuesto producido por *C. difficile* debido a la fermentación de la tirosina parece, además de dotar de su olor característico a “cuadra de caballo” (Alcalá-Hernández et al., 2016), favorecer la disbiosis gracias a la incapacidad de otras bacterias intestinales (especialmente Gram negativas) de tolerar este compuesto (Passmore et al., 2018).

3.1 Patogenicidad

Las cepas toxigénicas cuentan con el locus de la patogenicidad (PaLoc) que regula la producción de las exotoxinas A y B; ocupa una región de aproximadamente 19,6 kb (Figura 2A) (Buddle & Fagan, 2023) y puede encontrarse en distintos lugares del genoma (Monot

et al., 2015). Contiene 5 genes; dos de ellos codifican las toxinas A (*tcdA*) y B (*tcdB*), mientras que los otros tres codifican proteínas reguladoras: *tcdR*, *tcdE* y *tcdC*. *tcdR* es un factor sigma que regula positivamente la transcripción; mientras que *tcdC* actúa como un anti-factor sigma, regulando *tcdR* (Alam & Madan, 2024).

Mientras que *tcdE*, codifica proteínas tipo holinas (características de los bacteriófagos, permiten la liberación de los mismos mediante la alteración de la pared celular) que median la salida de las toxinas del medio intracelular (Govind & Dupuy, 2012).

3.1.1 Toxinas A (TcdA) y B (TcdB)

Ambas están formadas por 4 dominios funcionales. El N-terminal relacionado con la actividad catalítica (glucosiltransferasa, GTD), el C-terminal afín a la unión con el respectivo receptor de membrana, un dominio encargado de la formación del poro y otro con actividad autocatalítica para liberar el dominio GTD al citosol tras la formación del poro en la membrana del endosoma (Chandrasekaran & Lacy, 2017).

Aunque el porcentaje de identidad compartido entre ambas es relativamente elevado, un 47%, una de las principales diferencias reside en el dominio de unión a sus receptores de membrana. En el C-terminal se encuentran los dominios CROPS (Combined Repetitive Oligopeptides); para TcdA se determinaron como receptores objetivo diversos carbohidratos, entre los que se encuentran la sacarosa-isomaltosa (SI) y la glicoproteína 96 (gp96). Para TcdB se ha identificado como receptor de membrana CSP4 (proteoglicano 4 de sulfato de condroitina), y tras este, tanto NECTIN3, como varias proteínas “frizzled” (1,2 y 7) presentes en el epitelio intestinal (Chandrasekaran & Lacy, 2017).

A pesar de que en los inicios se considerase a TcdA como el mayor factor contribuyente a la toxicidad. TcdB, parece jugar un mayor rol en lo que respecta a la patogenicidad, la cada vez más acusada presencia de cepas A-B+, demuestra la independencia ante TcdA para mostrar toxicidad (Drudy et al., 2007).

El modo de acción ABCD (A, actividad biológica; B, unión; C, corte; D, entrega) que aplica a ambas es parecido, ya que su estructura multimodular define su mecanismo de acción (Jank & Aktories, 2008). Tras su unión a los receptores extracelulares (Figura 1B), son internalizadas mediante endocitosis mediada por clatrina (Papatheodorou et al., 2010). La acidificación del interior del endosoma produce cambios conformacionales; la región hidrofóbica de la proteína se expone, permitiendo su inserción en la membrana (Qa'Dan et al., 2000). Esto, permite la salida del dominio catalítico de las toxinas al citosol celular. El dominio N-terminal cuenta con

actividad GTD, tiene como objetivo la treonina 37 (Herrmann et al., 1998). La glucosilación en Thr37 impide la unión de Rho al GTP, manteniendo su forma inactiva (Jank & Aktories, 2008).

Debido al papel esencial de Rho como regulador del citoesqueleto; tras su alteración se produce la desorganización de las fibras de actina, la disrupción de las uniones celulares mediadas por la mismas, así como al redondeamiento celular (Pothoulakis, 2000). La disrupción de las uniones celulares causa la pérdida de la integridad de la barrera epitelial, y como consecuencia un aumento de la permeabilidad intestinal resultando en la aparición de diarrea.

De manera complementaria al daño celular, se secretan citocinas proinflamatorias como TNF- α y se reclutan tanto neutrófilos como monocitos (Figura 1A); en este proceso de activación del sistema inmune innato tras el inicio de la inflamación. Esto, suma a la mucosa inflamada placas blancas y amarillas, distintivas de la presencia de colitis pseudomembranosa; ya que las pseudomembranas están compuestas principalmente por detritos celulares, neutrófilos, fibrina y mucina (Poutanen, 2004).

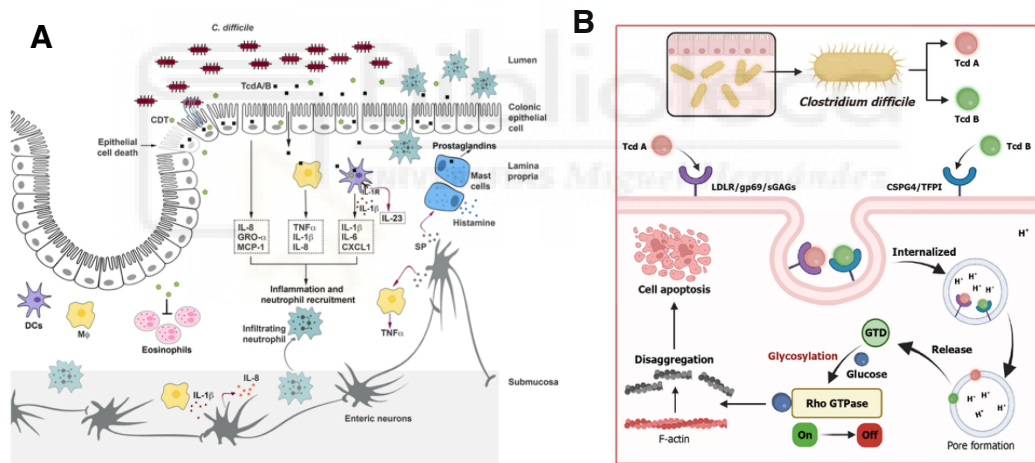


Figura 1. Mecanismo de patogenicidad de *C. difficile* mediado por TcdA y TcdB. **A)** Detalle de la cascada de señalización del sistema inmune iniciada tras su la entrada (Chandrasekaran & Lacy, 2017) **B)** Detalle del mecanismo de entrada y liberación de las exotoxinas en el interior de los colonocitos (Wang et al., 2025).

3.1.2 Toxina binaria (CDT)

La regulación de CDT es independiente del locus PaLoc, se encuentra en una región distinta de unos 6,2kb (Figura 2B). De nuevo, *tcdR*, actúa como un regulador positivo para su transcripción (Buddle & Fagan, 2023). La cantidad de cepas productoras de CDT se encuentra

en una horquilla de entre el 5 y el 30%, y normalmente, se asocian a la presencia de cepas hipervirulentas (Alam & Madan, 2024).

La CDT está compuesta por dos regiones: CDTa y CDTb. CDTa, cuenta con dos dominios que se encargan tanto de la interacción con CDTb como de la actividad catalítica (ADP-ribosilación de la actina), una vez la CDT es liberada en el citosol celular. Mientras, CDTb cuenta con 5 dominios que se centran en facilitar la entrada de CDTa al interior del citosol. Desde la unión del complejo CDTa-CTDb a la membrana hasta la formación del poro en la membrana del endosoma; incluyendo la activación y oligomerización necesarias que permiten el cambio de estructura para la formación de dicho poro (Martínez-Meléndez et al., 2022).

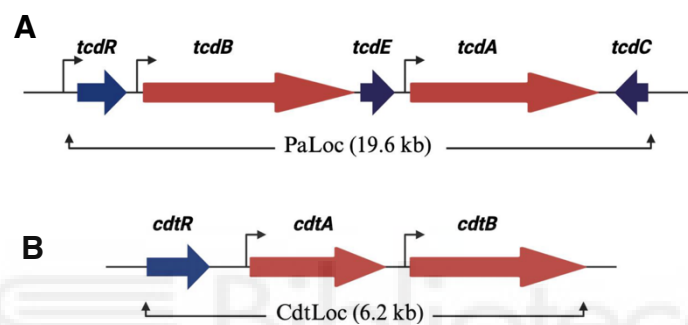


Figura 2. Organización de los genes de las toxinas en el genoma de *C. difficile* (Alam & Madan, 2024).

A) Representación de *PaLoc*. Los genes codificantes de toxinas se señalan en rojo, mientras que los azules representan los reguladores; las flechas indican la dirección de la transcripción. **B)** Representación del locus de la CDT.

En cuanto al mecanismo relativo a CDT; CDTb se une al receptor de lipoproteínas (LSR), altamente expresado en tejido intestinal. Recluta entonces a CTBa y el complejo es endocitado. Debido al cambio de pH en el interior del endosoma CDTb oligomeriza formando un poro en la membrana de este, permitiendo a CDTa translocarse al citosol. Donde el dominio catalítico de CDTa es capaz de ribosilar la actina (en la arginina 177), impidiendo su polimerización y provocando alteraciones en el andamiaje microtubular (Gerding et al., 2014). Cuando CDT se combina con TcdA y TcdB potencia la liberación de citoquinas proinflamatorias, agravando la reacción inflamatoria y la respuesta del hospedador (Alam & Madan, 2024).

3.2 Esporas: producción y germinación.

La producción de esporas altamente resistentes (al oxígeno, calor, desecación, luz UV...) potencia la transmisión de la bacteria, a la par que complica el seguimiento de su ciclo.

La regulación sobre la esporulación mediada por el gen *Spo0A*, permitió comprobar su papel en la correcta transmisión. La generación de mutantes defectivos en este gen conduce a la incapacidad de formar esporas, a la vez que lleva a una deficiente transmisión entre huéspedes murinos (Deakin et al., 2012).

El proceso de esporulación (Figura 3) comienza cuando las condiciones en el medio se vuelven indeseables: cambios en el pH, presencia de antibióticos o, principalmente, falta de nutrientes en el medio. La formación de un septo inicia el proceso de separación entre la proto-espora y la bacteria inicial. La futura espora recibe una copia del genoma completo y seguidamente es engullida, dando lugar a una espora inmadura, libre en el citoplasma bacteriano. La maduración resulta de la adición de capas protectoras a su recubrimiento. Finalizado el proceso las esporas son liberadas al medio gracias a la lisis bacteriana (Buddle & Fagan, 2023). La madurez de las esporas resulta clave para su resistencia, cada capa le confiere propiedades únicas que resultan en esta tenacidad.

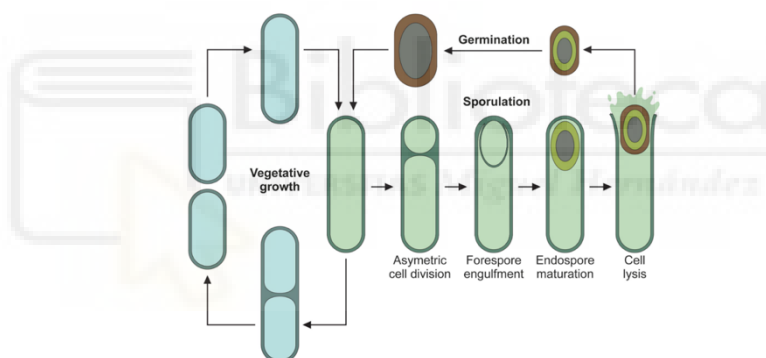


Figura 3. Ciclo de vida de *C. difficile* (Buddle & Fagan, 2023).

El alto porcentaje de ácido dipicolínico unido a calcio (Ca-DPA), hasta un 25%, contenido en el núcleo se encarga de deshidratar la espora; favoreciendo la disminución de la movilidad molecular y, aumentando, la resistencia térmica de las proteínas presentes en el núcleo. Además, las pequeñas proteínas ácido-solubles (SASPs) de tipo α/β , presentes en núcleo, se unen al ADN, ayudando a protegerlo de factores de daño (Setlow, 2014).

La membrana interna, situada inmediatamente después del núcleo parece jugar un papel clave en la prevención del acceso de químicos nocivos al núcleo (Setlow, 2014). De la misma forma, el manto juega con su impermeabilidad, sirviendo como primera barrera de protección; evitando, el paso de grandes enzimas que podrían conllevar la degradación de las capas internas.

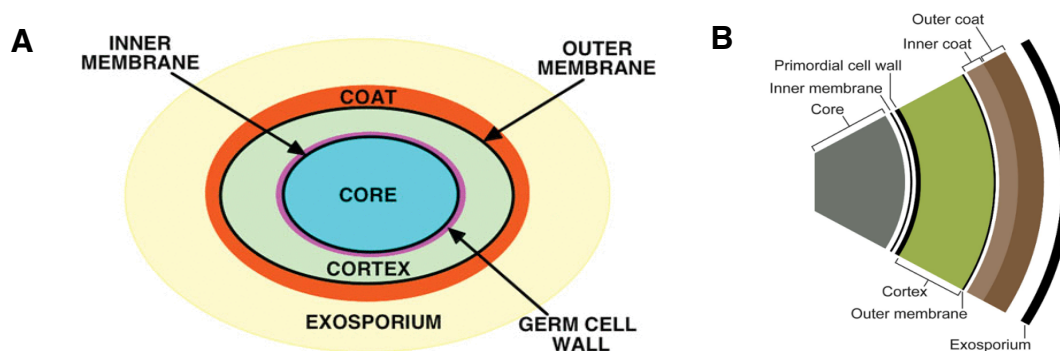


Figura 4. Representación de la sucesión de capas tras la maduración de las esporas. **A)** (Setlow, 2014) **B)** (Buddle & Fagan, 2023).

Cuando las esporas alcanzan el colon, la germinación se ve favorecida gracias a la presencia de ácidos biliares como el taurochocolate. Éste es detectado por una pseudoproteasa (CspC), la cual inicia una cascada de señalización que desencadena en la degradación de la corteza y la posterior rehidratación del ADN contenido en el núcleo (Buddle & Fagan, 2023). Tras la rehidratación, se reanuda el metabolismo y la germinación sucede rápidamente; a los 30 minutos las esporas están germinando de forma activa y entre los 90 y 180 minutos posteriores ya se da el crecimiento vegetativo normal (Dembek et al., 2013).

3.3 Transmisión y epidemiología

La principal causa de transmisión, en lo que respecta a la ICD, es de carácter nosocomial. Esto, sumado a una situación de disbiosis intestinal, generada bien por otra condición médica o bien por un tratamiento con antibióticos; resulta en las condiciones ideales para la proliferación de la bacteria y el desarrollo de la infección. Los principales reservorios resultan tanto las instalaciones hospitalarias contaminadas como los pacientes colonizados (Poutanen, 2004).

Aunque la transmisión se dé principalmente en hospitales, el ciclo de transmisión de *C. difficile*; resulta complejo, además de incompleto para el conocimiento actual. El enfoque “One health” (Alexiou et al., 2025) valora la contribución de elementos del propio sistema además del ambiente; como la salud animal o la cadena trófica.

Si bien la transferencia zoonótica no ha sido estrictamente demostrada; un análisis de polimorfismos de nucleótidos únicos (SNP) (Knetsch et al., 2018) demostraba que tanto cerdos como granjeros compartían cepas idénticas (SNP = 0) o casi idénticas (SNPs ≤ 2), sugiriendo que la transferencia podría no deberse únicamente a causas ambientales. Además, y aunque sin casos reportados, otro factor potencialmente significativo podría darse en la transferencia de esporas a través de la comida (Alexiou et al., 2025).

Durante el período 2016-2024 se ha descrito un aumento tanto del riesgo de adquisición comunitaria como hospitalaria. Aunque la incidencia es bastante inferior en la primera, la variación de la estimación de casos por 100.000 personas ha pasado de 14,34 (período 2005-2015) a 20,62. De igual modo, en la transmisión hospitalaria cada 1000 casos, ha aumentado de 2,24 a más de 4 (Akorful et al., 2025). El incremento acusa la creciente evolución epidemiológica de la ICD.

Para explicar esta potenciación en la última década no basta con tener en cuenta la transmisión nosocomial y las diferentes causas que llevan a la pérdida de la eubiosis. Numerosos factores de riesgo, así como la elevada tasa de recurrencia contribuyen a este incremento. En torno a un 20-25% de los pacientes tratados de ICD son susceptibles de sufrir recurrencias en los 20 días siguientes a la finalización del tratamiento; y entre un 3 y un 5% de sufrir más de 6 recurrencias (Bartlett, 2002).

En lo que se refiere a otros factores de riesgo, destacan principalmente: personas mayores de 65 años, inmunodeficiencia y situaciones de comorbilidad (Khanna & Pardi, 2012).

3.4 Diagnóstico

Según el protocolo establecido por la SEIMC (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica) entre un 1 y un 3% de la población general son portadores; así como, en torno a un 20% de los pacientes hospitalizados. Por ello, es importante determinar correctamente los parámetros bajo los que se recomiendan pruebas diagnósticas, con el objetivo de reducir posibles falsos positivos (Alcalá-Hernández et al., 2015). Se realizan las pruebas diagnósticas una vez descartados otros enteropatógenos y siempre y cuando el paciente presente 3 o más deposiciones líquidas en las últimas 24 horas (incluyendo los niveles del 5 al 7 de la escala de Bristol (Lewis & Heaton, 1997)(Alcalá-Hernández et al., 2015).

La determinación de diversos parámetros clínicos ayuda a la caracterización de la gravedad de la enfermedad. Entre ellos, el recuento leucocitario y la creatinina sérica. Recuentos superiores a 15.000 células/ μ L, muestran leucocitosis fruto de la elevada estimulación del sistema inmunitario. Del mismo modo, cuando los valores de la creatinina sérica superan 1,5 veces el nivel basal, la infección ha podido desencadenar en fallo renal (Ramos Martínez et al., 2011). A excepción de la presencia de comorbilidades, que puedan llevar a un aumento de estos parámetros, cuando se presentan estos valores se determina la ICD como grave; el añadido de otra sintomatología como íleo o megalocolon pueden incrementar el nivel de riesgo de la caracterización de la enfermedad (Alcalá-Hernández et al., 2015).

3.4.1 Detección de la enzima Glutamato Deshidrogenasa (GDH)

La GDH es una enzima esencial en el metabolismo de *C. difficile*, responsable de la conversión del glutamato en α -cetoglutarato. Producida en grandes cantidades por la mayoría de las cepas, tanto toxigénicas como no toxigénicas. Evaluando la acción del gen *gluD*, gracias a una cepa modificada en la que se interrumpe el mismo, se observó el papel de la GDH en la colonización intestinal. Ya que dicha cepa fue incapaz de colonizar el intestino de los hámsteres modelo (Girinathan et al., 2016).

Diferentes técnicas de inmunoensayos (IE) se comercializan para la detección de esta enzima. Se basan en la utilización de anticuerpos monoclonales, para evitar las reacciones cruzadas con proteínas homólogas provenientes de otras bacterias intestinales (Alcalá-Hernández et al., 2016). Dentro de la variedad de IE, se encuentran tanto enzimoimmunoensayos (tanto ELISA como CLIA) como técnicas de inmunocromatografía.

Los resultados positivos tras las pruebas determinantes de GDH, han siempre de complementarse con pruebas de toxicidad; ya que se puede tratar de cepas no toxigénicas o de una colonización no patógena.

3.4.2 Detección de las toxinas A y B

Al igual que para la detección de la GDH, existen numerosas técnicas de IE para detectar TcdA y TcdB. El inconveniente que presenta la detección directa de toxinas resulta la baja sensibilidad en comparación con el cultivo toxigénico (Alcalá-Hernández et al., 2015).

La aplicación de técnicas moleculares como la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) para la detección de los genes *tcdA* y *tcdB*, resulta una de las técnicas más fiables. La posibilidad de modificación de dianas para esta técnica permite la detección de diferentes cepas. Aunque se centren en la detección del gen *tcdB* para no omitir las cepas toxigénicas A-/B+, también existen dianas concretas para *tcdA* e incluso para ambos genes simultáneamente. Además, también se puede determinar la presencia de ribotipos hipervirulentos como el 027 gracias a que cuentan con delecciones concretas en el represor *tcdC* (Alcalá-Hernández et al., 2015).

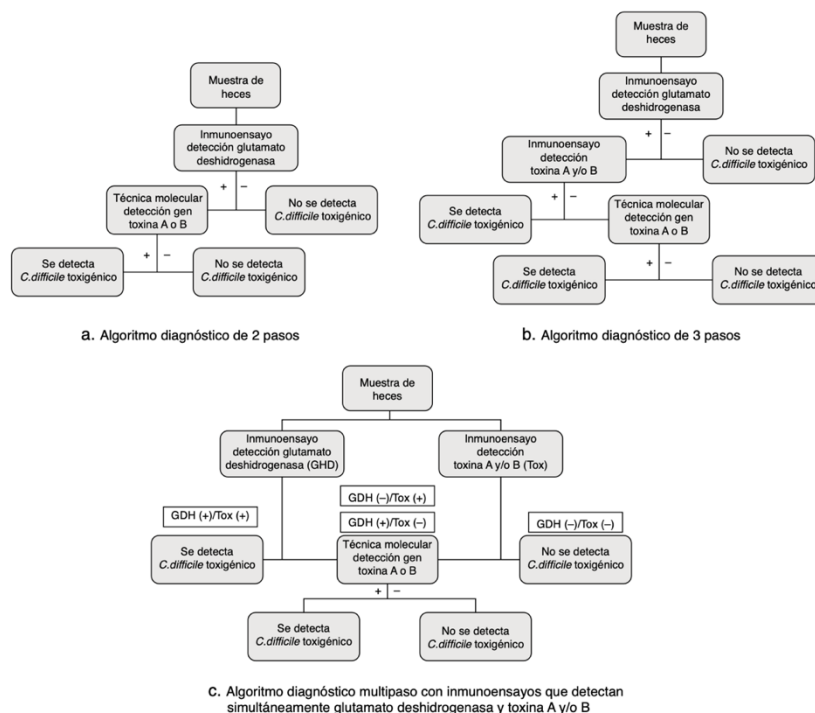


Figura 5. Algoritmos diagnósticos para la detección de *C. difficile* (Alcalá-Hernández et al., 2016).

3.4.3 Cultivo toxigénico

Se realiza una siembra en medio selectivo a partir de la muestra de heces, tras comprobar y seleccionar las colonias se realizan pruebas *in vitro* para determinar la presencia de TcdA y TcdB. Aunque resulta el perfecto método de referencia diagnóstica, debido a su elevada sensibilidad; la desventaja del tiempo de realización (entre 1 y 3 días) (Alcalá-Hernández et al., 2015) hace que no se utilice como prueba de primera línea.

3.5 Tratamiento

Debido a la falta de comparativas directas entre tratamientos, la pauta varía en función de la gravedad de la infección en el momento del diagnóstico, y de la cantidad de recurrencias sufridas (García, s. f.) (Figura 6).

Los tres antibióticos más ampliamente utilizados contra la ICD son el Metronidazol (MTZ), la Vancomicina (VNC) y la Fidaxomicina (FDX). A pesar de la gran aplicación del MTZ en los inicios de la lucha contra *C. difficile*, la aparición de resistencias lo ha desplazado como recurso ante la falta de disponibilidad de mejores opciones (Morado & Nanda, s. f.).

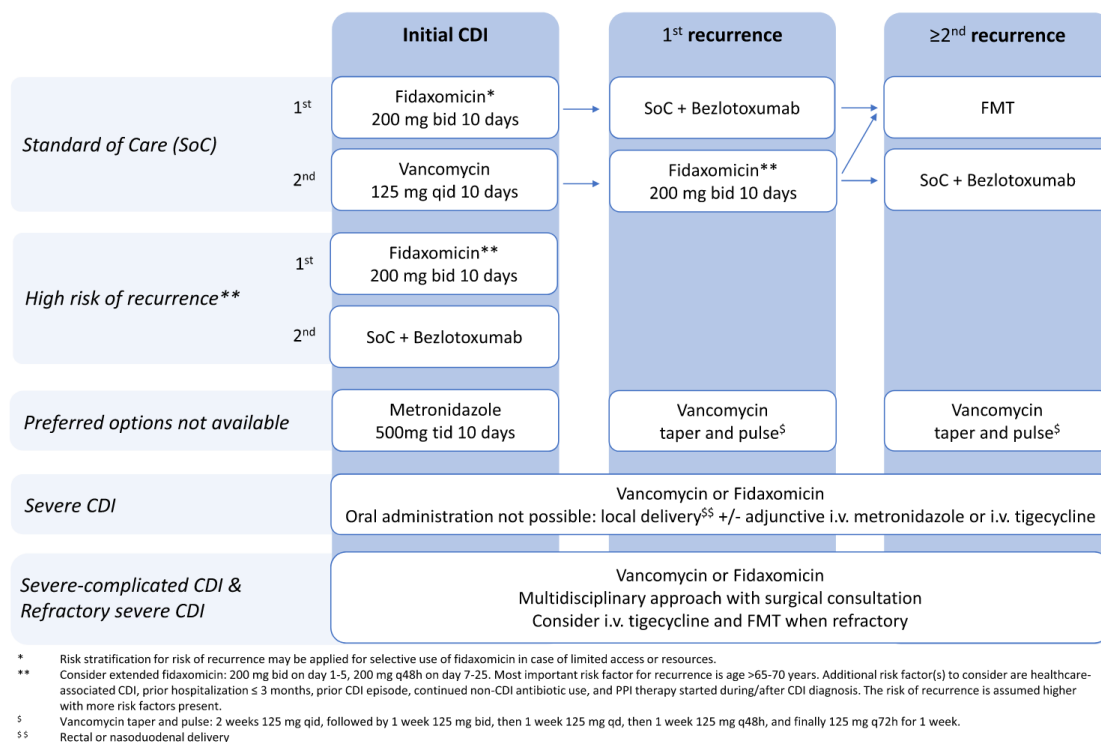


Figura 6. Pauta de tratamiento ante la ICD (Van Prehn et al., 2021).

El Bezlotoxumab es un anticuerpo monoclonal dirigido a la TcdB, utilizado junto con la pauta antibiótica correspondiente para reducir el riesgo de recurrencia (Van Prehn et al., 2021). Al unirse a la región CROP (encargada de mediar la unión con el receptor de membrana) de TcdB, previene su internacionalización y por tanto los efectos citotóxicos (Orth et al., 2014).

3.5.1 MTZ

Este antibiótico sufre una reducción una vez se encuentra en el interior celular. Los metabolitos reducidos cuentan con una potencial capacidad para dañar el ADN, provocando como consecuencia la muerte bacteriana (Piddock, 1998). Actualmente, el MTZ solo es indicado como tratamiento contra la ICD como segunda opción y se baraja su uso principalmente en zonas donde el acceso a las terapias antibióticas recomendadas puede resultar complejo.

3.5.2 VNC

La VNC se caracteriza como un antibiótico glicopéptido que inhibe el crecimiento bacteriano mediante la interrupción de la síntesis de la pared. Actúa uniéndose al extremo C-terminal del pentapéptido D-Ala-D-Ala, impidiendo la polimerización y por tanto la correcta síntesis de la pared (Lee et al., 2019).

La forma de administración puede ser en pulso o en tapering. El tapering consiste en la reducción progresiva de la concentración de antibiótico durante el tratamiento, y conlleva tratamientos más prolongados, mientras que por pulso se entiende la administración en períodos mayores a un día, siendo lo normal un tratamiento de 10 días. La combinación de ambas ha demostrado ser superior a la administración independiente (Shegal et al., 2021), manteniéndose como alternativa a los tratamientos predilectos.

3.5.3 FDX

Es un antibiótico macrocíclico cuyo componente activo es la lipiarmicina (Lin et al., 2018). El núcleo que conforma la RNA polimerasa se une al factor σ para formar el complejo promotor de apertura (RP0), que precede a la unión de la hebra molde de ADN, y, por tanto, a la síntesis de ARN. Este antibiótico inhibe el crecimiento bacteriano mediante la inhibición de la ARNpol; impidiendo la formación del complejo RP0 (Artsimovitch et al., 2012).

Aunque resulta menos perjudicial para la microbiota y su espectro de actividad es menor; su elevado coste limita su aplicación (Van Prehn et al., 2021).

3.5.4 Tigeciclina (TGC)

Actúa alterando la síntesis proteica mediante la unión a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano, perturbando como consecuencia el metabolismo de la bacteria e inhibiendo su proliferación (Korczak, s. f.). A pesar de la falta de estudios centrados en el uso de la TGC como terapia para la ICD, el óptimo resultado obtenido de su aplicación en casos de severidad hace que se mantenga como opción ante este tipo de situaciones límite (Larson et al., 2011).

3.5.5 Transferencia de microbiota fecal (TMF)

Tras dos recurrencias, y el fracaso del tratamiento antibiótico de todas las prescripciones anteriores se recomienda el TMF. Su éxito está altamente relacionado con la calidad de la muestra del donante: riqueza microbiana, salud general del individuo, etc. Terapias comerciales de restauración de la microbiota como RebyotaTM o VowstTM, han demostrado una eficacia similar tras su aplicación; en general el TMF resulta una manera eficaz y segura de tratar la ICD en casos extremos (Morado & Nanda, s. f.).

4. Antecedentes y objetivos

En las últimas décadas, se ha producido un considerable aumento de la resistencia antibiótica (AMR). Cuando los microorganismos pierden la sensibilidad a los tratamientos convencionales surge un problema de abordaje del tratamiento; volviéndose más difícil y, en ocasiones, hasta imposible llegar a combatir ciertas bacterias multirresistentes. Aunque resulta complejo determinar la evolución de la generación de resistencias, no cabe la menor duda de que el pronóstico tiende a la aparición de multitud de nuevos mutantes resistentes (Tackling drug-resistant infections, 2016). Cuando se centra el foco en *C. difficile* se suma otra limitación inherente a la naturaleza de la bacteria: la escasez de antibióticos altamente efectivos que crea un factor de riesgo añadido cuando se trata de generación de resistencias.

A pesar de que durante años el MTZ haya sido el tratamiento por excelencia, el aumento de cepas resistentes lo ha relegado a un segundo plano. Estudios derivados de aislados clínicos han demostrado mecanismos de inhibición contra el MTZ; como la presencia del plásmido pCD-METRO (cuyo mecanismo se desconoce) o la bomba de eflujo del transportador ABC CD2068 (Wickramage et al., 2021).

Del mismo modo, mutantes en el lugar de unión de la VNC a los precursores en la síntesis del peptidoglicano han demostrado la generación de resistencias (Wickramage et al., 2021). El cluster génico VanG, similar al operón de resistencia de *Enterococcus faecalis*; demuestra, gracias a su expresión constitutiva en cepas hipervirulentas un aumento de la resistencia. La sustitución de la D-Ala-D-Ala por D-Ala-D-Ser, reduce su afinidad como sustrato de la VNC permitiendo, la correcta formación de la pared bacteriana (Shen et al., 2020).

Aunque actualmente la FDX está mejor posicionada como tratamiento, principalmente por su menor tasa de recurrencia (Louie et al., 2011). Las cepas resistentes, en raras ocasiones reportadas, surgen de mutaciones en la subunidad β de la ARNpol (Wickramage et al., 2021).

En cualquier caso, un mejor conocimiento de estos mecanismos y de la respuesta de *C. difficile* ante la exposición a ambos antibióticos puede ayudar a prevenir la generación de resistencias; es por ello por lo que los objetivos de este Trabajo de Fin de Grado son:

- Comprobar el efecto de la exposición repetida a concentraciones subinhibitorias de antibiótico en *C. difficile*; simulando un incorrecto seguimiento de la pauta antibiótica prescrita.
- Demostrar la generación de nuevos fenotipos con una menor sensibilidad tanto a VNC como a FDX.
- Hipotetizar el origen de dichas mutaciones en función de la estabilidad observada a través del cambio observado en las CMLs, tras retirar la exposición al antibiótico.

5. Materiales y métodos

5.1 Aislados clínicos

Para el desarrollo de los experimentos se ha hecho uso del cepario de *C. difficile* propiedad del grupo de investigación en microbiología del Instituto de Investigación Sanitaria y Biomédica de Alicante (ISABIAL). Se seleccionaron 4 cepas criopreservadas a -80° , confirmando antes de su utilización la presencia de *C. difficile* mediante siembra en agar cromogénico (43871, Biomérieux) y MALDI-TOF.

El agar cromogénico, es diferencial además de selectivo; facilita la detección visual de *C. difficile* mediante la tinción de las colonias con un color negro o gris oscuro (Figura 7B). El cambio de tonalidad se produce debido a la hidrólisis de la esculina presente en el medio, en glucosa y esculetina (Figura 7A). La reacción únicamente se produce en presencia de la actividad β -glucosidasa de *Clostridioides*; dando lugar a la tinción de las colonias cuando la esculetina reacciona con el citrato férrico también presente en el medio (Connor et al., 2016).

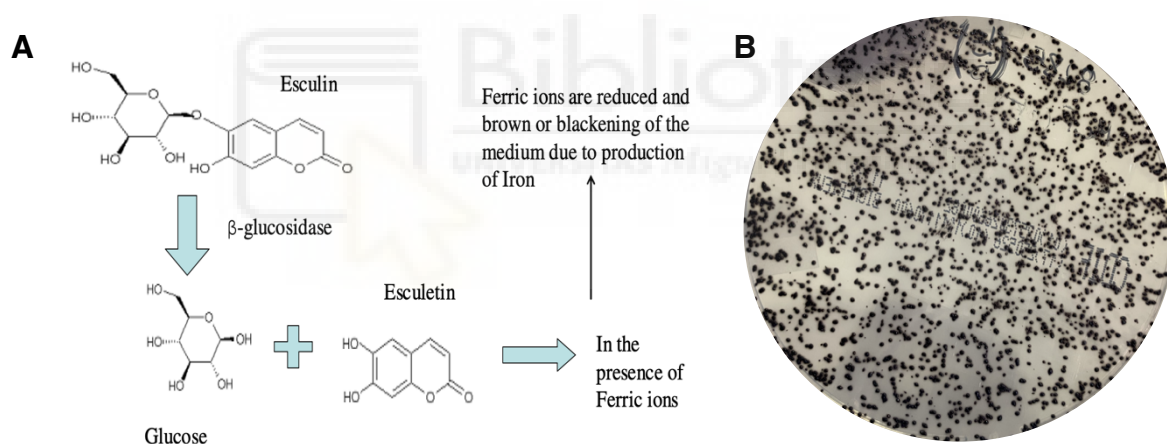


Figura 7. A) Representación de la hidrólisis de la esculina por acción de la β -glucosidasa (Veena, 2011). **B)** Crecimiento de *C. difficile* en agar cromogénico.

A su vez, para asegurar la presencia de bacterias del género *Clostridioides* y de la especie *difficile*, se recurrió a la técnica de espectrometría de masas MALDI-TOF (Bruker, EEUU). Confirmando la presencia de dicha bacteria al obtener una puntuación mayor o igual a 1,7 (Figura 8C).

Colonias aisladas fueron seleccionadas y se extendieron sobre el pocillo correspondiente de la tarjeta (Figura 8A). Posteriormente se añadió ácido fórmico, que ayuda a lisar la pared bacteriana contribuyendo a una mejor tasa de identificación (García et al., s. f.); y matriz, ácido

α -ciano-3,4-hidroxicinámico (HCCA), que permite ionización de las proteínas de la muestra, tras la sublimación del complejo muestra-matriz. Además, al absorber la matriz la mayor parte de la energía UV, se impide la excesiva fragmentación de la muestra, conservándola intacta para su identificación (García et al., s. f.).

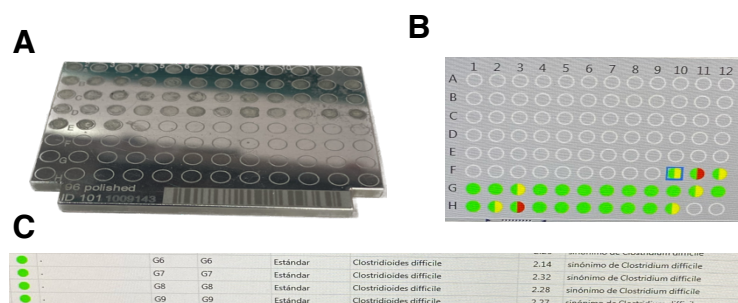


Figura 8. A) Tarjeta de MALDI-TOF con muestras preparadas en los pocillos. **B)** Resultados de la lectura según la identificación en la tarjeta. **C)** Desarrollo de los resultados con la identificación microbiana y su puntuación.

5.2 Medio de cultivo

La base de agar CM0601 *C. difficile* de Oxoid ha sido utilizada para la preparación del medio específico; al cual se ha añadido un 7% de sangre de caballo (ST0050C, Thermo Scientific, UK) como favorecedor del crecimiento y un vial de medio selectivo para *Clostridioides*, 125 mg D-cicloserina y 4 mg Cefoxitina (CM0601B, Oxoid).

Para la preparación de las placas se ha tenido en cuenta la capacidad del vial de suplemento selectivo; diseñado para 500 mL de medio. Tras la resuspensión de la cantidad necesaria de agar, 34,5 g, en el volumen total de agua desionizada y el autoclavado de la mezcla; se añadieron tanto el suplemento selectivo como la sangre. Valorando siempre la temperatura del medio, previa a la adición de cualquiera de estos suplementos. La resuspensión del vial D-cicloserina/Cefoxitina se recomienda a unos 50 °C, mientras que el 7% de sangre de caballo ha de añadirse a una temperatura algo menor para evitar la hemólisis. Posterior e inmediatamente antes de plaquear el medio, se añadió y homogeneizó el volumen correspondiente de antibiótico (en los 20mL totales de medio por placa) para obtener la concentración deseada. Las concentraciones utilizadas recogen desde 0,01 µg/mL hasta 64 µg/mL, preparadas a partir de stocks de 10 mg/mL y 5 mg/mL.

Las placas preparadas se conservan en nevera hasta el momento de su utilización y, siempre teniendo en cuenta las recomendaciones del fabricante. No superar los 7 días si el agar contiene sangre, y entre 5 y 7 días para medios selectivos (OXOID - Technical Support, s. f.).

Para los pases sin antibiótico se ha utilizado Agar Schaedler (SDS) (43401, Biomérieux), medio comercial enriquecido con un 5% de sangre de oveja.

5.3 Esterilidad del proceso

Con el objetivo de evitar contaminaciones todo el material utilizado ha de ser estéril. Siempre que el material no sea estéril y no pueda ser autoclavado (121°C, vapor), como en el caso de los tubos específicos para el McFarland; estos serán expuestos a luz UV-C en campana, durante al menos 30 minutos para disminuir la probabilidad de contaminación.

5.4 Siembra y crecimiento

Tras la verificación de la presencia de *C. difficile*, las muestras se incubaron en anaerobiosis durante 48 horas a 37 °C. A partir de estas se realizó un McFarland 0,5 utilizado para sembrar en césped, las placas correspondientes a ese pase. La siembra se llevó a cabo partiendo del control en concentración ascendente de antibiótico; en cada pase se sembraron al menos seis placas de concentraciones variables según la evolución de cada cepa. Siempre manteniendo un margen de al menos dos concentraciones por encima a la última placa crecida en la lectura del pase anterior.

En los sucesivos pases, tras la lectura, se seleccionó la placa crecida a mayor concentración; con ella se realizó el McFarland para la siembra del siguiente pase. De esta manera, se consigue seleccionar los mutantes; a la par que se favorece tanto la generación de nuevas mutaciones como el mantenimiento de las obtenidas. Una vez sembradas las placas se introdujeron en una bolsa de anaerobiosis, con su correspondiente secuestrador de oxígeno y una tira indicadora; si la anaerobiosis se ha realizado correctamente la tira habrá virado su color de azul claro a blanco. Se incubaron entonces en estufa a 37 °C durante 48h, y se comprobó el viraje de la tira indicadora.

Se realizaron un total de 15 pases consecutivos, siguiendo el sistema anterior en el cual se expusieron repetidamente las cepas a concentraciones subinhibitorias. Si en la evolución de los pases el valor de la CMI se aproximaba a la resistencia, la cantidad de pases era incrementada a 20.

En la sucesión de pases se establecieron 2 o 3 puntos de control. En los pases: 10,15 y 20, si lo hay. Cuando se alcanzaron, se llevaron a cabo tres tareas: criopreservación de la cepa, cálculo de la CMI y sucesión de tres pases sin antibiótico. Tras los pases en Agar SDS, se criopreservó de nuevo la cepa y se volvió a determinar la CMI. El objetivo era comprobar si

las mutaciones aparecidas (con su consecuente incremento de la CMI) eran estables o desaparecían tras retirar la exposición al antibiótico.

La siembra a partir de un McFarland 0,5, estaba condicionada a la utilización de una placa fresca. Si había que repetir algún pase, el valor del McFarland aumentaba a 1 (teniendo en cuenta la antigüedad de la placa).

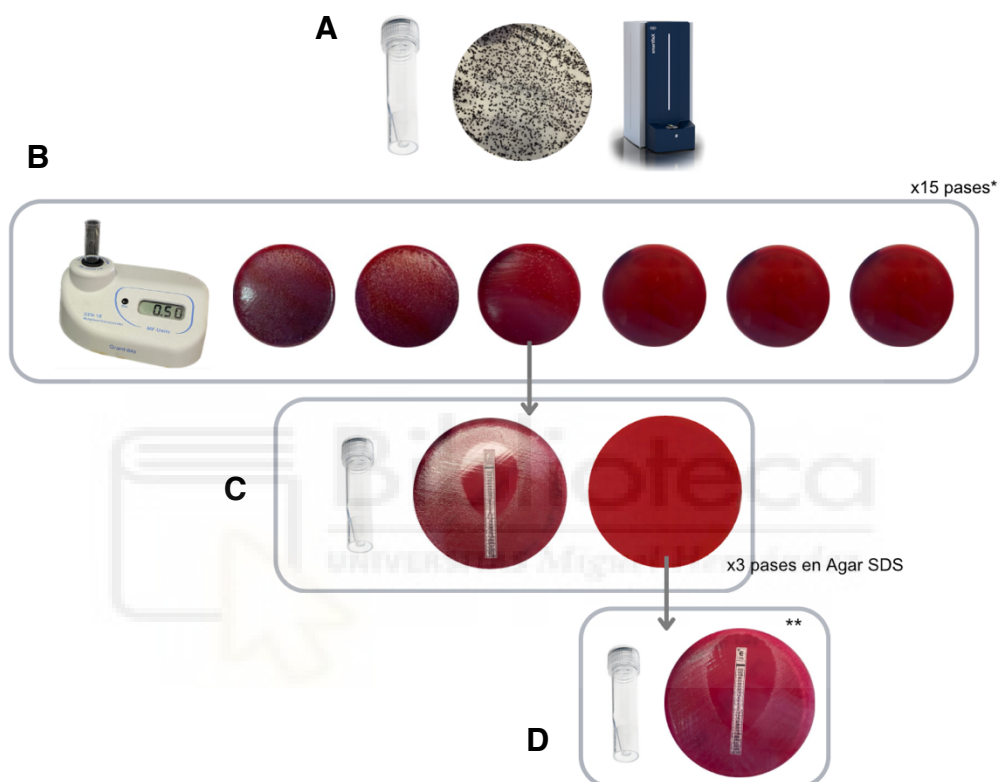


Figura 9. A) Comprobación de la presencia de *C. difficile* mediante la siembra en Agar cromogénico y MALDI-TOF. **B)** Ejemplo de un ciclo de pases. En total se realizaron 15 pases (*20 si la cepa llegaba a una CMI cercana a la que marca la resistencia) exponiendo a la cepa a concentraciones subinhibitorias de VNC o FDX; se sembró en césped a partir de un MacFarland 0,5 en 6 placas. Sembrando en concentración ascendente a partir del control. Para realizar el siguiente pase se tomó la placa crecida a mayor concentración. **C)** Cuando se alcanzaron los puntos de control 10,15 y 20 (si lo hay); se congeló la cepa, se midió la CMI y se comenzó una sucesión de 3 pases Agar SDS. **D)** Tras las tres exposiciones se congeló de nuevo la cepa y se volvió a medir la CMI. **La figura representa el procedimiento para la VNC, con medición de la CMI mediante E-Test en Agar SDS. Para la FDX, debido a la falta de E-Test comerciales, se determinó la CMI a través de siembra en placas, con gradiente ascendente de concentración.

5.5 Métodos de determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias

El Test Épsilon (E-Test), permite evaluar cuantitativamente y de forma sencilla la CMI para multitud de antibióticos. Consiste en una tira con un gradiente del antibiótico deseado (de 0,016 a 256 µg/mL para la VNC); este difunde una vez en contacto con la placa y comienza a inhibir, o no, el crecimiento de la bacteria. Tras la incubación, se observa una elipse de inhibición, en la que se puede determinar fácilmente el valor de la CMI, viendo la intersección elipse-tira (Sergio Jaramillo, 1998)



Figura 10. A) Modelo E-Test VNC. **B)** Elipse de inhibición de la VNC en *C. difficile*, agar SDS.

Las CMIs de la VNC fueron establecidas, para cada punto de control, con sus correspondientes E-Test. Para ello, se realizó una siembra en césped (Agar SDS) sobre la cual se depositó la tira; intentando evitar la formación de burbujas durante la colocación. Pequeñas burbujas pueden entorpecer la difusión del antibiótico contenido en la tira, alterando el valor de la CMI.

La ausencia de E-test comerciales para la FDX implicó la determinación de su CMI mediante siembra en placas con gradiente ascendente de concentración. Tras cada punto de control, se realizó un pase extra siguiendo el mismo procedimiento que para la siembra convencional.

En la lectura se establece la CMI con el valor de la placa con menor concentración en la que no se observó crecimiento. Teniendo en cuenta el posible error humano en la preparación de las placas. Una vez terminados los pases se realizó una comprobación para asegurar la validez de los datos obtenidos para la FDX (Figura 16). Para minimizar el error en la interpretación se sembraron las tres variantes de la cepa en la misma placa (original, último pase realizado y éste, tras la exposición a placas sin antibiótico). La siembra se realizó directamente desde la cepa conservada en criotubo a -80 °C, 10 µL en cada tercio correspondiente. Las placas abarcan las concentraciones necesarias para incluir las CMIs de las tres variantes, y al menos una placa por encima a la concentración más alta.

5.6 Conservación de cepas

Con el propósito de secuenciar posteriormente las cepas para evaluar el tipo y estabilidad de las mutaciones aparecidas; todas se criopreservaron por duplicado en cada uno de los puntos control. Se conservan a -80 °C en 1 mL de tioglicolato+glicerol.

5.7 Extracción y validación de ácidos nucleicos para la secuenciación masiva de fragmentos largos mediante tecnología Oxford Nanopore.

Tras la preparación (adición de PBS y Buffer de lisis) e incubación de la muestra durante 30 minutos, la obtención de ADN se llevó a cabo utilizando el kit 202 de la tecnología MagCore (MVN400-04, RCB-Bioscience).

Se añadieron proteinasa K, PBS y “Carrier” a la muestra incubada, completando los 400 µL que se introdujeron en el MagCore. La lisis de los pasos previos permite la unión de las partículas magnéticas al ADN; el cual, tras varios lavados se libera de dichas partículas gracias a la adición de un buffer de baja fuerza iónica. Se obtuvo finalmente el ADN en el volumen seleccionado inicialmente, 40 µL.

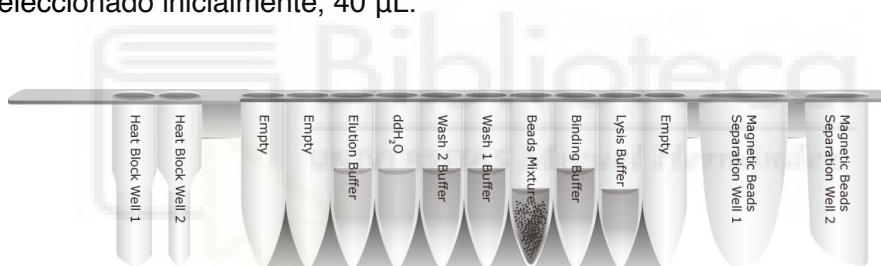


Figura 11. Detalle del kit de extracción 202 MagCore (RBC Bioscience, 2018)

Una vez obtenido, el ADN se cuantifica y verifica la calidad de la muestra. Validando, mediante técnicas fluorimétricas (Qubit), la concentración de las muestras con al menos 30 ng/µL.

La TapeStation es la técnica electroforética utilizada para comprobar la integridad del ADN obtenido a partir de las muestras. Existe un estándar para el control de calidad: una escala de integridad del ADN. El DIN (DNA integrity number), determina el porcentaje de degradación de la muestra, tomando el 10 como referencia de una muestra intacta. Para garantizar el éxito de las posteriores técnicas interesa contar con valores DIN lo más elevados posible; de este modo se reducen los pequeños trozos formados por pocos pares de bases, que pueden llegar a interferir en la secuenciación.

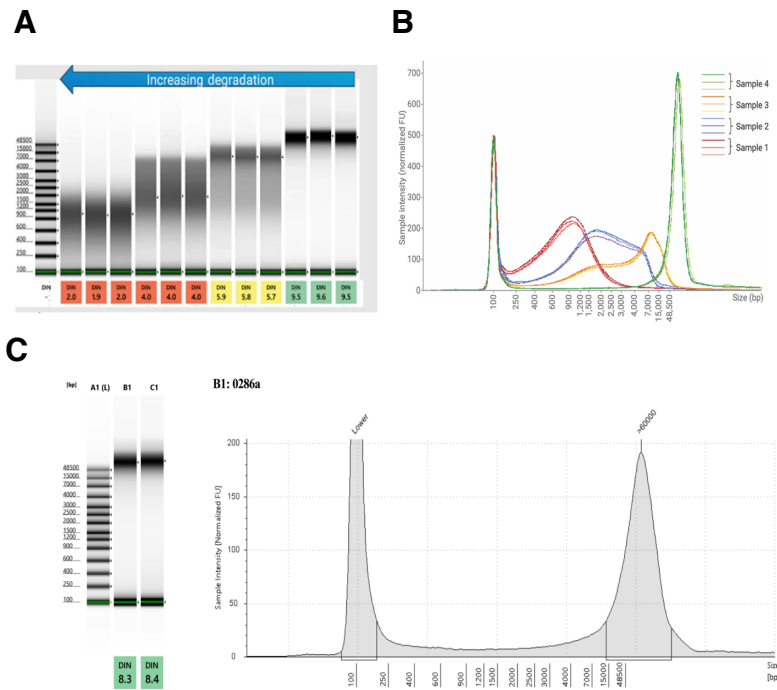


Figura 12. A) Resultados de la electroforesis según la degradación de la muestra, en orden de DIN ascendente (Genomic DNA Quality Control, TapeStation I Agilent, s. f.) **B)** Gráfica correspondiente a las muestras de la Figura 12A (Genomic DNA Quality Control, TapeStation I Agilent, s. f.), siendo los resultados de “Sample 4” el objetivo para validar la calidad de muestras en este experimento. **C)** Resultados de la validación del ADN de la cepa original 0286.

Para secuenciar las cepas y sus variantes obtenidas se utilizó la tecnología ONT (Oxford Nanopore Technologies), la cual permite la secuenciación masiva de fragmentos largos (hasta más de 4Mb) gracias a su metodología basada en nanoporos. Cuando las bases atraviesan el nanoporo alteran la corriente que lo atraviesa de forma diferente según cada base. La divergencia entre señales es utilizada por el algoritmo para decodificar la secuencia de la cadena inicial. Obteniendo de este modo el resultado de la secuenciación en pocas horas.

6. Resultados y discusión.

6.1 VNC

Con el objetivo de evaluar la generación de resistencias se ha utilizado el punto de corte clínico establecido por EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing); para la VNC: 2 mg/L (ESCMID - European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 2008, s. f.). Considerándose resistentes únicamente aquellas cepas que superen dicho valor.

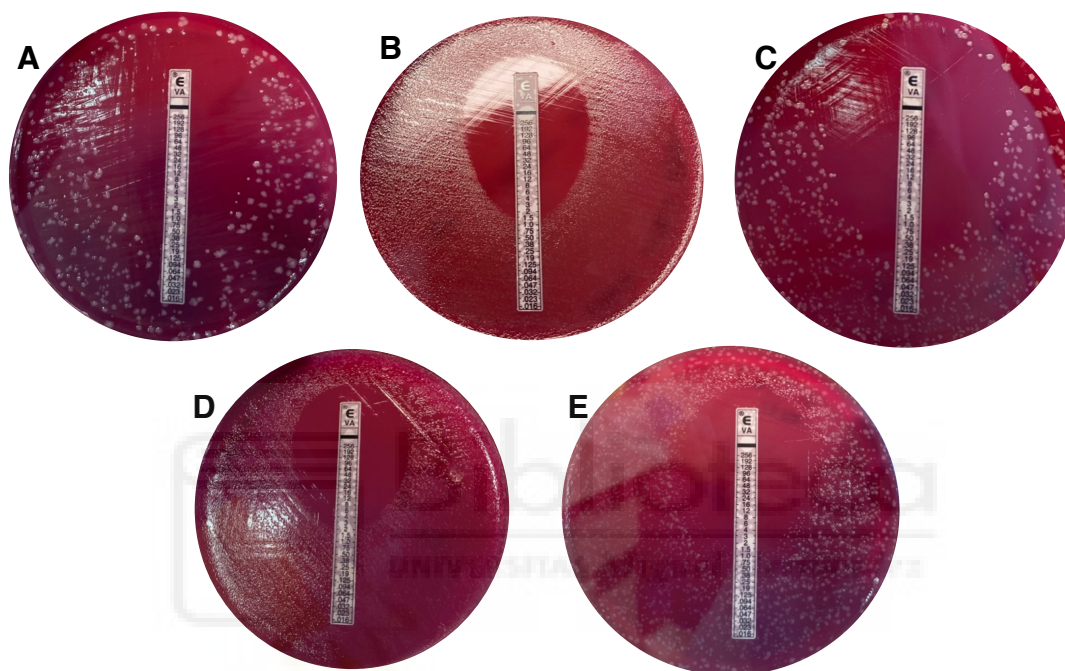


Figura 13. Ejemplo de comprobación de las CMI de la Cepa 0286 mediante medición cuantitativa con E-Test, para VNC. **A)** CMI de la cepa original 0286, 0,094 µg/mL. **B)** CMI en el pase 15, 1,5 µg/mL. **C)** CMI en el pase 15 tras la exposición a tres pases sin antibiótico, 0,125 µg/mL. **D)** CMI en el pase 20, 2 µg/mL. **E)** CMI en el pase 20 tras la exposición a tres pases sin antibiótico, 1,5 µg/mL.

CMI VNC (µg/mL)							
	Cepa	P.10	P.10,3	P.15	P.15,3	P.20	P.20,3
5444	0,25	0,25	0,25	0,25	0,19	-	-
5303	0,19	0,5	0,125	0,5	0,25	-	-
0286	0,094	0,5	0,125	1,5	0,125	2	1,5
6648	0,125	0,25	0,25	0,25	0,25	-	-

Tabla 1. Valores de las CMI para VNC obtenidas tras la sucesión de pases. Concentraciones en µg/mL. En las columnas se observa el número de pase al que fue realizada la determinación mediante

E-test; siendo “Cepa” la medición original de la CMI sin exposición a antibiótico, P.”X” el pase número “X” de la sucesión y P.X “,3” el mismo pase tras la retirada de la VNC.

La cepa 6648, al alcanzar el pase 10 (0,25 µg/mL) ya había duplicado su CMI original (0,125 µg/mL). Como se observa en la Figura 14A, el incremento se detiene en ese momento ya que se mantiene el mismo valor al alcanzar el pase 15. Sin embargo, este exhibe el ejemplo ideal de adquisición de mutaciones estables. Pues, tras retirar la exposición al antibiótico, tanto a continuación del pase 10 como del 15, la cepa siguió mostrando el doble de la CMI original.

La cepa 0286, se llevó hasta el pase número 20 ya que en el pase 15 mostraba una CMI de 1,5 µg/mL (cercana al corte de resistencia: 2 µg/mL). Al pase 20, la cepa alcanzaba la concentración del corte, sin embargo, al no superarla no se puede afirmar la aparición de mutantes resistentes a VNC a lo largo del experimento. En la sucesión de pases se produjo un aumento sustancial a partir del décimo, donde se observaron CMIs de 0,5 µg/mL, 1,5 µg/mL y 2 µg/mL en los pases: 10, 15 y 20, respectivamente. No obstante, como se advierte en la Figura 14B, tras retirar la exposición a VNC se produce un descenso de la CMI en cada uno de ellos. Cabe, sin lugar a duda, destacar el papel que jugó en este caso la continuación de los pases hasta el vigésimo. Mientras la CMI en el pase 15,3 se quedaba en 0,125 µg/mL, en el pase 20,3 aumentó hasta 1,5 µg/mL. Lo que parece demostrar que, aunque no se alcanzase la resistencia, la continuación puede haber potenciado la estabilización de la mutación en esta cepa.

Para la cepa 5444, se obtuvo un valor de CMI de 0,25 µg/mL tras la cuantificación posterior a todos los pases, salvo en el caso del 15,3, el cual mostró una CMI de 0,19 µg/mL. Teniendo en cuenta la cercanía de este valor con los anteriores y la dificultad que supondría una ganancia de sensibilidad respecto a la cepa original; la interpretación de este parece estar sujeta a la influencia de un leve error metodológico, bien sea de lectura o de colocación del E-test. Independientemente, se puede afirmar la falta de influencia de la exposición a concentraciones subinhibitorias en la cepa 5444 (Figura 14C).

La cepa 5303 ascendió a 0,5 µg/mL, y mantuvo dicha CMI en los pases 10 y 15. Al igual que con la cepa 0286, tras retirar la exposición a la VNC, la CMI vuelve a valores cercanos a la original: 0,19 µg/mL. De nuevo, se observa en el pase 10,3 una CMI de 0,125 µg/mL, inferior a obtenida originalmente; del mismo modo que en la cepa 5444, ha de tratarse de un error metodológico.

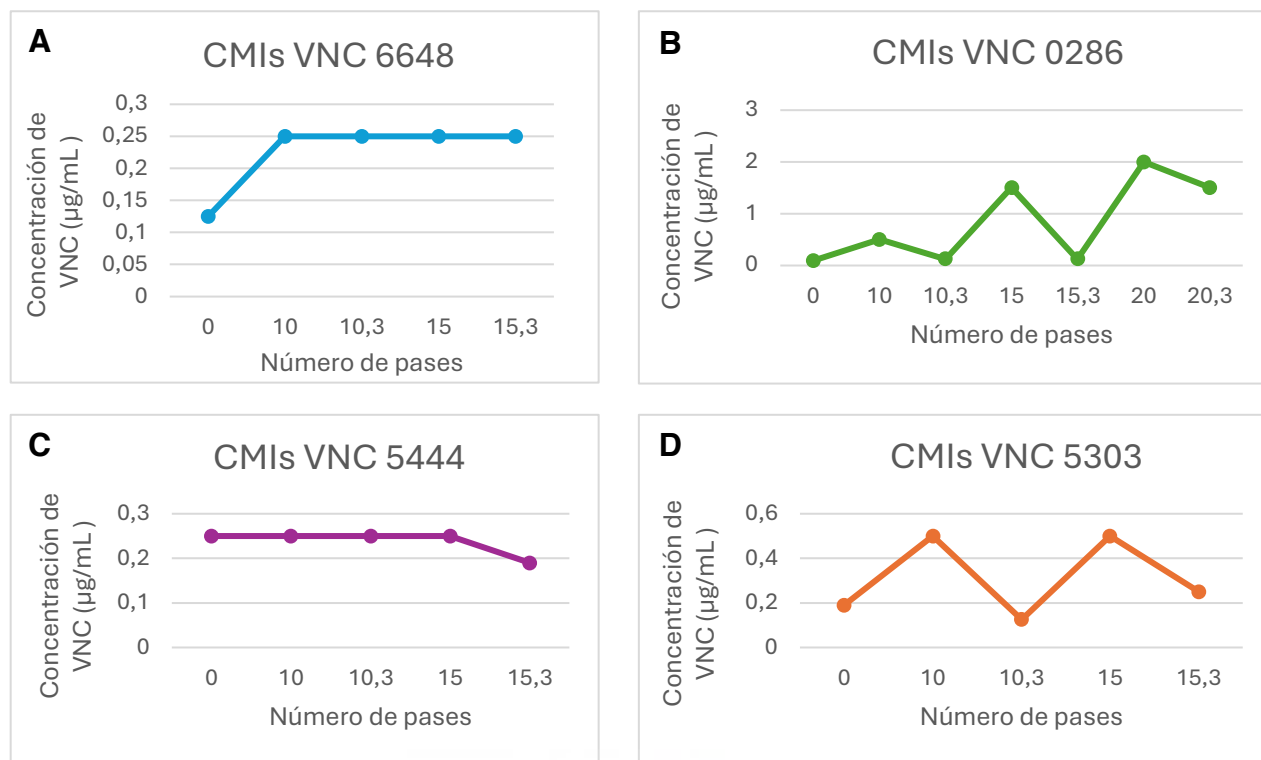


Figura 14. Detalle de la evolución de las CMI's para cada una de las cuatro cepas tras la exposición a VNC.

Las cuatro cepas, mostraron tres situaciones posibles:

- i) La estabilidad de la CMI ante la exposición repetida a concentraciones subinhibitorias (Cepa 5444).
- ii) El aumento en la CMI, sin llegar a adquirir resistencia, y el mantenimiento de este aumento después de retirar la VNC (Cepa 6648).
- iii) El aumento, en mayor o menor magnitud, del valor de la CMI; seguido, en todos los casos, de su pérdida (Cepas 0286 y 5303).

Estudios recientes han evaluado las resistencias a VNC, en los que en torno a un 3% de las cepas resultaban resistentes (Dilnessa et al., 2022)(Zhang et al., 2024). Hasta ahora, la resistencia a VNC se ha relacionado con la presencia de mutaciones en el cluster génico *VanG*. *VanT*, responsable de codificar la Serina racemasa que convierte la L-Ser en D-Ser; *VanG* productor de una ligasa D-Ser-D-Ala, y *VanY* de una D,D-carboxipeptidasa, susceptible de trincar los residuos de D-Ala presentes en el C-term. Estas tres variaciones contribuyen a la sustitución del dipéptido D-Ala-D-Ala por D-Ser-D-Ala, disminuyendo la capacidad de unión de la VCN por la escasez del dipéptido de Ala por el que presenta gran afinidad; resultando en un aumento de la resistencia antibiótica (Wickramage et al., 2021)(Buddle et al., 2024).

En cualquier caso, las tres situaciones fruto de los ensayos muestran la dificultad que presenta *C. difficile* para generar mutantes estables, resistentes a VNC. Los datos respaldan el hecho de que la VNC es un antibiótico con una fuerte barrera genética; entendiendo esta, como la dificultad de generar los mutantes resistentes a dicho antibiótico.

6.2 FDX

Del mismo modo que para la VCN, se utilizó el punto de corte clínico establecido por EUCAST para la FDX: 0,5 mg/L (ESCMID - European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 2008, s. f.). Considerándose resistentes únicamente aquellas cepas que superen dicho valor.

CMI FDX (µg/mL)							
	Cepa	P.10	P.10,3	P.15	P.15,3	P.20	P.20,3
5444	0,06	1	0,12	2	1	2	0,25
5303	0,12	0,25	0,12	0,5	0,12	-	-
0286	0,03	0,06	0,06	0,12	0,06	-	-
6648	0,12	0,5	0,25	2	0,25	4	0,5

Tabla 2. Valores de las CMIs para FDX obtenidas tras la sucesión de pases. Concentraciones en µg/mL. En las columnas se observa el número de pase al que fue realizada la determinación mediante siembra en placa con concentración ascendente de FDX; siendo “Cepa” la medición original de la CMI sin exposición a antibiótico, P.”X” el pase número X de la sucesión y P.X “,3” el mismo pase tras la retirada de la FDX.

Tanto la cepa 5444 como la 6648 fueron llevadas hasta el pase 20, ya que en el pase 15 mostraban una CMI de 2 µg/mL; concentración superior al punto corte para la resistencia (0,5 µg/mL) y que, por tanto, demuestra la aparición de mutantes resistentes a FDX. Sin embargo, en ambos casos desaparecieron tras los pases sin FDX. En ambos casos la CMI 20,3 se establecía en 0,25 µg/mL, cercana a la CMI original de las cepas.

La cepa 5303 (Figura 15C) cuadruplicó el valor inicial de su CMI al alcanzar el pase 15; no obstante, la lectura de las determinaciones posteriores a la eliminación de FDX demostraron el retorno, en todos los puntos de control, a su valor inicial.

La cepa 0286 (Figura 15D) mostró una evolución similar a la 5303, volviendo a un valor de CMI cercano al original tras la finalización de los pases. Aunque el incremento en el valor de la CMI fuese notablemente inferior en este caso.

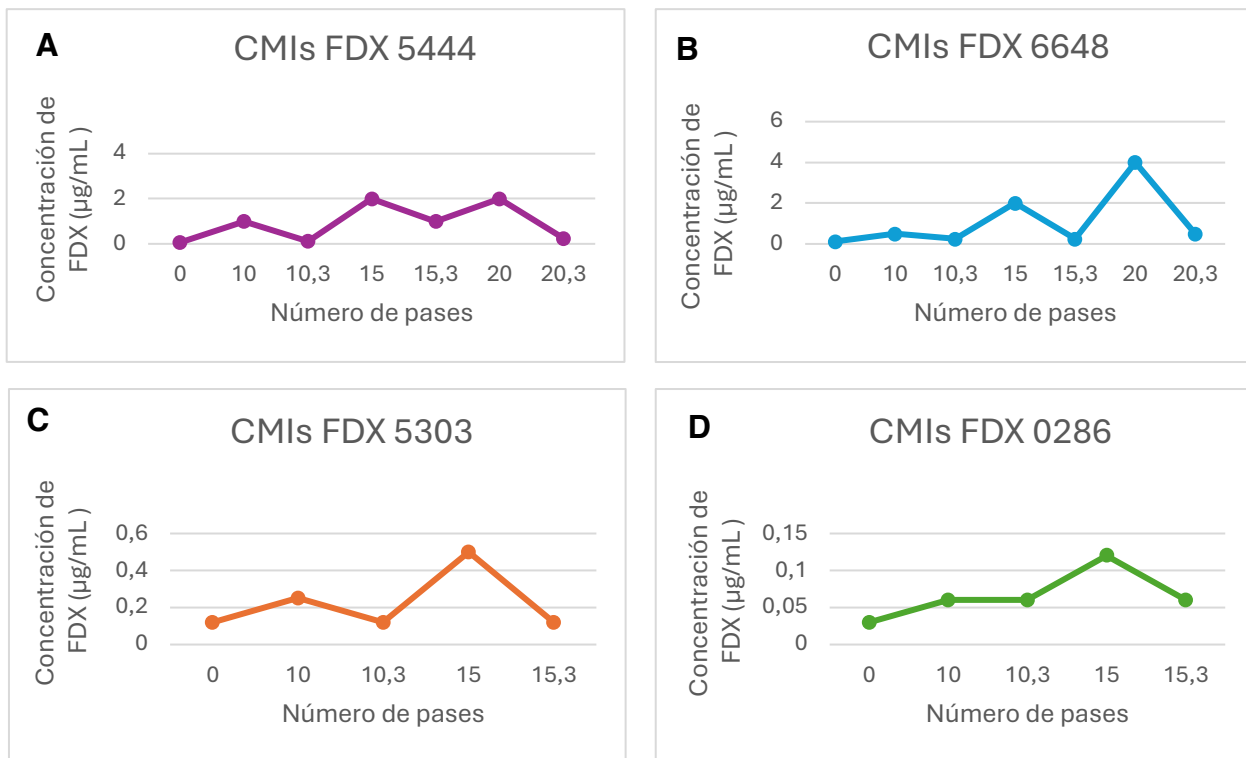


Figura 15. Detalle de la evolución de las CMI's para cada una de las cuatro cepas tras la exposición a FDX.

Teniendo en cuenta el posible error metodológico en la determinación de las CMI's (incrementado en la FDX por la preparación de las placas); se realizó una comprobación de los valores obtenidos siguiendo el procedimiento expuesto en la Figura 16, con el objetivo de estandarizar dicho error. Los datos obtenidos (Tabla 3), respaldan las mediciones realizadas durante la sucesión de pases, estableciendo un error de $\pm$ una unidad de valor de CMI.

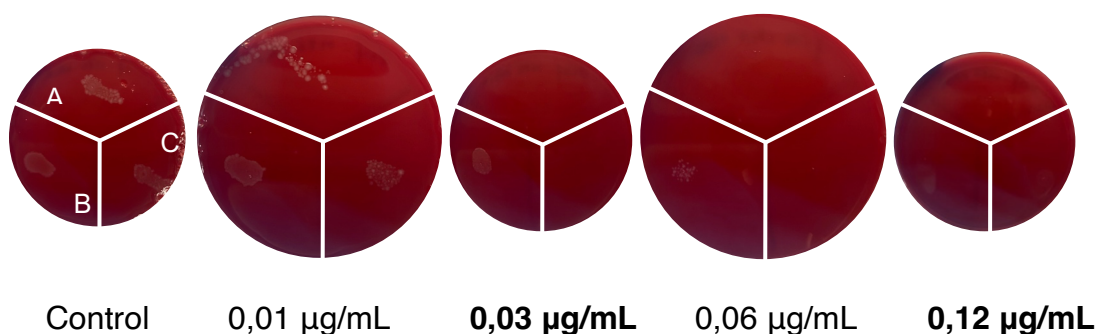


Figura 16. Ejemplo de comprobación CMI Cepa 0286. La placa control muestra el crecimiento de todas las variantes de la cepa: "A" cepa original, "B" cepa a los 15 pases y "C" tras la retirada de la exposición al antibiótico. Tanto en A como en C se observa crecimiento hasta la placa con concentración 0,01 µg/mL, por lo que la CMI de ambas se establece en 0,03 µg/mL; en el caso de B, al observarse crecimiento hasta 0,06 µg/mL se determina su CMI en 0,12 µg/mL.

CMI FDX (μg/mL)					
	Cepa	P.15	P.15,3	P.20	P.20,3
5444	0,12	-	-	2	0,25
5303	0,25	1	0,25	-	-
0286	0,03	0,12	0,03	-	-
6648	0,12	-	-	2	0,25

Tabla 3. Valores de las comprobaciones de CMI para FXD.

Numerosos estudios han comprobado la baja tasa de resistencia ante FDX, entre un 0 y un 2% (Boyanova et al., 2023). La existencia de cepas con sensibilidad disminuida se debe principalmente a mutaciones cercanas (5 Å) al lugar de unión de la FDX a la ARNpol. La mutación V1143D en la subunidad β de la ARNpol, es la más común hasta la fecha tanto en aislados clínicos como en ensayos *in vitro*. El ahora Aspártico interactúa formando un puente salino con la Arginina 326 de la misma subunidad, perdiendo así la disponibilidad para actuar como sustrato de la FDX; y por tanto, aumentando el valor de la CMI ante este antibiótico. (Le et al., 2024).

De acuerdo con los resultados expuestos para los cuatro aislados clínicos en este ensayo, se llega a una única conclusión; ya que todos los aislados clínicos revierten los cambios fenotípicos observados en los puntos de control. Evidenciando tanto la falta de estabilidad de las mutaciones como la considerable fortaleza de la barrera genética con la que cuenta este antibiótico.

6.3 Origen de los cambios fenotípicos

Los cambios fenotípicos observados a lo largo del experimento no pueden explicarse mediante cambios estables en el genoma. La resistencia adaptativa generada en los modelos clínicos surge de la exposición a concentraciones subinhibitorias, la cual dispone una situación de estrés que lleva a *C. difficile* a desarrollar hetero-resistencia; entendiendo esta como la aparición de variantes menos sensibles tras el proceso de presión selectiva.

La remisión del fenotipo con sensibilidad disminuida, o incluso resistencia, tras la retirada de la exposición al antibiótico acusa la posibilidad de que dichos cambios cuenten con un origen epigenético. La eliminación de la exposición ante el factor de estrés lleva a la pérdida del patrón epigenético heredado en la sucesión de pases, debido a la supresión de la señal inductora de las metilasas (Figura 16). Modificaciones de este tipo como la metilación del ADN o la acetilación proteínas similares a las histonas ya han sido relacionadas con cambios

fenotípicos sustanciales tanto en el incremento de la resistencia como en la patogenicidad de diversas bacteria, entre otros (Villalba de la Peña & Kronholm, 2024).

Las bacterias cuentan con un sistema de defensa basado en la metilación: sistema de restricción-modificación (R-M). Las metiltransferasas (MTasas) añaden grupos metilo a las adeninas o citosinas, para identificar el ADN propio de la célula; cuando se reconoce ADN exógeno (no metilado, o con un patrón de metilación diferente) este es degradado. Sin embargo, existen MTasas fuera de este sistema de defensa bacteriana denominadas “MTasas huérfanas”. La metilación, tanto de adeninas como de citosinas, lleva a la alteración de la transcripción y por tanto a la modificación fenotípica observada. Los cambios pueden tanto reprimir como promover la expresión génica. La metilación en citosinas puede desencadenar una transversión (cambio de una citosina por una timina). Normalmente la desaminación de la citosina lleva a un cambio a uracilo, que inicia la maquinaria de reparación del ADN. Sin embargo, teniendo en cuenta que al desaminar una citosina metilada se obtiene una timina, y que la frecuencia de desaminación es mayor en este caso; se considera que las citosinas metiladas son “HOT SPOTS” desencadenantes de mutaciones (Ghosh et al., 2020).

De manera complementaria, metilaciones en el ARN también han demostrado impactar sobre el aumento de las CMLs. Sin embargo, únicamente el ARNr es susceptible de ser transmitido debido a su relativa estabilidad en el interior celular. La adición de grupos metilo al ARNr puede contribuir a la misma evitando la unión del antibiótico a su sitio activo (Villalba de la Peña & Kronholm, 2024).

Además, las proteínas estructurales del ADN en bacterias: NAPs (Nucleoid-Associated Proteins), pueden sufrir modificaciones postraduccionales, como la acetilación que influyen en su unión al ADN. Estas alteraciones fruto del estrés creado por la exposición antibiótica, pueden provocar cambios transcriptómicos relacionados con la pérdida de sensibilidad. Además de ser modificaciones estables (en cuanto a la transmisión a la progenie), han sido vinculadas a la regulación de genes favorecedores de la formación de biofilms; estructuras de bacterias adheridas a una superficie y recubiertas por una matriz, las cuales han demostrado favorecer el AMR (Villalba de la Peña & Kronholm, 2024).

7. Conclusiones y proyección futura

Tras el análisis de los datos experimentales, se extraen las siguientes conclusiones:

- La exposición a concentraciones subinhibitorias de antibiótico es capaz de aumentar la CMI en todos los aislados clínicos estudiados para la FDX; y en el 75% de los casos para la VNC.
- Del 87,5% con aumento de CMI únicamente un 28,5% generó resistencia durante la sucesión de pases (ambos casos ante la FDX).
- A pesar de la falta de generación de fenotipos resistentes, la VNC ha demostrado contar con una menor barrera genética que la FDX. Tras la retirada de la exposición antibiótica el 100% de los aislados expuestos a FDX reestablecieron su CMI inicial, o un valor considerablemente próximo a la misma (teniendo en cuenta el error experimental); mientras que únicamente el 50% de los expuestos a VNC cumplían esta premisa.
- La rápida reversibilidad del fenotipo menos sensible evidencia su origen; descartando mutaciones genéticas estables y poniendo el foco en modificaciones epigenéticas.

La secuenciación del genoma en los puntos de control, y su comparación con la cepa original permitirá conocer en los mecanismos que subyacen tras los cambios fenotípicos observados en la variación de la CMI. Ayudando a una mejor comprensión tanto de la influencia de los mecanismos epigenéticos en el AMR, como de la dinámica molecular de *C. diff* bajo estrés antibiótico.

Teniendo en cuenta las conclusiones extraídas de los ensayos *in vitro*, y el panorama actual de alarma sanitaria ante el AMR; resulta esencial contar con programas como los PROA (Programa de Optimización de uso de Antibióticos). Que centren el foco en la prevención de la generación de resistencias, sobre todo en casos como el de *C. difficile* donde las terapias antibióticas altamente efectivas son escasas.

8. Bibliografía

- Akorful, R. A. A., Odoom, A., Awere-Duodu, A., & Donkor, E. S. (2025). The Global Burden of *Clostridioides difficile* Infections, 2016–2024: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Infectious Disease Reports*, 17(2), 31.
<https://doi.org/10.3390/idr17020031>
- Alam, M. Z., & Madan, R. (2024). *Clostridioides difficile* Toxins: Host Cell Interactions and Their Role in Disease Pathogenesis. *Toxins*, 16(6), 241.
<https://doi.org/10.3390/toxins16060241>
- Alcalá-Hernández, L., Mena-Ribas, A., Niubó-Bosh, J., & Marín-Arriaza, M. (2016). Diagnóstico microbiológico de la infección por *Clostridium difficile*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 34(9), 595-602.
<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2015.09.004>
- Alexiou, S., Diakou, A., & Kachrimanidou, M. (2025). The Role of *Clostridioides difficile* Within the One Health Framework: A Review. *Microorganisms*, 13(2), 429.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms13020429>
- Artsimovitch, I., Seddon, J., & Sears, P. (2012). Fidaxomicin Is an Inhibitor of the Initiation of Bacterial RNA Synthesis. *Clinical Infectious Diseases*, 55(suppl_2), S127-S131. <https://doi.org/10.1093/cid/cis358>
- Bartlett, J. G. (2002). Antibiotic-Associated Diarrhea. *The New England Journal of Medicine*.
- Buddle, J. E., & Fagan, R. P. (2023). Pathogenicity and virulence of *Clostridioides difficile*. *Virulence*, 14(1), 2150452. <https://doi.org/10.1080/21505594.2022.2150452>
- Buddle, J. E., Thompson, L. M., Williams, A. S., Wright, R. C. T., Durham, W. M., Turner, C. E., Chaudhuri, R. R., Brockhurst, M. A., & Fagan, R. P. (2024). Identification of

pathways to high-level vancomycin resistance in *Clostridioides difficile* that incur high fitness costs in key pathogenicity traits. *PLOS Biology*, 22(8), e3002741.

<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3002741>

Chandrasekaran, R., & Lacy, D. B. (2017). The role of toxins in *Clostridium difficile* infection. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(6), 723-750.

<https://doi.org/10.1093/femsre/fux048>

Connor, M. C., Fairley, D. J., McKenna, J. P., Marks, N. J., & McGrath, J. W. (2016).

Clostridium difficile Ribotype 023 Lacks the Ability To Hydrolyze Esculin, Leading to False-Negative Results on Chromogenic Agar. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(5), 1404-1405. <https://doi.org/10.1128/JCM.00234-16>

Deakin, L. J., Clare, S., Fagan, R. P., Dawson, L. F., Pickard, D. J., West, M. R., Wren, B. W., Fairweather, N. F., Dougan, G., & Lawley, T. D. (2012). The *Clostridium difficile* *spo0A* Gene Is a Persistence and Transmission Factor. *Infection and Immunity*, 80(8), 2704-2711. <https://doi.org/10.1128/IAI.00147-12>

Dembek, M., Stabler, R. A., Witney, A. A., Wren, B. W., & Fairweather, N. F. (2013).

Transcriptional Analysis of Temporal Gene Expression in Germinating *Clostridium difficile* 630 Endospores. *PLoS ONE*, 8(5), e64011.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064011>

Dilnessa, T., Getaneh, A., Hailu, W., Moges, F., & Gelaw, B. (2022). Prevalence and antimicrobial resistance pattern of *Clostridium difficile* among hospitalized diarrheal patients: A systematic review and meta-analysis. *PLOS ONE*, 17(1), e0262597. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262597>

- Drudy, D., Fanning, S., & Kyne, L. (2007). Toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile*. *International Journal of Infectious Diseases*, 11(1), 5-10.
<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2006.04.003>
- Garcia, H. (s. f.). *Informe de Posicionamiento Terapéutico de bezlotoxumab (Zinplava®) en la prevención de la recurrencia de la infección por Clostridium difficile en adultos con alto riesgo de recurrencia.*
- García, M. O., García, M. O., & Sánchez, B. R. (s. f.). *Emilia Cercenado Mansilla Rafael Cantón Moreno.*
- Gerding, D. N., Johnson, S., Rupnik, M., & Aktories, K. (2014). *Clostridium difficile* binary toxin CDT: Mechanism, epidemiology, and potential clinical importance. *Gut Microbes*, 5(1), 15-27. <https://doi.org/10.4161/gmic.26854>
- Ghosh, D., Veeraraghavan, B., Elangovan, R., & Vivekanandan, P. (2020). Antibiotic Resistance and Epigenetics: More to It than Meets the Eye. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 64(2), e02225-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.02225-19>
- Girinathan, B. P., Braun, S., Sirigireddy, A. R., Lopez, J. E., & Govind, R. (2016). Importance of Glutamate Dehydrogenase (GDH) in *Clostridium difficile* Colonization In Vivo. *PLOS ONE*, 11(7), e0160107.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160107>
- Govind, R., & Dupuy, B. (2012). Secretion of *Clostridium difficile* Toxins A and B Requires the Holin-like Protein TcdE. *PLoS Pathogens*, 8(6), e1002727.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002727>
- Herrmann, C., Ahmadian, M. R., Hofmann, F., & Just, I. (1998). Functional Consequences of Monoglucosylation of Ha-Ras at Effector Domain Amino Acid

- Threonine 35. *Journal of Biological Chemistry*, 273(26), 16134-16139.
<https://doi.org/10.1074/jbc.273.26.16134>
- Jank, T., & Aktories, K. (2008). Structure and mode of action of clostridial glucosylating toxins: The ABCD model. *Trends in Microbiology*, 16(5), 222-229.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.01.011>
- Khanna, S., & Pardi, D. S. (2012). Clostridium difficile Infection: New Insights Into Management. *Mayo Clinic Proceedings*, 87(11), 1106-1117.
<https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2012.07.016>
- Knetsch, C. W., Kumar, N., Forster, S. C., Connor, T. R., Browne, H. P., Harmanus, C., Sanders, I. M., Harris, S. R., Turner, L., Morris, T., Perry, M., Miyajima, F., Roberts, P., Pirmohamed, M., Songer, J. G., Weese, J. S., Indra, A., Corver, J., Rupnik, M., ... Lawley, T. D. (2018). Zoonotic Transfer of Clostridium difficile Harboring Antimicrobial Resistance between Farm Animals and Humans. *Journal of Clinical Microbiology*, 56(3), e01384-17. <https://doi.org/10.1128/JCM.01384-17>
- Korczak, L. (s. f.). *Molecular mechanisms of tigecycline-resistance among Enterobacterales*.
- Larson, K. C., Belliveau, P. P., & Spooner, L. M. (2011). Tigecycline for the Treatment of Severe Clostridium difficile Infection. *Annals of Pharmacotherapy*, 45(7-8), 1005-1010. <https://doi.org/10.1345/aph.1Q080>
- Lawson, P. A., Citron, D. M., Tyrrell, K. L., & Finegold, S. M. (2016). Reclassification of Clostridium difficile as Clostridioides difficile (Hall and O'Toole 1935) Prévot 1938. *Anaerobe*, 40, 95-99. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.06.008>
- Le, T. M., Eubank, T. A., McKelvey, A. M., Cao, X., Hurdle, J. G., & Garey, K. W. (2024). Fidaxomicin resistance in *Clostridioides difficile*: A systematic review and

- predictive modeling with RNA polymerase binding sites. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 68(12). <https://doi.org/10.1128/aac.01206-24>
- Lee, T., Pang, S., Abraham, S., & Coombs, G. W. (2019). Antimicrobial-resistant CC17 *Enterococcus faecium*: The past, the present and the future. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 16, 36-47. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.08.016>
- Lewis, S. J., & Heaton, K. W. (1997). Stool Form Scale as a Useful Guide to Intestinal Transit Time. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 32(9), 920-924. <https://doi.org/10.3109/00365529709011203>
- Lin, W., Das, K., Degen, D., Mazumder, A., Duchi, D., Wang, D., Ebright, Y. W., Ebright, R. Y., Sineva, E., Gigliotti, M., Srivastava, A., Mandal, S., Jiang, Y., Liu, Y., Yin, R., Zhang, Z., Eng, E. T., Thomas, D., Donadio, S., ... Ebright, R. H. (2018). Structural Basis of Transcription Inhibition by Fidaxomicin (Lipiarmycin A3). *Molecular Cell*, 70(1), 60-71.e15. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.02.026>
- Louie, T. J., Miller, M. A., Mullane, K. M., Weiss, K., Lentnek, A., Golan, Y., Gorbach, S., Sears, P., & Shue, Y.-K. (2011). Fidaxomicin versus Vancomycin for *Clostridium difficile* Infection. *New England Journal of Medicine*, 364(5), 422-431. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0910812>
- Martínez-Meléndez, A., Cruz-López, F., Morfin-Otero, R., Maldonado-Garza, H. J., & Garza-González, E. (2022). An Update on *Clostridioides difficile* Binary Toxin. *Toxins*, 14(5), 305. <https://doi.org/10.3390/toxins14050305>
- Monot, M., Eckert, C., Lemire, A., Hamiot, A., Dubois, T., Tessier, C., Dumoulard, B., Hamel, B., Petit, A., Lalande, V., Ma, L., Bouchier, C., Barbut, F., & Dupuy, B. (2015). *Clostridium difficile*: New Insights into the Evolution of the Pathogenicity Locus. *Scientific Reports*, 5(1), 15023. <https://doi.org/10.1038/srep15023>

Morado, F., & Nanda, N. (s. f.). *A Review of Therapies for Clostridioides difficile Infection*.

Orth, P., Xiao, L., Hernandez, L. D., Reichert, P., Sheth, P. R., Beaumont, M., Yang, X.,

Murgolo, N., Ermakov, G., DiNunzio, E., Racine, F., Karczewski, J., Secore, S.,

Ingram, R. N., Mayhood, T., Strickland, C., & Therien, A. G. (2014). Mechanism of

Action and Epitopes of Clostridium difficile Toxin B-neutralizing Antibody

Bezlotoxumab Revealed by X-ray Crystallography. *Journal of Biological*

Chemistry, 289(26), 18008-18021. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.560748>

Papatheodorou, P., Zamboglou, C., Genisyuerek, S., Guttenberg, G., & Aktories, K.

(2010). Clostridial Glucosylating Toxins Enter Cells via Clathrin-Mediated

Endocytosis. *PLoS ONE*, 5(5), e10673.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010673>

Passmore, I. J., Letertre, M. P. M., Preston, M. D., Bianconi, I., Harrison, M. A., Nasher, F.,

Kaur, H., Hong, H. A., Baines, S. D., Cutting, S. M., Swann, J. R., Wren, B. W., &

Dawson, L. F. (2018). Para-cresol production by Clostridium difficile affects

microbial diversity and membrane integrity of Gram-negative bacteria. *PLOS*

Pathogens, 14(9), e1007191. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007191>

Pothoulakis, C. (2000). Effects of Clostridium difficile Toxins on Epithelial Cell Barrier.

Annals of the New York Academy of Sciences, 915(1), 347-356.

<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb05263.x>

Poutanen, S. M. (2004). Clostridium difficile-associated diarrhea in adults. *Canadian*

Medical Association Journal, 171(1), 51-58.

<https://doi.org/10.1503/cmaj.1031189>

- Qa'Dan, M., Spyres, L. M., & Ballard, J. D. (2000). pH-Induced Conformational Changes in *Clostridium difficile* Toxin B. *Infection and Immunity*, 68(5), 2470-2474.
<https://doi.org/10.1128/IAI.68.5.2470-2474.2000>
- Ramos Martínez, A., Romero Pizarro, Y., Martínez Arrieta, F., Balandín Moreno, B., Múñez Rubio, E., Cuiñas León, K., Sánchez Romero, I., Cantos López De Iburgüen, B., & Asensio Vegas, Á. (2011). Enteritis por *Clostridium difficile*. *Gastroenterología y Hepatología*, 34(8), 539-545. <https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2011.03.005>
- Revisión Prueba Épsilon*. (s. f.).
- Setlow, P. (2014). Spore Resistance Properties. *Microbiology Spectrum*, 2(5), 2.5.11.
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TBS-0003-2012>
- Shen, W.-J., Deshpande, A., Hevener, K. E., Endres, B. T., Garey, K. W., Palmer, K. L., & Hurdle, J. G. (2020). Constitutive expression of the cryptic vanGCd operon promotes vancomycin resistance in *Clostridioides difficile* clinical isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(4), 859-867.
<https://doi.org/10.1093/jac/dkz513>
- Sinnathamby, E. S., Mason, J. W., Flanagan, C. J., Pearl, N. Z., Burroughs, C. R., De Witt, A. J., Wenger, D. M., Klapper, V. G., Ahmadzadeh, S., Varrassi, G., Shekoohi, S., & Kaye, A. (2023). *Clostridioides difficile* Infection: A Clinical Review of Pathogenesis, Clinical Considerations, and Treatment Strategies. *Cureus*.
<https://doi.org/10.7759/cureus.51167>
- Van Prehn, J., Reigadas, E., Vogelzang, E. H., Bouza, E., Hristea, A., Guery, B., Krutova, M., Norén, T., Allerberger, F., Coia, J. E., Goorhuis, A., Van Rossen, T. M., Ooijselaar, R. E., Burns, K., Scharvik Olesen, B. R., Tschudin-Sutter, S., Wilcox, M. H., Vehreschild, M. J. G. T., Fitzpatrick, F., & Kuijper, E. J. (2021). European Society

- of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: 2021 update on the treatment guidance document for *Clostridioides difficile* infection in adults. *Clinical Microbiology and Infection*, 27, S1-S21.
<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.09.038>
- Veena. (2011). Isolation and characterization of β -glucosidase producing bacteria from different sources. *AFRICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY*, 10(66).
<https://doi.org/10.5897/AJB09.314>
- Villalba de la Peña, M., & Kronholm, I. (2024). Antimicrobial resistance in the wild: Insights from epigenetics. *Evolutionary Applications*, 17(6), e13707.
<https://doi.org/10.1111/eva.13707>
- Wang, X., Wang, W.-Y., Yu, X.-L., Chen, J.-W., Yang, J.-S., & Wang, M.-K. (2025). Comprehensive review of *Clostridium difficile* infection: Epidemiology, diagnosis, prevention, and treatment. *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics*, 16(1). <https://doi.org/10.4292/wjgpt.v16.i1.100560>
- Wickramage, I., Spigaglia, P., & Sun, X. (2021). Mechanisms of antibiotic resistance of *Clostridioides difficile*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 76(12), 3077-3090. <https://doi.org/10.1093/jac/dkab231>
- Zhang, S., Ma, C., Zhang, H., Zhao, C., Guo, R., Liu, J., Wang, J., Yuan, J., Jia, K., Wu, A., Chen, Y., & Lei, J. (2024). Toxin genotypes, antibiotic resistance and their correlations in *Clostridioides difficile* isolated from hospitals in Xi'an, China. *BMC Microbiology*, 24(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-024-03327-z>