FUNDACIÓN H. A.
BARCELÓ
FACULTAD DE MEDICINA

TÍTULO: Estudio de la sensibilidad antibiótica de *Clostridioides* (*Clostridium*) *difficile*.

DIRECTOR: ROLLET, Raquel

INVESTIGADORES COLABORADORES: LAUBE, Gerardo; VAUSTAT, Daniela

SEDE-LUGAR: Sede Larrea - Laboratorio de investigaciones Facultas de Medicina – Fundación HA Barceló. Laboratorio de Bacteriología – Hospital FJ Muñiz

PERIODO: 2017 - 2019

CONTACTO DEL AUTOR: rarollet@yahoo.com

Índice

I. **Resumen /Abstrac**
II. **Introducción:**
   a. **Planteamiento del Problema (pregunta problema) y su contextualización**
   b. **Justificación y Relevancia**
   c. **Objetivos: General y Especifico**
   d. **Marco conceptual**
III. **Metodología**
   a. **Tipo de estudio**
   b. **Muestra**
   c. **Ámbito de estudio**
   d. **Fuentes e instrumento de recolección de datos**
   e. **Procesamiento y Análisis de la información**
IV. **Resultados**
V. **Discusión y Conclusión**
VI. **Bibliografía**
VII. **Anexos**

I. Resumen /Abstrac

Resumen

Clostridioides difficile **es un agente etiológico de diarreas y el uso de antibióticos es uno de los principales factores de riesgo para la infección. Los antimicrobianos recomendados para el tratamiento son vancomicina (VAN), metronidazol (MET) y fidaxomicina. No obstante, se han detectado cepas resistentes con diferencias regionales e institucionales.**

Objetivos. Determinar la sensibilidad de aislados clínicos de *C. difficile* frente a antimicrobianos.

Materiales y métodos. Se estudiaron 208 aislados consecutivos, recuperados en siete instituciones hospitalarias entre enero de 2018 y marzo de 2020. Se determinó la CIM por dilución en agar (CLSI-M100 29ED). Se probaron azitromicina (AZM), clindamicina (CLI), ertapenem (ETP), imipenem (IMI), levofloxacina (LEV), linezolida (LNZ), meropenem (MER), MET, moxifloxacina (MOX), piperacilina-tazobactam (PTZ), rifampicina (RFP); rifaximina (RFX), teicoplanina (TEI), tigeciclina (TGC) y VAN. Los resultados se analizaron con SPSS21.0. Se utilizó chi-cuadrado para comparar los datos y se asignó significación estadística a $p < 0,05$.

Resultados. Los porcentajes de sensibilidad fueron los siguientes: VAN, TEI y MET, 100%; TGC, 97,6%; PTZ, 96,2%; LNZ, 95,2%; MER, 99,5%; ETP, 60,9%; IMI, 42,8%; RFP, 54,8%; RFX, 55,6%; LEV, 48,6%; MOX, 46,1%; CLI, 29,9% y AZM, 17,8%. Se encontraron diferencias significativas en la resistencia de los aislados entre los centros para: RFX (16,7%-91,7%), CLI (41,2%-86,1%), MOX (22,9-97,2%), IMI (0-55,6%) y azitromicina (62,5-97,2%). Se detectó multirresistencia en 80 (38,5%) aislados.

Conclusiones. VAN, TEI y MET fueron los antimicrobianos más activos *in vitro* frente a los aislados de *C. difficile*. En el 38,5% de los aislados se detectó multirresistencia. Las diferencias entre instituciones las cuales podrían reflejar características epidemiológicas y/o la diseminación de clones en cada institución.

Abstract

Clostridioides difficile **is an etiological agent of diarrhoea, and the use of antibiotics is one of the main risk factors for infection. Antimicrobials used for treatment are vancomycin (VAN), metronidazole (MET), and fidaxomicin. Resistant strains have been detected with regional and institutional differences.**

Objectives. To determine the susceptibility profile of *C. difficile* clinical isolates to antimicrobials.

Materials and methods. A total of 208 consecutive isolates recovered from seven hospital institutions between January 2018 and March 2020, were studied. The MIC was determined by the agar dilution method (CLSI-M100 29ED). Azithromycin (AZM), clindamycin (CLI), ertapenem (ETP), imipenem (IMI), levofloxacin (LEV), linezolid (LNZ), meropenem (MER), (MET), moxifloxacin (MOX), piperacillin-tazobactam (PTZ), rifampicin (RFP), rifaximin (RFX), teicoplanin (TEI), tigecycline (TGC), and VAN, were tested. The results were analyzed with SPSS21.0. Chi-square was used to compare data, and statistical significance was assigned to $p < 0.05$.

Results. The susceptibility percentages were as follows: VAN, TEI, and MET, 100%; TGC, 97.6%; PTZ 96.2%; LNZ, 95.2%; MER 99.5%; ETP, 60.9%; IMI, 42.8%; RFX, 55.6%; LEV, 48.6%; MOX, 46.1%; CLI, 29.9%; and azithromycin, 17.8%. Significant differences in resistance among centres were found for: RFX (16.7%-91.7%), CLI (41.2%-86.1%), MOX (22.9%-97.2%), IMI (0%-55.6%), and azithromycin (62.5%-97.2%). Multidrug resistance (MDR) was detected in 80 isolates (38.5%).

Conclusions. VAN, TEI, and MET were the most active antimicrobials *in vitro* against *C. difficile* strains. MER was the most active carbapenem and IMI showed the greatest resistance. MDR was detected in 38.5% of the isolates. We highlight the differences among institutions that could reflect epidemiological characteristics, and/or the dissemination of clones in each institution.

II. **Introducción:**

a. **Planteamiento del Problema (pregunta problema) y su contextualización:**

C. difficile causa el 25-30% de las diarreas intranosocomiales. En los Hospitales del GCABA se estimó una tasa de incidencia de 26,48/10.000 pacientes internados. En los últimos años también se describieron casos adquiridos en la comunidad, aunque son escasos en nuestro medio.

C. difficile presenta un elevado nivel de resistencia antibiótica, por lo cual la administración de estas drogas y las internaciones dentro de los 60 días previos al episodio, son importantes factores predisponentes. Otros factores de riesgo son la edad mayor a 65 años, la administración de quimioterapeuticos, la infección con HIV, la administración reiterada de enemas, la colocación de sonda nasogástrica, las cirugías intestinales, la administración de antiácidos, la permanencia en instituciones geriátricas y el déficit de la inmunidad.

C. difficile produce un amplio espectro de manifestaciones clínicas que van desde una diarrea leve o moderada con tres a seis deposiciones diarias, hasta una colitis pseudomembranosa con graves complicaciones y riesgo de vida para el paciente, como megacolon tóxico y perforación intestinal.

Los factores de virulencia demostrados son la toxina A que es una enterotoxina y la toxina B, una citotoxina. La mayoría de las cepas patógenas expresan ambas, aunque se describieron casos y brotes causados por cepas que sólo producen la toxina B.

En brotes estudiados en Canadá, EE.UU. y Europa se detectaron cepas hipervirulentas RT027/BI/NAP1/toxinotipo III, las cuales producen cuadros clínicos más graves, excretan mayor cantidad de toxinas, producen una toxina binaria y son resistentes a moxifloxacina. En nuestro país también se describieron aislamientos similares.

El diagnóstico rápido y el tratamiento efectivo promueven una pronta mejora del paciente y el consecuente control de la diseminación del microorganismo en el medio hospitalario. Los métodos para el diagnóstico son el cultivo toxigénico, citotoxicidad sobre líneas celulares, PCR para amplificar genes codificantes de toxinas y EIA de membrana o policubetas para la detección de toxinas y la enzima GDH. En un estudio comparativo de dichos métodos, realizado por la subcomisión de Bacterias Anaerobias de SADEBAC-AAM, se consideró el EIA de membrana como el más adecuado para el diagnóstico clínico.

El tratamiento de la diarrea por *C. difficile* consiste en la administración de vancomicina sola o en combinación con metronidazol. Otros antibióticos con actividad *in-vitro* son fidaxomicina, tigeciclina, rifaximina, linezolida, ramoplanina, tinidazol, nitazoxanida y daptomicina. No obstante, se describieron resistencias antibióticas, fallas en el tratamiento y recidivas.

En estudios previos realizados en Argentina se detectó que los agentes más activos fueron vancomicina, teicoplanina, metronidazol y tigeciclina, sin embargo, incluyeron un bajo número de aislados y se realizaron una década atrás.

b. Justificación y Relevancia

Cabe preguntarse si los agentes antimicrobianos mantienen su actividad frente a las cepas que circulan en la actualidad. Las pruebas de sensibilidad *in-vitro* guían la selección más apropiada de los tratamientos. Asimismo, el conocimiento de la actividad de fluoroquinolonas podría alertar sobre la circulación de cepas hipervirulentas.

c. Objetivos: General y Especifico

Objetivo general:

- Estudiar la sensibibilidad in vitro a diferentes antibióticos de cepas de *C. difficile* aisladas de heces diarreicas.

Objetivos específicos:

- Ensayar la actividad de antibióticos de aplicación en clínica médica para el tratamiento de la infección por C. difficile.
- Detectar β-lactamasas, carbapenemasas
- Evaluar la resistencia a quinolonas fluoradas

d. Marco conceptual

C. difficile causa el 25-30% de las diarreas intranosocomiales. En los Hospitales del GCABA se estimó una tasa de incidencia de 26,48/10.000 pacientes internados. En los últimos años también se describieron casos adquiridos en la comunidad, aunque son escasos en nuestro medio.

C. difficile presenta un elevado nivel de resistencia antibiótica, por lo cual la administración de estas drogas y las internaciones dentro de los 60 días previos al episodio, son importantes factores predisponentes. Otros factores de riesgo son la edad mayor a 65 años, la administración de quimioterapeuticos, la infección con HIV, la administración reiterada de enemas, la colocación de sonda nasogástrica, las cirugías intestinales, la administración de antiácidos, la permanencia en instituciones geriátricas y el déficit de la inmunidad.

C. difficile produce un amplio espectro de manifestaciones clínicas que van desde una diarrea leve o moderada con tres a seis deposiciones diarias, hasta una colitis pseudomembranosa con graves complicaciones y riesgo de vida para el paciente, como megacolon tóxico y perforación intestinal.

Los factores de virulencia demostrados son la toxina A que es una enterotoxina y la toxina B, una citotoxina. La mayoría de las cepas patógenas expresan ambas, aunque se describieron casos y brotes causados por cepas que sólo producen la toxina B.

En brotes estudiados en Canadá, EE.UU. y Europa se detectaron cepas hipervirulentas RT027/BI/NAP1/toxinotipo III, las cuales producen cuadros clínicos más graves, excretan mayor cantidad de toxinas, producen una toxina binaria y son resistentes a moxifloxacina. En nuestro país también se describieron aislamientos similares.

El diagnóstico rápido y el tratamiento efectivo promueven una pronta mejora del paciente y el consecuente control de la diseminación del microorganismo en el medio hospitalario. Los métodos para el diagnóstico son el cultivo toxigénico, citotoxicidad sobre líneas celulares, PCR para amplificar genes codificantes de toxinas y EIA de membrana o policubetas para la detección de toxinas y la enzima GDH. En un estudio comparativo de dichos métodos, realizado por la subcomisión de Bacterias Anaerobias de SADEBAC-AAM, se consideró el EIA de membrana como el más adecuado para el diagnóstico clínico.

El tratamiento de la diarrea por *C. difficile* consiste en la administración de vancomicina sola o en combinación con metronidazol. No obstante, se describieron resistencias antibióticas, fallas en el tratamiento y recidivas.

Otros antibióticos con actividad *in-vitro* son fidaxomicina, tigeciclina, rifaximina, linezolida, ramoplanina, tinidazol, nitazoxanida y daptomicina. En los estudios de sensibilidad realizados en Argentina se detectó que los agentes más activos fueron vancomicina, teicoplanina, metronidazol y tigeciclina.

III. Metodología

a. **Tipo de estudio:** experimental *in-vitro*

b. **Muestra:** 209 aislados consecutivos de *C. difficile* obtenidos de pacientes con infección asociada a *C. difficile*.

c. **Ámbito de estudio:** Laboratorio de investigaciones Facultad de Medicina, Fundación HA Barceló y Laboratorio de Bacteriología Htal FJ Muñiz.

d. **Fuentes e instrumento de recolección de datos:** Los aislados fueron obtenidos según el procedimiento habitual empleado en bacteriología anaerobia en 6 (seis) centros de salud de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y en 1 (uno) de la provincia de Buenos Aires. Los resultados de CIM se registraron en planillas confeccionadas para tal fin para cada aislado-antibiótico.

e. Procesamiento y Análisis de la información.

Los aislados se recibieron en el Laboratorio de Investigaciones de la Facultad de Medicina donde se guardaron en caldo con glicerol a -20 ºC. Para el inicio, srepicaron los 209 aislados conservados y cepas de la colección ATCC (*Bacteroides fragilis* ATCC 23285, *C. difficile* ATCC 700057 y *Eggerthella lenta* ATCC 43055), las cuales se emplearon como controles de calidad. Las pruebas de sensibilidad antibiótica se realizaron por el método de dilución en agar, según las normas del CLSI M100. En cada procedimiento se probaron 33 cepas clínicas y las 3 cepas ATCC del control de calidad. Los antibióticos probados fueron: azitromicina (AZI), clindamicina (CLI), ertapenem (ERT), imipenem (IMI), levofloxacina (LEV), linezolida (LIN), meropenem (MER), metronidazol (MTZ), moxifloxacina (MOX), piperacilina-tazobactama (PTZ), rifampicina (RFP), rifaximina (RFX), teicoplanima (TEI), tigeciclina (TIG) y vancomicina (VAN). Se registraron los valores de CIM para cada cepa con cada agente probado y los resultados se exploraron y analizaron con el programa SPSS. Se calcularon los valores de CIM_{50}, CIM_{90} y porcentajes de sensibilidad y de resistencia.

IV. Resultados

Los resultados de los rangos de CMI, CMI50, CMI90 y porcentajes de sensibilidad, intermedio y resistente para cada antibiótico probado se muestran en la Tabla 1 (anexo). Las distribuciones de los aislamientos según los valores de CMI de cada agente se presentan en la Figura 1-14 (anexo). Al comparar la resistencia a antibióticos entre centros, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), principalmente, para RFX, CLI, MOX, IMI y AZM (Fig. 15-19, anexo). RFX mostró su comportamiento bimodal, y un perfil similar a MOX. La resistencia a MOX osciló entre 22,9% y 97,2%.

Se detectó MDR en 80 aislamientos (38,5%), 63 (78,7%) fueron resistentes a tres familias de agentes antimicrobianos y 17 (21,3%) fueron resistentes a cuatro. Las combinaciones más frecuentes fueron RFX-MOX-CLI, que estuvo presente en 48 (60,0%) aislamientos, y RFX-IMI-MOX-CLI en 17 (21,3%) aislamientos (Figura 20, anexo).

V. Discusión y Conclusión

C. difficile causa un espectro variable de enfermedades, que va desde diarrea leve hasta inflamación grave del colon que puede acabar con la vida del paciente. La mayoría de los pacientes desarrollan diarrea durante o poco después de un ciclo de terapia con antibióticos.

Las cepas de C. difficile pueden ser resistentes a múltiples antibióticos, lo que es una ventaja para su supervivencia y el desarrollo de diarrea asociada con el consumo de antibióticos y las hospitalizaciones. Por lo tanto, es esencial realizar una vigilancia periódica de la susceptibilidad a los antimicrobianos, con análisis regionales e institucionales para orientar el tratamiento adecuado en cada área e institución. Sin embargo, las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana (AST) no se realizan rutinariamente para C. difficile, y los datos que evalúan las MIC son limitados.

Vancomicina – Teicoplanina. De acuerdo a los puntos de corte de EUCAST, todos nuestros aislamientos pueden considerarse susceptibles.

Se consideró que la VAN era un agente con una actividad alta y uniforme in vitro, y estable a lo largo del tiempo (14,41). En una revisión publicada en 2016, Spigaglia43 señaló que la resistencia a la VAN no estaba generalizada entre las cepas de C. difficile, pero citó varias de ellas con una susceptibilidad reducida (valores de CMI: >2, 4 y 8 µg/ml) en aislamientos de Taiwán, Irán, China e Israel. Sin embargo, Saha et al.40 en una revisión sistemática y metaanálisis informaron un aumento significativo de la resistencia a VAN en un 3,6% después de 2012, pero este hallazgo podría verse afectado por la heterogeneidad significativa en la metodología de pruebas de susceptibilidad. La tasa más alta de resistencia a VAN se observó en las Américas, seguida de Asia. Mientras tanto, no se encontró resistencia a TEI.

En 2016, Fraga et al.17 encontraron valores de CMI50 y CMI90 de 4 µg/ml, con un 58% de los aislamientos no sensibles según el valor de corte epidemiológico. Esta importante discrepancia con respecto a nuestros resultados podría deberse a diferencias entre las cepas circulantes o al uso del método de difusión en disco para evaluar la susceptibilidad a los antimicrobianos.

En un estudio paneuropeo de cinco años, Freeman et al. encontraron que VAN era altamente activa con muy pocas variaciones a lo largo del tiempo20. Las cepas con susceptibilidad reducida a VAN fueron escasas. Mientras tanto, en una revisión sistemática y metaanálisis, Saha et al.40 informaron una resistencia agrupada ponderada (WPR) del 8,3% para VAN, que fue significativamente alta entre los RT027 en comparación con todos los ribotipos (RT) combinados. Además, otros RT que mostraron una susceptibilidad reducida a VAN fueron RT017, RT078, RT126, RT001/072 y RT35618,34. Sin embargo, la importancia clínica de la susceptibilidad reducida a VAN aún está por determinar, ya que después del tratamiento oral, VAN alcanza altas concentraciones en heces (1000 a 3000 µg/ml), superando los valores de MIC más altos registrados40,43.

Metronidazol. MET ha demostrado una alta actividad in vitro contra cepas de C. difficile y se consideró un agente de primera elección para CDI leve a moderada, sin embargo, varios estudios enfatizaron fallas del tratamiento y recurrencias después de su uso43. La resistencia sigue siendo rara pero variable11,43,44, y dependiendo del punto de corte considerado. Se informó que varía de 0,11 a 18%11, pero aún no se han registrado cepas resistentes en Argentina28,30,32,38.

En conclusión, este estudio demostró que VAN, TEI y MET son los agentes más activos in vitro frente a C. difficile aislados en nuestro medio. Se demostró diferencias significativas en la resistencia para CLI, IMI, MOX, AZM y RFX entre centros. En particular, se destaca las diferencias institucionales para RFX y MOX cuyas mayores resistencias se detectaron en establecimientos con alta prevalencia de tuberculosis. Las diferencias podrían reflejar características epidemiológicas y/o diseminación de clones en cada institución. Sin embargo, este estudio deberían complementarse con estudios moleculares que brindarían mayor información epidemiológica.

VI. Bibliografía

1- Aoki K, Takeda S, Miki T, Ishii Y, Tateda K. Antimicrobial susceptibility and molecular characterization using whole-genome sequencing of *Clostridioides difficile* collected in 82 hospitals in Japan between 2014 and 2016. Antimicrob Agents Chemother. 2019; 9;63(12):e01259-19. doi: 10.1128/AAC.01259-19. Epub 2019 Sep 16. PMID: 31527041; PMCID: PMC6879216.

2- Aptekorz M, Sacha K, Gofron Z, Kabała M, Harmanus C, Kuijper E, Martirosian G. Antibiotic resistance profile of RT 027/176 versus other *Clostridioides difficile* isolates in Silesia, Southern Poland. Pathogens 2022;11,949.https://doi.org/10.3390/pathogens11080949.

3- Baghani A, Ghourchian S, Aliramezani A, Yaseri M, Mesdaghinia A, Douraghi M. Highly antibiotic-resistant *Clostridium difficile* isolates from Iranian patients. J Appl Microbiol. 2018;125:1518-25.

4- Barcán L, Ducatenzeiler L, Bangher MC, Barcelona L, Cornistein W, Daciuk L, De Paula J, Desse J, Dictar M, Fernández-Canigia L, Nacinovich F, Scapellato P, Martínez JV, Jorge L, Obed M, Yantorno ML, Rollet R, Correa J, Maldonado ML, Predari SC, Legaria MC, Castello L, Rossetti MA, Vaustat D, Litterio M, Barberis C, Greco G,

Abusamra L, Barletta J, Rodríguez Raimondo M, Brizuela M, Cuesta MCB, Ezcurra MC, Duarte A, Caeiro JP, Mena BS, Beltramo C, Sisto A, Smud A, Pereyra ML, Benito F, Bernachea MP, Farina J, Waldbaum C, Lambert S, Lescano ML, Soler Puy L, Valle S, Simioli F, Staneloni I, Maimone S, Alcala W, Bejarano G, Baigorria MA, Nucetelli Y. Recomendaciones intersociedades para diagnóstico, tratamiento y prevención de las infecciones por *Clostridioides difficile*. Medicina (Buenos Aires). 2020;80:1-32. ISSN 1669-9106, https://panel.aam.org.ar/img_up/03022020.1.pdf.

5- Bishop EJ, Tiruvoipati R. Management of *Clostridioides difficile* infection in adults and challenges in clinical practice: review and comparison of current IDSA/SHEA, ESCMID and ASID guidelines. J Antimicrob Chemother. 2023;78: 21–30.

6- Bouza E, Aguado JM, Alcalá L, Almirante B, Alonso-Fernández P, Borges M, Cobo J, Guardiola J, Horcajada JP, Maseda E, Mensa J, Merchante N, Muñoz P, Pérez Sáenz JL, Pujol M, Reigadas E, Salavert M, Barberán J. Recommendations for the diagnosis and treatment of *Clostridioides difficile* infection: An official clinical practice guideline of the Spanish Society of Chemotherapy (SEQ), Spanish Society of Internal Medicine (SEMI) and the working group of Postoperative Infection of the Spanish Society of Anesthesia and Reanimation (SEDAR). Rev Esp Quim. 2020;33:151-75. doi: 10.37201/req/2065.2020. Epub 2020 Feb 20. PMID: 32080996; PMCID: PMC7111242.

7- Büchler AC, Rampini SK, Stelling S, Ledergerber B, Peter S, Schweiger A, Ruef C, Zbinden R, Speck RF. Antibiotic susceptibility of *Clostridium difficile* is similar worldwide over two decades despite widespread use of broad-spectrum antibiotics: an analysis done at the University Hospital of Zurich. BMC Infect Dis. 2014; 26;14:607. https://doi:10.1186/s12879-014-0607-z. PMID: 25425433; PMCID: PMC4247760.1.

8- Carroll KC, Bartlett JG. Biology of *Clostridium difficile*: Implications for epidemiology and diagnosis. Annu Rev Microbiol. 2011;65:501-21.

9- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 29th edition, 2019; Document M100. Wayne, EE.UU.

10- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 33rd edition, 2023; Document M100. Wayne, PA, EE.UU.

11- Costa DVS, Pham NVS, Hays RA, Bolick DT, Goldbeck SM, Poulter MD, Hoang SC, Shin JH, Wu M, Warren CA. Influence of binary toxin gene detection and decreased susceptibility to antibiotics among *Clostridioides difficile* strains on disease severity: a single-center study. Antimicrob Agents Chemother. 2022;16;66(8):e0048922. doi: 10.1128/aac.00489-22. Epub 2022 Jul 21. PMID: 35861541; PMCID: PMC9380565.

12- Crivaro AN, Carasi P, Salto I, Hugo A, Soldavini Pelichotti PC, Bengoa A, Fragomeno M, Serradell MA, Minnaard J, Rolny I, Alul E, Arregui L, Fabra Martínez ME, Moreno Valero OJ, Facente A, Magariños F, Jewtuchowicz V,

Pérez PF, Trejo FM. *Clostridioides difficile*: Characterization of the circulating toxinotypes in an Argentinean public hospital. Rev Argent Microbiol. 2023; 55:73–82. https://doi.org/10.1016/j.ram.2022.05.010.

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

14-Eitel Z, Terhes G, Sóki J, Nagy E. Investigation of the MICs of fidaxomicin and other antibiotics against Hungarian *Clostridium difficile* isolates. Anaerobe. 2015;31:47-9.

15-European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Anaerobic Bacteria. Version 13.0, valid from 2023-01-01.

16-European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Anaerobic Bacteria. Version 9.0, valid from 2019-01-01.

17-Fraga EG, Nicodemo AC, Mello Sampaio JL. Antimicrobial susceptibility of Brazilian *Clostridium difficile* strains determined by agar dilution and disk diffusion. Braz J Infect Dis. 2016;20:476-81.

18-Freeman J, Vernon J, Morris K, Nicholson S, Todhunter S, Longshaw C, Wilcox MH and the Pan-European Longitudinal Surveillance of Antibiotic Resistance Among Prevalent *Clostridium difficile* Ribotypes' Study Group. Pan-European longitudinal surveillance of antibiotic resistance among prevalent *Clostridium difficile* ribotypes. Clin Microbiol Infect. 2015;21:248.e9–248.e16, http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2014.09.017.

19-Freeman J, Vernon J, Pilling S, Morris K, Nicholson S, Shearman S, Longshaw C, Wilcox MH and the Pan-European Longitudinal Surveillance of Antibiotic Resistance Among Prevalent *Clostridium difficile* Ribotypes Study Group. The ClosER study: results from a three-year Pan-European longitudinal surveillance of antibiotic resistance among prevalent *Clostridium difficile* ribotypes, 2011-2014. Clin Microbiol Infect. 2018;24:724-31.

20-Freeman J, Vernon J, Pilling S, Morris K, Nicolson S, Shearman S, Clark E, Palacios-Fabrega JA, Wilcox M and the Pan-European Longitudinal Surveillance of Antibiotic Resistance among Prevalent *Clostridium difficile* Ribotypes' Study Group. Five-year Pan-European, longitudinal surveillance of *Clostridium difficile* ribotype prevalence and antimicrobial resistance: the extended ClosER study. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2020;39:169–77, https://doi.org/10.1007/s10096-019-03708-7.

21-Gargis AS, Karlsson M, Paulik AL, Anderson KF, Adamczyk M, Vlachos N, Kent AG, McAllister G, McKay SL, Halpin AL, Albrecht V, Campbell D, Korhonen LC, Elkins CA, Rasheed JK, Guh AY, McDonald LC, Lutgring JD, and the Emerging Infections Program *Clostridioides difficile* Infection Working Group. Reference susceptibility testing and genomic surveillance of *Clostridioides difficile*, United States, 2012–7. Clin Infect Dis. 2023;76:890-6. doi: 10.1093/cid/ciac817.

22-Ghasemi A, Mohabati Mobarez A, Mostafavi E. Antibiotic susceptibility profile of *Clostridium difficile* bacteria isolated from older residents of a nursing home in Iran. Iran J Ageing. 2021;15:496-505, http://salmandj.uswr.ac.ir/article-1-2052-en.html. Doi:10.32598/sija.15.4.2997.1.
23-Goorhuis A, Legaria MC, van den Berg RJ, Harmanus C, Klaassen CH, Brazier JS, Lumelsky G, Kuijper EJ. Application of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis to determine clonal spread of toxin A-negative *Clostridium difficile* in a general hospital in Buenos Aires, Argentina. Clin Microbiol Infect. 2009;15:1080-6. doi: 10.1111/j.1469-0691.2009.02759.x. Epub 2009 May 11. PMID: 19438624.
24-Isidro J, Santos A, Nunes A, Borges V, Silva C, Vieira L, Mendes AL, Serrano M, Henriques AO, Gomes JP, Oleastro M. Imipenem resistance in *Clostridium difficile* ribotype 017, Portugal. Emerg Infect Dis. 2018;24:741-5. doi: 10.3201/eid2404.170095. PMID: 29553322; PMCID: PMC5875251.
25-Johnson S, Lavergne V, Skinner AM, Gonzales-Luna AJ, Garey KW, Kelly CP, Wilcox MH. Clinical Practice Guideline by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA): 2021 Focused Update Guidelines on Management of *Clostridioides difficile* Infection in Adults. Clin Infect Dis. 2021;73:e1029-e1044. doi: 10.1093/cid/ciab549. PMID: 34164674.
26-Johnson S, Schriever C, Galang M, Kelly CP, Gerding DN. Interruption of recurrent *Clostridium difficile*–associated diarrhea episodes by serial therapy with vancomycin and rifaximin. Clin Infect Dis. 2007;44: 846 -8.
27-Krutova M, Wilcox M, Kuijper E. *Clostridioides difficile* infection: are the three currently used antibiotic treatment options equal from pharmacological and microbiological points of view? Int J Infect Dis. 2022; 124:118–23, https://doi.org/10.1016/j.ijid.2022.09.013.
28-Legaria MC, Bianchini H, Castello, L, Carloni C, di Martini A, Fernández Canigia L, Litterio M, Rollet R, Rossetti A, Predari SC. Primer consenso argentino para el estudio de la sensibilidad *in vitro* a los antimicrobianos de las bacterias anaerobias de importancia clínica en humanos. Rev Argent Microbiol. 2011;43:51-66.doi: 10.1590/S0325-75412011000100012. PMID: 21491069.
29-Lew T, Putsathit P, Sohn KM, Wu Y, Ouchi K, Ishii Y, Tateda K, Riley TV, Collins DA, for the *Clostridium difficile* Asia Pacific (CDAP) Study Group. Antimicrobial susceptibilities of *Clostridium difficile* isolates from 12 Asia-Pacific countries in 2014 and 2015. Antimicrob Agents Chemother. 2020;64:e00296-20. https://doi.org/10.1128/AAC.00296-20.
30-Litterio MR, Roldán C, Angeloff M, D´Amore V, Hernández C. Sensibilidad antibiótica de *Clostridium difficile* aislados en un hospital pediátrico. Congreso internacional de infectología pediátrica y vacunas – SADIP, 2014, Abstract ID24.

31-Lopardo G, Morfin-Otero R, Moran-Vazquez II, Noriega F, Zambrano B, Luxemburger C, Foglia G, Rivas EE. Epidemiology of *Clostridium difficile*: a hospital-based descriptive study in Argentina and Mexico. Braz J Infect Dis. 2015;19:8-14. doi: 10.1016/j.bjid.2014.07.004. Epub 2014 Aug 29. PMID: 25179510; PMCID: PMC9425260.
32-Maldonado ML, Hernández C, Litterio M. *Clostridium difficile*. Susceptibility profiles to vancomycin and metronidazol in a pediatric population. Int J Infect Dis. 2018;73S:121. Abstract UMP. 023. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2018.04.3691.
33-Nagy E. Anaerobic infections. Update on treatment considerations. Drugs. 2010;70:841-58.
34-O'Grady K, Knight DR, Riley TV. Antimicrobial resistance in *Clostridioides difficile*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2021; 40:2459–78, https://doi.org/10.1007/s10096-021-04311-5.
35-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;46:3028–32.
36-Pituch H, Obuch-Woszczatyński P, Wultańska D, Nurzyńska G, Harmanus C, Banaszkiewicz A, Radzikowski A, Łuczak M, van Belkum A, Kuijper E. Characterization and antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* strains isolated from adult patients with diarrhoea hospitalized in two university hospitals in Poland, 2004-2006. J Med Microbiol. 2011;60:1200-5. doi: 10.1099/jmm.0.029801-0. Epub 2011 Mar 17. PMID: 21415206.
37-Reigadas E, Muñoz-Pacheco P, Vázquez-Cuesta S, Alcalá L, Marín M, Martin A, Bouza E. Rifaximin-resistant *Clostridium difficile* strains isolated from symptomatic patients. Anaerobe. 2017;48:269-72.
38-Rollet R, Vaustat D, Cabrera R, Callejo R, Menendez B, Hardie N. *Clostridium difficile*. Su sensibilidad *in vitro* frente a antibióticos de amplio uso en un hospital de enfermedades infecciosas. VII Congreso de la Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínicas. SADEBAC 2012, Abstract P127. Rev Argent Microbiol. 2012;44 Supl 1:56.
39-Rollet R, Vaustat D, Menendez B, Hardie N. *Clostridium difficile*: su comportamiento *in vitro* frente a metronidazol. XIII Congreso Argentino de Microbiología. II Congreso Microbiología Agrícola y Ambiental 2013, Abstract O-005. Rev Argent Microbiol. 2013;45 Supl 1:7-8.
40-Saha S, Kapoor S, Tariq R, Schuetz AN, Tosh PK, Pardi DS, Khanna S. Increasing antibiotic resistance in *Clostridioides difficile*: A systematic review and meta-analysis. Anaerobe. 2019;58:35-46.
41-Sholeh M, Krutova M, Forouzesh M, Mironov S, Sadeghifard N, Molaeipour L, Maleki A, Kouhsari E. Antimicrobial resistance in *Clostridioides* (*Clostridium*) *difficile* derived from humans: a systematic review and meta-analysis. Antimicrob Resist Infect Control. 2020;9:158. https://doi.org/10.1186/s13756-020-00815-5.
42- Spigaglia P, Barbanti F, Mastrantonio P, on behalf of the European Study Group on *Clostridium difficile* (ESGCD); Ackermann G, Balmelli C, Barbut F, Bouza E, Brazier J, Delmée M, Drudy D, Kuijper E, Ladas

H, Mastrantonio P, Nagy E, Pituch H, Poxton I, Rupnik M, Wullt M, Yücesoy M. Multidrug resistance in European *Clostridium difficile* clinical isolates. J Antimicrob Chemother. 2011;66:2227–34, https://doi.org/10.1093/jac/dkr292.

43-Spigaglia, P. Recent advances in the understanding of antibiotics resistance in *Clostridium difficile* infection. Ther Adv Infect Dis. 2016;3:23-42.

44-Tang C, Cui L, Xu Y, Xie L, Sun P, Liu C, Xia W, Liu G. The incidence and drug resistance of *Clostridium difficile* infection in Mainland China: a systematic review and meta-analysis. Sci Reports. 2016;6:37865. doi: 10.1038/srep37865. PMID: 27897206; PMCID: PMC5126672.

45-Tkhawkho L, Nitzan O, Pastukh N, Brodsky D, Jackson K, Peretz A. Antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* isolates in Israel. J Glob Antimicrob Resist. 2017;10:161-4.

46-van Prehn J, Reigadas E, Vogelzang E, Bouza E, Hristea A, Guery B, Krutova M, Torbjorn Norén T, Allerberger F, Coia JE, Goorhuis A, van Rossen TM, Ooijevaar R, Burns K, Scharvik Olesen BR, Tschudin-Sutter S, Wilcox M, Vehreschild MJGT, Fitzpatrick F, Kuijper Ed. The Guideline Committee of the European Study Group on *Clostridioides difficile*. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: 2021 update on the treatment guidance document for *Clostridioides difficile* infection in adults. Clinical Microbiol Infect. 2021;27:S1-S21.

47-Vardakas KZ, Polyzos KA, Patouni K, Rafailidis PI, Samonis G, Falagas ME. Treatment failure and recurrence of *Clostridium difficile* infection following treatment with vancomycin or metronidazole: a systematic review of the evidence. Int J Antimicrob Agents. 2012 ;40:1-8. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2012.01.004. Epub 2012 Mar 6. PMID: 22398198.

48-Vaustat D, Cabrera R, Callejo R, Menéndez B, Hardie N, Rollet R. Sensibilidad a vancomicina y metronidazol de aislamientos de *Clostridium difficile* procedentes de pacientes asistidos en el hospital F.J. Muñiz. 3º Congreso de Enfermedades Endemoepidémicas. Hospital de Infecciosas “F.J. Muñiz”. 2011. El Muñiz Hoy. Año 14 -Supl. 1: 13. ISSN 032 9-7357.

49-Wang R, Suo L, Xia Chen H, Song LJ, Yun Shen Y, Ping Luo Y. Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* isolated from the Chinese People's Liberation Army General Hospital in China. Int J Infect Dis. 2018;67:86-91.

Anexos

Table 1. In vitro activity of 15 antimicrobial agents against 208 isolates of *Clostridioides difficile*

Antimicrobial	Number of isolates	Range (µg/ml)	MIC50 (µg/ml)	MIC90 (µg/ml)	Breakpoint (S/I/R) (µg/ml)	% Resistance	% Intermediate	% Susceptible
Vancomycin	208	≤ 0.03 - 0.5	0.03	0.06	⩽ 2/-/>2	0*	--	100
Teicoplanin	207	≤ 0.03 - 2	0.03	0.03	⩽ 2/-/>2	0*	--	100
Metronidazole	207	≤ 0.12 - 2	0.5	1	⩽8/16/≥32	0	0	100
Tigecycline	208	≤ 0.008 - 0.50	0.06	0.12	no S > 0.25	2.4*	--	97.6
Rifaximin	205	≤ 0.002 - >128	0.25	> 128	< 32/-/≥32	45.37	--	54.63
Rifampicin	208	≤ 0.002 - >128	0.25	64	< 32/-/≥32	45.61	--	54.39
Linezolid	208	≤ 0.03 - 8	1	4	⩽4/-/>4	4.81	--	95.19
Piperacillin/Tazobactam	208	≤ 0.25 - 32	4	16	⩽16/32-64/≥128	0	3.8	96.2
Meropenem	208	≤ 0.12 - 8	2	4	⩽4/8/≥16	0.5	0	99.5
Imipenem	208	≤ 0.12 - 32	8	16	⩽4/8/≥16	18.3	38.9	42.8
Ertapenem	207	≤ 0.12 - 32	4	16	⩽4/8/≥16	10.6	28.5	60.9
Clidamycin	207	≤ 0.12 - >64	8	>64	⩽2/4/≥8	55.6	14.5	29.9
Azithromycin	208	≤ 0.12 - >128	64	>128	⩽2/-/>2	82.21	--	17.79
Moxifloxacin	208	≤ 0.12 - 32	8	32	⩽2/4/≥8	50.5	3.4	46.2
Levofloxacin	208	≤ 0.12 - >128	16	128	⩽2/4/≥8	63.5	28.8	7.7

Figure 1. Distribution of isolates by vancomycin MIC value.

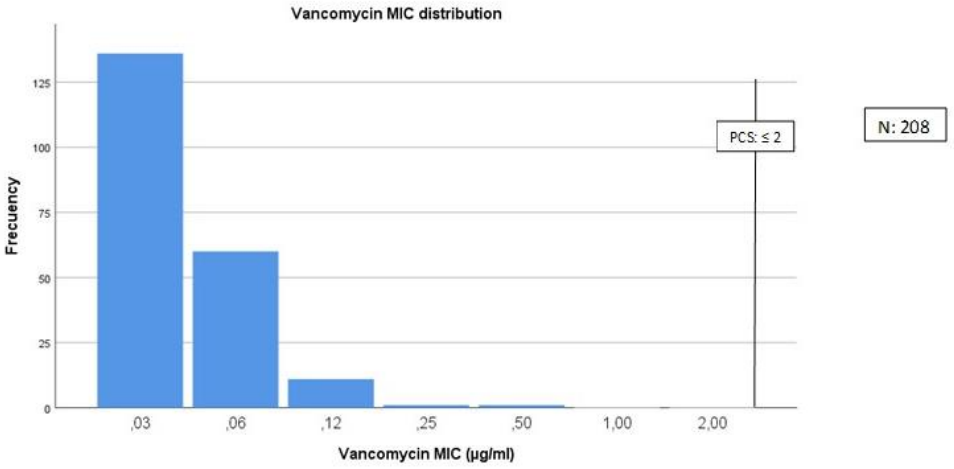


Figure 2. Distribution of isolates by teicoplanin MIC value.

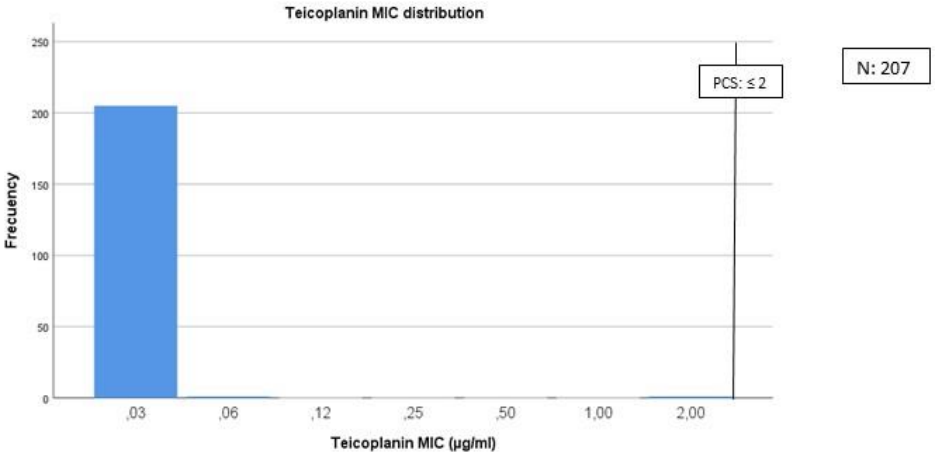


Figure 3. Distribution of isolates by metronidazole MIC value.

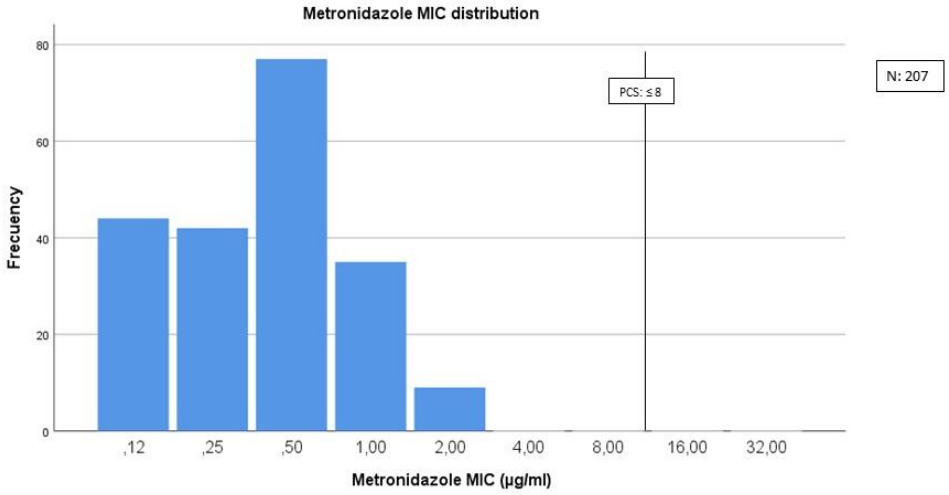


Figure 4. Distribution of isolates by tigecycline MIC value.

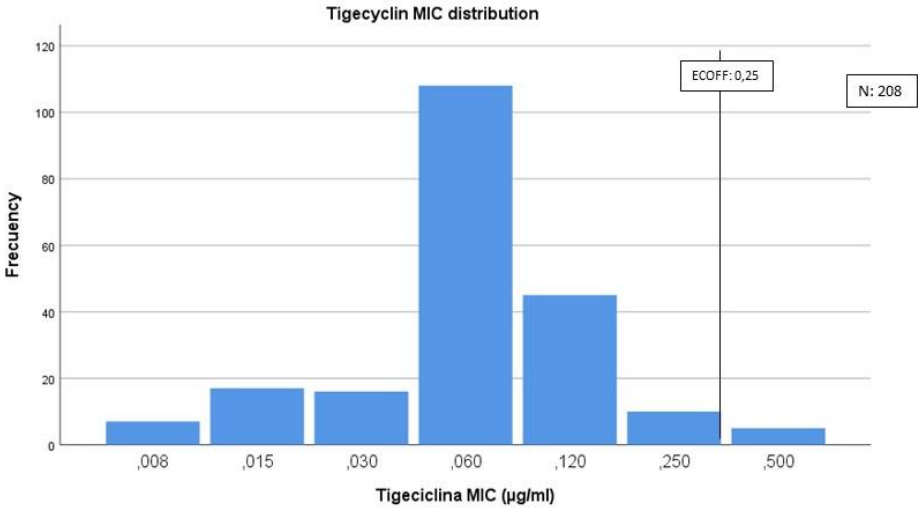


Figure 5. Distribution of isolates by rifaximin MIC value.

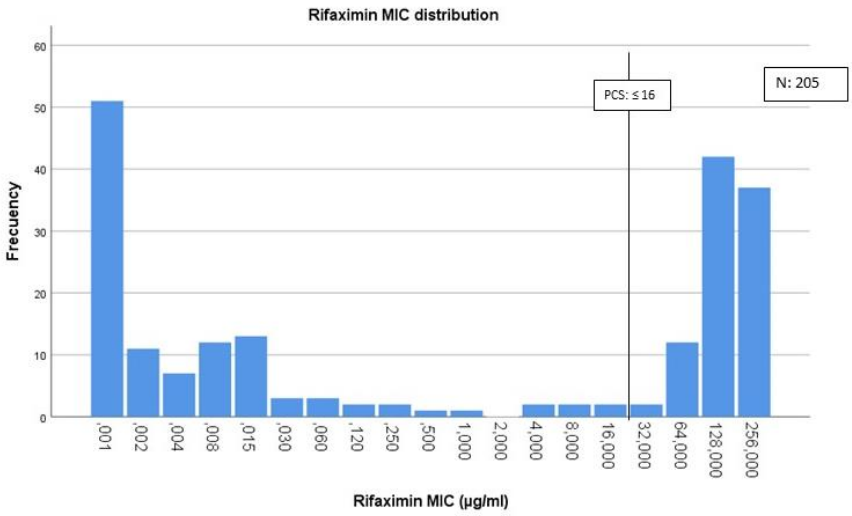


Figure 6. Distribution of isolates by linezolid MIC value.

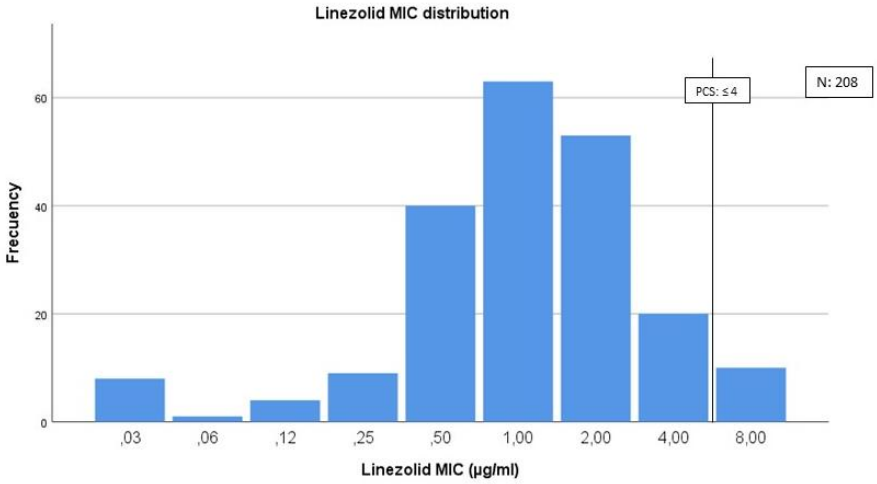


Figure 7. Distribution of isolates by piperacillin/tazobactam MIC value.

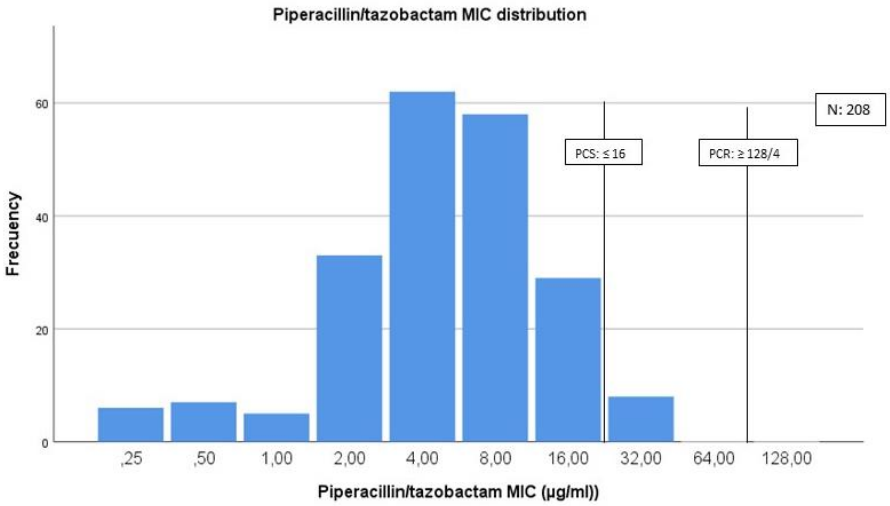


Figure 8. Distribution of isolates by meropenem MIC value.

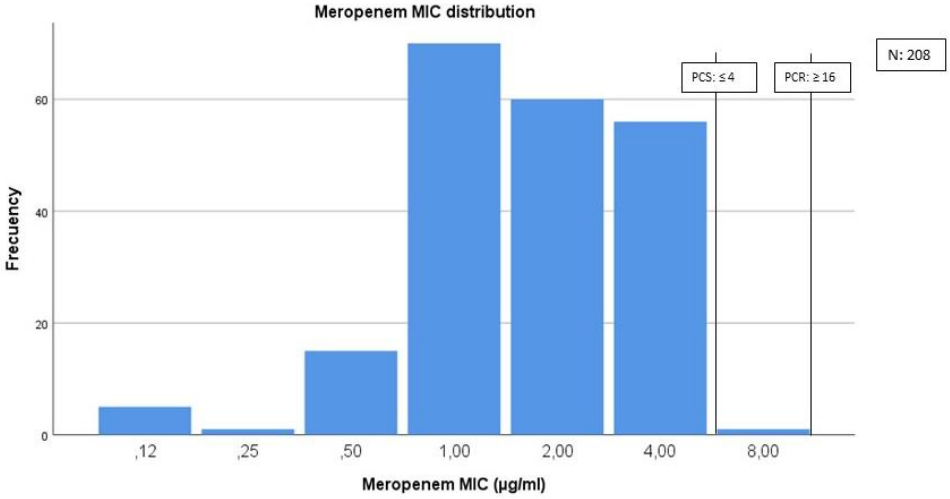


Figure 9. Distribution of isolates by imipenem MIC value.

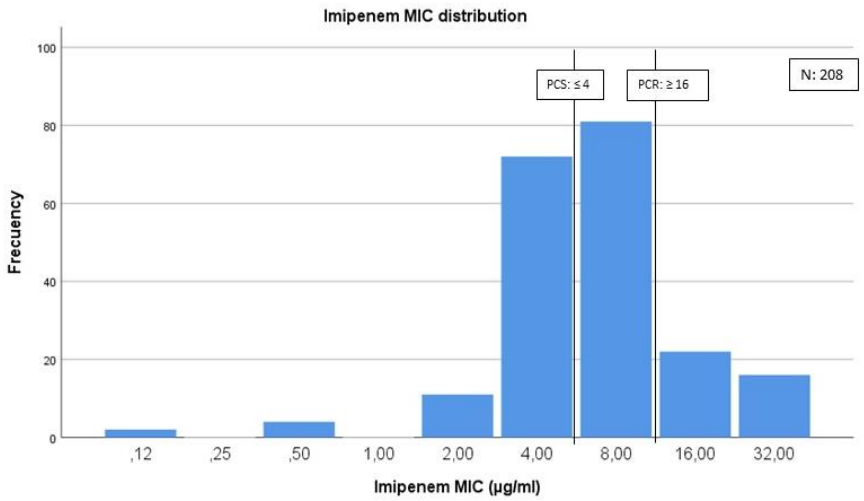


Figure 10. Distribution of isolates by ertapenem MIC value.

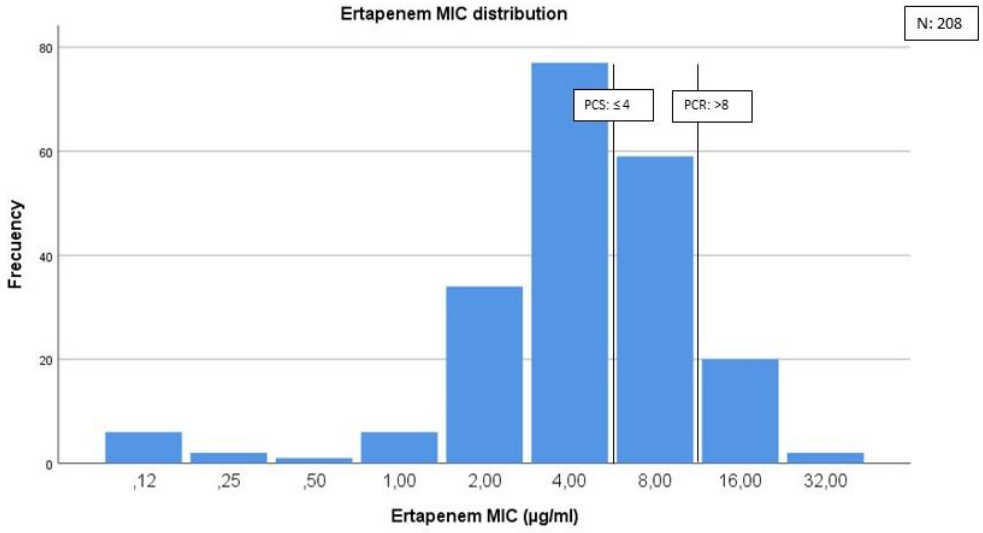


Figure 11. Distribution of isolates by clindamycin MIC value.

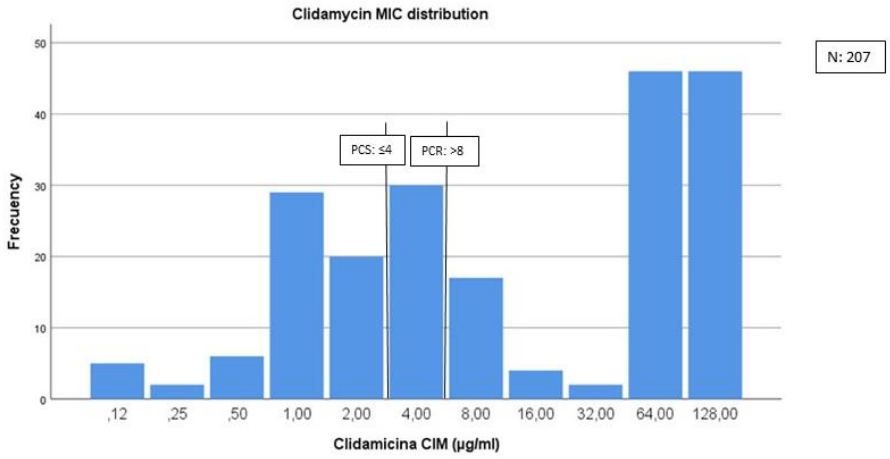


Figure 12. Distribution of isolates by azitrhomycin MIC value.

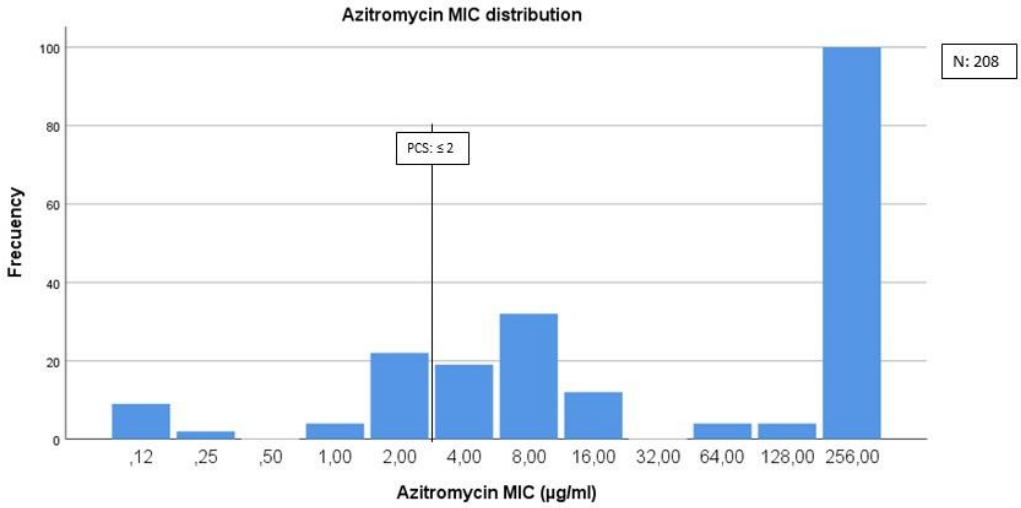


Figure 13. Distribution of isolates by moxifloxacin MIC value.

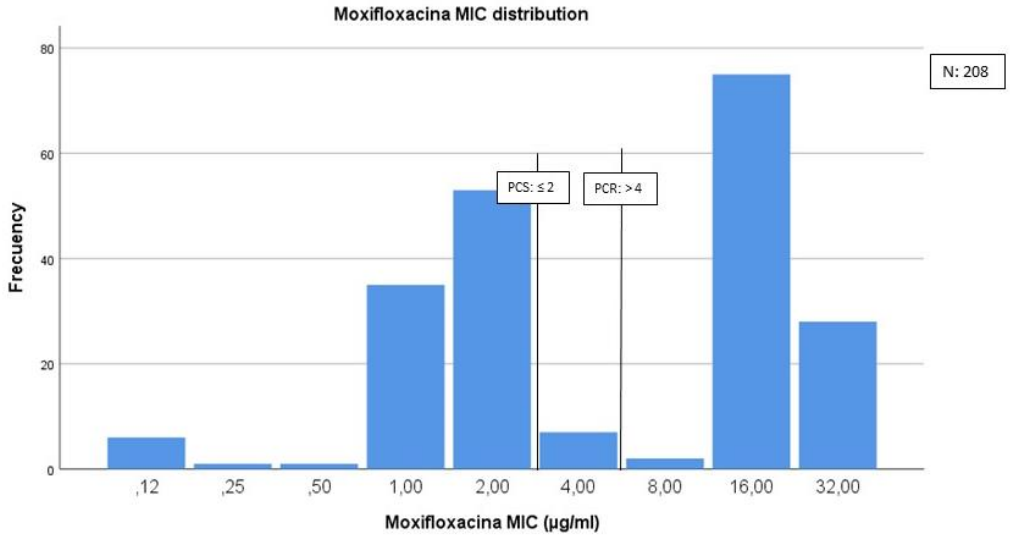


Figure 14. Distribution of isolates by levofloxacin MIC value.

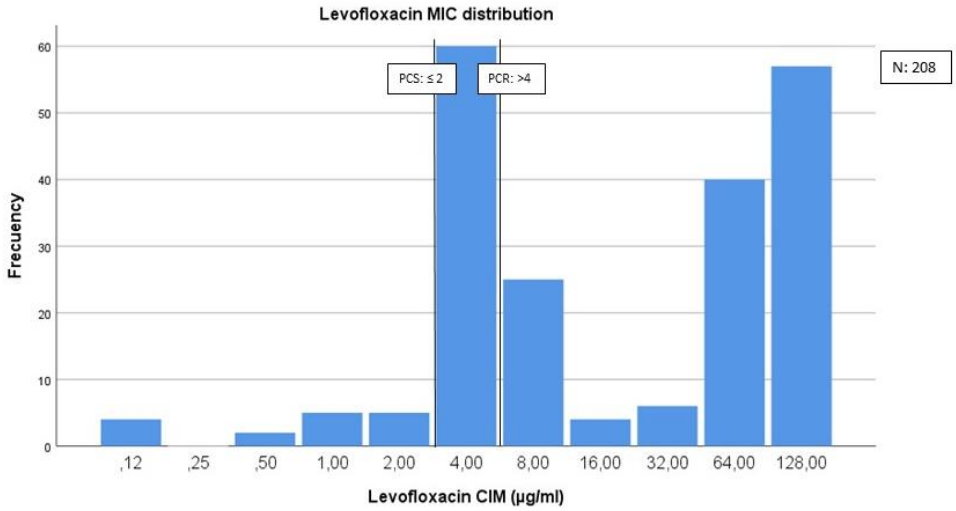


Figure 15. Distribution of rifaximin resistant isolates per centre

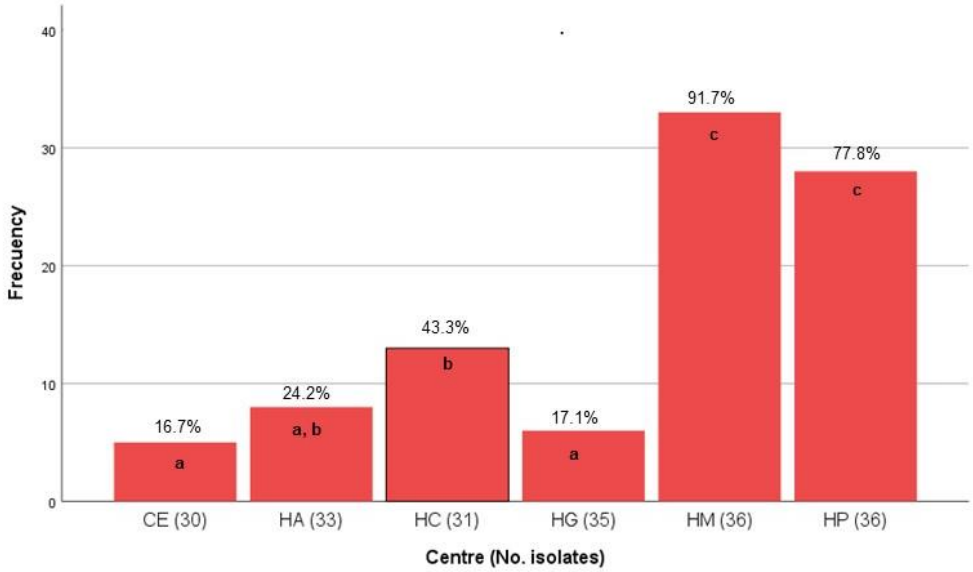


Figure 16. Distribution of azithromycin resistant isolates per centre

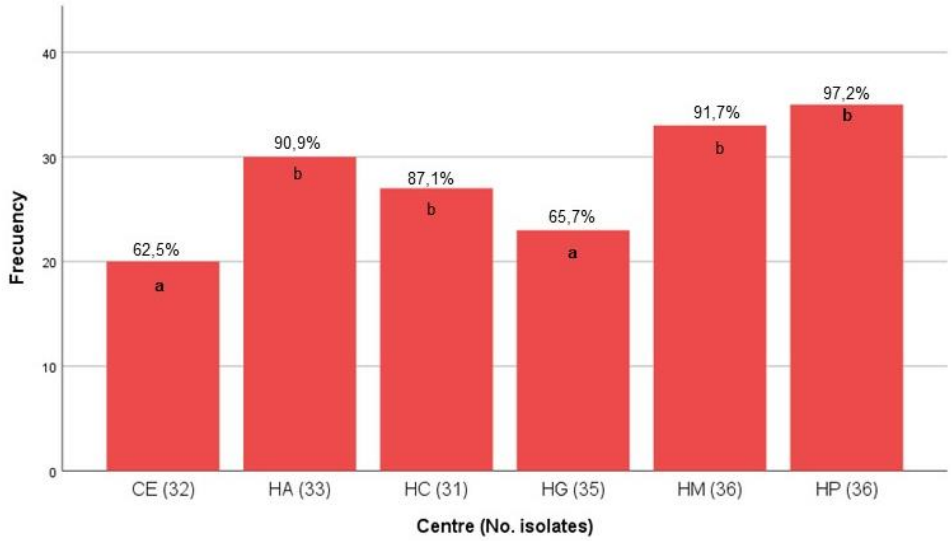


Figure 17. Distribution of clindamycin resistant isolates per centre

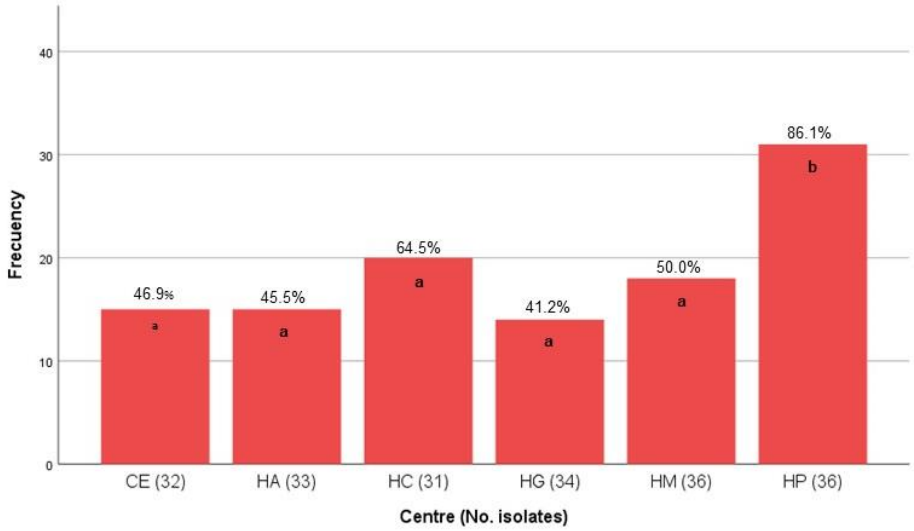


Figure 18. Distribution of moxifloxacin resistant isolates per centre

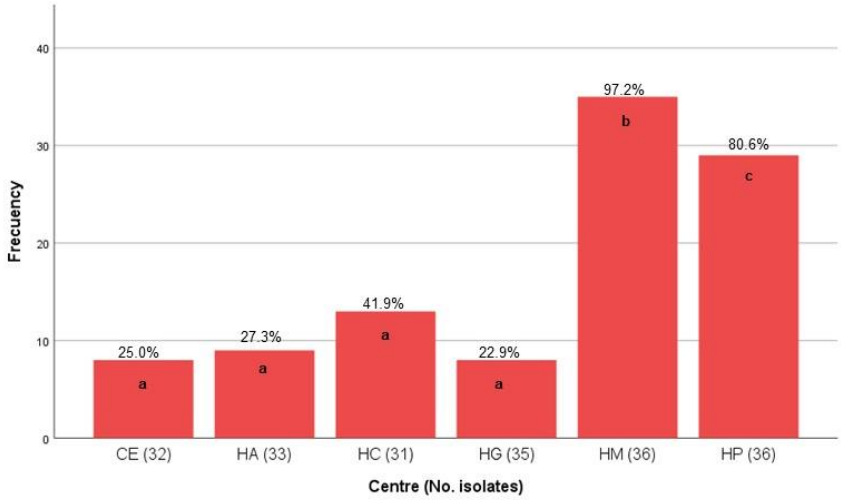
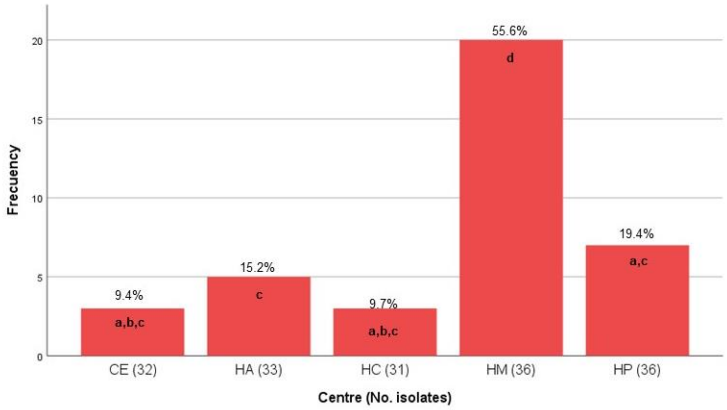
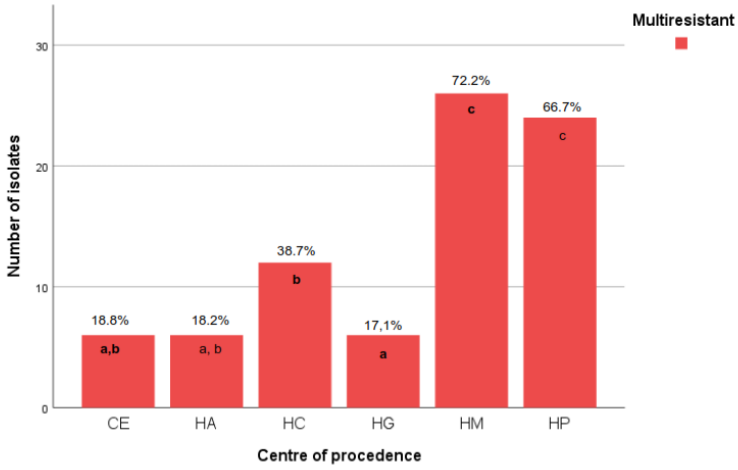


Figure 19. Distribution of imipenem resistant isolates per centre



Each letter in the resistance bars denotes a subset of centres whose proportions do not differ significantly from each other, $p < 0.05$.

Figure 20. Distribution of multiresistant isolates per centre.



Each letter in the resistance bars denotes a subset of centres whose proportions do not differ significantly from each other, $p < 0.05$.