

## Reportes de brotes hospitalarios, casos comunitarios, aislamientos en carne y análisis de determinantes moleculares responsables de fenotipos hipervirulentos de la bacteria anaerobia *Clostridium difficile*

Las infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS) representan un tema de gran relevancia a nivel mundial desde una perspectiva tanto de salud pública como académica. *C. difficile* es uno de los principales patógenos responsable de estas infecciones siendo una bacteria productora de toxinas las cuales en última instancia producen diarreas severas asociadas al uso y abuso de los antibióticos. Este patógeno bacteriano ha producido brotes epidémicos en varias regiones del mundo en los últimos años y los hospitales costarricenses no han estado exentos de los mismos.

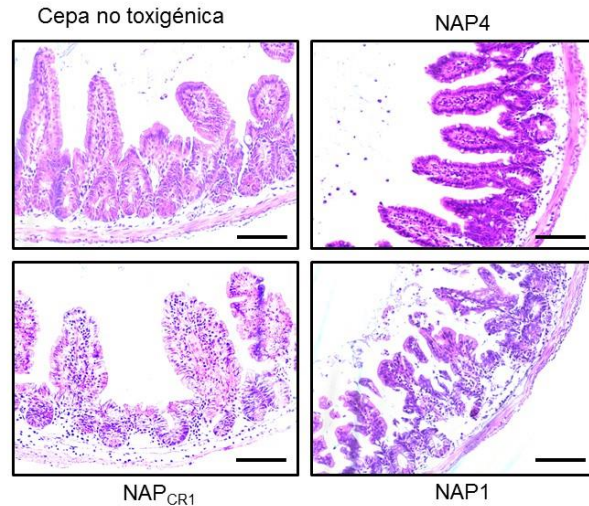


Figura 2. Descripción histopatológica de los daños producidos por la fracción secretada por los diferentes genotipos de *Clostridium difficile* en un modelo intestinal murino. La cepa control no toxigénica y el genotipo NAP4 no produce daños de consideración, por el contrario la cepa hipervirulenta NAP1 induce destrucción del epitelio y proceso inflamatorio importante posiblemente relacionado con la hiperproducción de toxinas, sin embargo el edema y el infiltrado inflamatorio producido por el genotipo endémico NAP<sub>CR1</sub> es considerable. El daño a nivel intestinal producido por el nuevo genotipo descrito en Costa Rica es muy similar al de la cepa hipervirulenta.

Con la Tesis Doctoral se obtuvo un aporte científico que aborda la problemática arriba mencionada desde diferentes aristas (epidemiológica, clínica, celular y genómica) y con una perspectiva global para contribuir a prevenir y controlar esta IAAS de importancia en salud pública. De la misma forma, esta Tesis plasma el entusiasmo de contribuir al desarrollo académico de Costa Rica posicionando a nuestro país como uno de los principales polos de estudio de este patógeno bacteriano. Con el valor agregado de que el trabajo fue desarrollado en su mayor parte en Instituciones de Educación Pública Superior Costarricense y con financiamiento principalmente de fondos públicos (CONARE, Universidad de Costa Rica, Universidad Nacional y MICITT/CONICIT).

Como parte de las contribuciones científicas destacadas cabe mencionar la descripción del surgimiento, por primera vez en América Latina, de la cepa hipervirulenta del genotipo NAP1/RT027. Esta descripción se reportó junto a una caracterización molecular de los aislamientos clínicos involucrados en el brote epidémico de grandes magnitudes que se presentó durante los años 2009-2010 en el Hospital San Juan de Dios y que cobró la vida de decenas de pacientes internados en el mismo. Durante este brote se logró determinar la

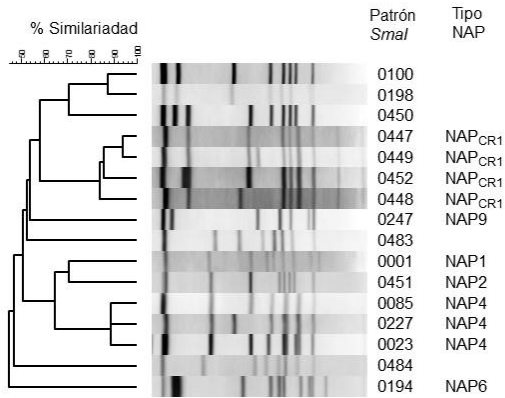


Figura 1. Patrones moleculares obtenidos por la técnica de electroforesis en campo pulsante (PFGE) de aislamientos de *Clostridium difficile* de un brote epidémico en un hospital de Costa Rica. Esta es la primera caracterización molecular de esta bacteria en Costa Rica. Se describen varios genotipos, a destacar el epidémico o hipervirulento NAP1 y el endémico o autóctono NAP<sub>CR1</sub>

participación de una cepa, hasta el momento desconocida a nivel mundial, perteneciente a un nuevo genotipo endémico de hospitales costarricenses y la cual fue denominada NAP<sub>CR1</sub>/RT012. De forma interesante y en contraposición al perfil de pacientes susceptibles a *C. difficile*, el genotipo autóctono NAP<sub>CR1</sub>/RT012 fue capaz de infectar a personas jóvenes sin comorbilidades de consideración. Adicionalmente, esta cepa presentó una resistencia particularmente alta a

varios antibióticos de uso en el país y se demostró que produjo tasas de mortalidad y recurrencia muy semejantes al genotipo hipervirulento NAP1/RT027. Sin embargo, análisis moleculares y celulares exhaustivos permitieron determinar que el genotipo endémico NAP<sub>CR1</sub>/RT012 no produce niveles incrementados de toxinas como sí lo hace la cepa hipervirulenta NAP1/RT027, característica a la cual se atribuye el carácter agresivo de esta última. Mediante el uso de modelos animales fue posible determinar que ambos genotipos son capaces de producir un daño inflamatorio importante a nivel intestinal. Con la secuenciación del genoma completo de decenas de aislamientos pertenecientes a los genotipos mencionados arriba y otros aislados durante diferentes brotes mediante una colaboración con el Instituto Sanger del Reino Unido, se determinó que otros factores adicionales a las toxinas, y que están presentes en material genético móvil, podrían estar vinculados con el potencial patogénico y virulento incrementado observado en este nuevo genotipo de *C. difficile* descrito en hospitales costarricenses.

Un análisis celular y molecular de una amplia colección de aislamientos clínicos obtenidos durante casi una década de vigilancia epidemiológica permitió realizar un estudio detallado de las toxinas producidas por cepas pertenecientes al genotipo hipervirulento NAP1/RT027. Este proceso permitió determinar que una cepa de este grupo presentaba una toxina diferente a las que convencionalmente se pueden encontrar en los aislamientos de cepas hipervirulentas. Un análisis más profundo a nivel genómico permitió concluir que la clasificación molecular de esta toxina, y por lo tanto de la cepa que la producía, es diferente a la de NAP1/RT027. La utilización de diferentes técnicas de tipificación permitió determinar la

clasificación exacta de esta cepa (NAP1/RT019/ST67), la cual fue denominada como NAP1v. Se determinó que este genotipo sobreproduce toxinas al igual que el genotipo hipervirulento clásico NAP1/RT027. No obstante, se demostró que NAP1v produce una toxina B variante que modifica proteínas diferentes a las modificadas por toxinas de genotipo hipervirulento NAP1/RT027. Mediante técnicas de biología celular fue posible determinar que esta diferencia en sustratos celulares define el tipo de alteración morfológica que se observa en las células intoxicadas y la capacidad de inducir una respuesta inflamatoria. Por lo tanto, el conocimiento generado permite entender el proceso de patogénesis e inducción del daño a nivel intestinal mediado por *C. difficile*.

La tesis doctoral también contribuyó con reportes novedosos en esta área de investigación, tal como: (i) la descripción de *C. difficile* en carnes para consumo humano en Costa Rica que pertenecían a genotipos que ya se habían reportado en hospitales, (ii) el reporte del primer caso en América Latina de una infección por este patógeno a nivel comunitario con la particularidad de haberse producido en un paciente pediátrico y por un genotipo hipervirulento y (iii) la descripción del genotipo hipervirulento NAP1/RT027 en un hospital de Panamá.

A la par de las contribuciones estrictamente académicas de la Tesis Doctoral, el trabajo se consolidó como un eje nucleador central del establecimiento de una nueva línea de investigación en el país con lo que se lograron obtener réditos adicionales. Por ejemplo: la descripción un nuevo genotipo de *C. difficile* genéticamente muy cercano al hipervirulento NAP1/RT027. Se determinó que esta cepa también sobroproduce toxinas pero con una toxina variante y que en modelos animales tiene una gran capacidad de destrucción del epitelio, de inducción de una respuesta inflamatoria y, algo que no había sido descrito, la generación de estrés oxidativo a nivel intestinal por estos genotipos hipervirulentos.

Por último, con el desarrollo de este trabajo se logró la consolidación de una red de trabajo de investigadores nacionales con cooperación de institutos o universidades extranjeras

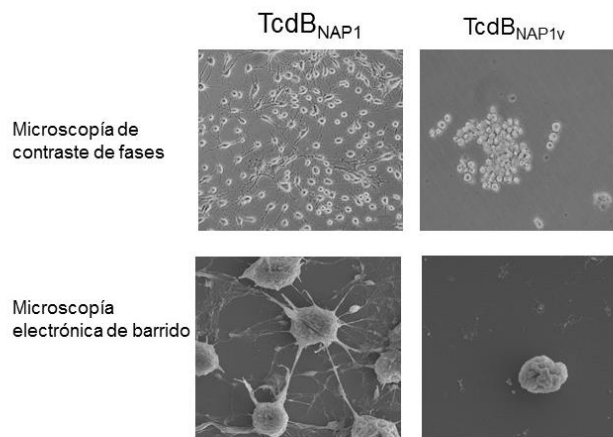


Figura 3. Efectos en cultivo celular por toxinas B (TcdB) de dos diferentes cepas del genotipo hipervirulento. Las células intoxicadas por la TcdB de NAP1 muestra un efecto arborizante o clásico, por el contrario TcdB de otra cepa de NAP1 (NAP1v) Produce un efecto variante donde se va un redondamiento completo de la célula. con esto se describe una variación en las toxinas producidas cepas de un mismo genotipo (NAP1) que se ha asociado con brotes epidémicos.

y captación de financiamiento externo, aunado al aprovechamiento de la infraestructura y equipamiento de instituciones públicas y en el desarrollo de metodologías experimentales en laboratorios de la Universidad de Costa Rica y la Universidad Nacional necesarias para continuar al establecimiento de una línea investigación de sobre la patogénesis, virulencia y genómica de este patógeno bacteriano.

#### **Publicaciones científicas producto del trabajo:**

1. **Quesada-Gómez, C.**, Rodríguez, C., Gamboa-Coronado, MM., Du, T., Villalobos-Zuñiga, M., Boza-Cordero, R., Mulvey, MR., Rodríguez-Cavallini, E. (2010). Emergence of *Clostridium difficile* NAP1 in Latin America. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(2), 669-70.
2. **Quesada-Gómez, C.**, Vargas, P., López-Ureña, D., Gamboa-Coronado, MM., Rodríguez-Cavallini, E. (2012). Community-acquired *Clostridium difficile* NAP1/027-associated diarrhea in an eighteen month old child. *Anaerobe*, 18, 581-3.
3. López-Ureña, D., **Quesada-Gómez, C.**, Miranda, E., Fonseca, M., Rodríguez-Cavallini, E. (2014). Spread of epidemic *Clostridium difficile* NAP1/027 in Latin America: case reports in Panama. *Journal of Medical Microbiology*, 63, 322-4.
4. **Quesada-Gómez, C.**, Mulvey, MR., Vargas, P., Gamboa-Coronado MM., Rodríguez, C., Rodríguez-Cavallini, E. Isolation of toxigenic and clinical genotype of *Clostridium difficile* in retail meats in Costa Rica. *Journal of Food Protection*, 76, 348-51.
5. **Quesada-Gómez, C.**, López-Ureña, D., Acuña-Amador, L., Villalobos-Zuñiga, M., Du, T., Freire, R., Gúzman-Verri, C., Gamboa-Coronado, M., Lawley, T., Moreno, E., Mulvey, M.R., Brito, G.A.C., Rodríguez-Cavallini, E., Rodríguez, C., Chaves-Olarte, E. (2015). Emergence of an outbreak-associated *C. difficile* variant with increased virulence. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(4), 1216-1226.
6. Costa C., López-Ureña D., Assis T., Ribeiro R.A., Silva R.O.S., Rupnik M., Carvalho A., Carmo A.O., Chaves-Olarte E., Dias A.M., de Carvalho C.B.M., Rodríguez C., **Quesada-Gómez C.**, Brito G.A.C. (2016). A MLST Clade 2 *Clostridium difficile* strain with a variant TcdB induces high levels of histologic inflammatory damage, epithelial disruption and oxidative response. *Anaerobe*. En revisión.
7. **Quesada-Gómez, C.**, López-Ureña, D., Chumbler N., Kroh H.K., Castro-Peña C., Rodríguez C., Orozco-Aguilar J., González-Camacho S., Rucavado A., Guzmán-Verri C., Lawley T.D., Lacy D.B., Chaves-Olarte E. (2016). Analysis of TcdBs within the hypervirulent clade 2 reveals an impact of RhoA glucosylation in *Clostridium difficile* pro inflammatory activities. *Infection and Immunity*, 84(3): 856 – 865.