



**FACULTAD DE FARMACIA**  
**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO**  
**TOXINAS DE *CLOSTRIDIUM DIFFICILE***

Autor: Beatriz Lascurain de Mora  
Tutor: Rebeca Alonso Monge  
Convocatoria: Febrero 2018

## ÍNDICE

1. Resumen	Pág. 2
2. Introducción	Pág. 2
2.1. Endotoxinas	Pág. 3
2.2. Exotoxinas	Pág. 3
3. Objetivos	Pág. 5
4. Metodología	Pág. 5
5. Resultados y discusión	Pág. 6
5.1. <i>Clostridium difficile</i>	Pág. 6
5.1.1. Epidemiología	Pág. 6
5.1.2. Patogenia	Pág. 7
5.1.3. Manifestaciones clínicas	Pág. 7
5.1.4. Diagnóstico	Pág. 8
5.1.5. Tratamiento	Pág. 10
5.2. Visión general de la genética, expresión y secreción de las toxinas de <i>C. difficile</i>	Pág. 13
5.2.1. Papel de TcdA, TcdB y CDT en CDI	Pág. 14
5.2.2. Patogenia	Pág. 15
5.2.3. Efectos celulares causados por TcdA y TcdB	Pág. 18
6. Conclusiones	Pág. 19
7. Bibliografía	Pág. 19

## 1. RESUMEN

*Clostridium difficile* es un bacilo gram positivo esporulado y productor de toxinas causante de una infección del colon que se manifiesta con un cuadro diarreico que aparece frecuentemente tras el uso de antibióticos de amplio espectro que han dañado la microbiota colónica previamente.

En las últimas décadas se ha producido un aumento importante de la incidencia de la diarrea asociada a *Clostridium difficile* (DACD), siendo actualmente la principal causa de diarrea en pacientes adultos hospitalizados además de una causa importante de morbilidad y mortalidad.

Los síntomas de la infección por este microorganismo están directamente relacionados con la producción de dos exotoxinas: la toxina A (TcdA) y la toxina B (TcdB). Además, algunas cepas de *C. difficile*, producen una tercera toxina denominada *C. difficile* transferasa (CDT) o toxina binaria, la cual está implicada en una mayor citotoxicidad de la cepa.

Estas toxinas actúan induciendo la muerte de las células epiteliales, causando así una lesión directa del epitelio colónico. Además, estimulan la liberación de mediadores proinflamatorios. La barrera epitelial desgastada junto con la respuesta inflamatoria contribuyen a la formación de pseudomembranas, las cuales se observan en los casos severos de infección por *C. difficile*.

## 2. INTRODUCCIÓN

A fin de causar una enfermedad, los patógenos tienen que emplear una serie de mecanismos conocidos como factores de virulencia que les protegen de la inmunidad innata del huésped y les permiten cruzar las barreras de la mucosa, diseminarse y replicarse en distintos órganos. Cada fase de la infección requiere la expresión de distintos factores de virulencia. Entre los factores de virulencia más importantes encontramos las toxinas, las cuales van a ser detectadas por las células inmunitarias del huésped mediante unas moléculas de superficie denominadas PRR (receptores de reconocimiento de patrones).

Estas toxinas son sustancias con actividad bioquímica producidas por ciertos microorganismos que, a menudo contribuyen a las propiedades patogénicas de las bacterias (1).

La capacidad de producir toxinas de los microorganismos se denomina toxigenicidad.

Se distinguen dos clases de toxinas, bioquímicamente diferentes entre sí: exotoxinas y endotoxinas.

### **2.1. Endotoxinas**

Las endotoxinas solamente son producidas por bacterias gram negativas dado que forman parte de la membrana externa de la pared celular de las mismas. La membrana externa está compuesta por lipopolisacáridos, lipoproteínas y fosfolípidos. Los lipopolisacáridos están formados por el lípido A, el core o cuerpo y el antígeno O. El lípido A es la porción lipídica que se ancla en la membrana externa de la pared celular, y constituye la endotoxina. Por lo que todas las bacterias gram negativas producen endotoxinas, que son liberadas cuando la bacteria muere y sus paredes celulares sufren una lisis.

El lípido A es reconocido por las células del sistema inmune. Concentraciones picomolares de endotoxinas son suficientes para producir la estimulación de macrófagos que producen la liberación de citoquinas como IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  en altas concentraciones llevando a la apoptosis de estas células. Aunque el lípido A es suficiente para la activación de la respuesta innata, la activación de la respuesta adaptativa durante la infección está desencadenada normalmente por el O-antígeno (1). Entre las manifestaciones clínicas encontramos escalofríos, fiebre, debilidad, dolor generalizado y, en algunos casos shock y muerte.

Dado que las endotoxinas, a diferencia de las exotoxinas no tienen naturaleza proteica, son relativamente termoestables y tampoco estimulan el sistema inmunitario para que se produzcan anticuerpos específicos.

### **2.2. Exotoxinas**

Las exotoxinas son proteínas solubles, más o menos termolábiles, fuertemente antigénicas y de una alta toxicidad. Son producidas en el interior de la bacteria como parte de su crecimiento y metabolismo y son secretadas después de la lisis. Las bacterias pueden ser tanto gram positivas como gram negativas. Los genes de la mayoría de las exotoxinas son transportados por plásmidos bacterianos o fagos. Dado que estas exotoxinas son solubles en los líquidos corporales, se difunden con facilidad hacia la sangre y son transportadas rápidamente por todo el organismo. Normalmente, el término toxina hace referencia a estas exotoxinas.

Las exotoxinas afectan únicamente a aquellos tejidos en los que existen receptores adecuados, de forma que, por ejemplo, podemos distinguir neurotoxinas, como la toxina tetánica y botulínica que ejercen sus efectos solamente sobre las células del sistema

nervioso; o enterotoxinas, como la toxina colérica que actúa exclusivamente sobre las células epiteliales del tracto intestinal. (2)

Según su mecanismo de acción las exotoxinas se dividen en tres tipos principales:

- Toxinas A-B.

Toxina compuesta por dos subunidades, siendo en la mayoría de casos la parte A el componente activo y la parte B la subunidad de fijación (figura 1). Por ejemplo, la toxina diftérica.

*Corynebacterium diphtheriae* produce la toxina diftérica, la cual consta de dos subunidades (A y B) unidas por un puente disulfuro. La subunidad B se une a los receptores de la membrana celular mediante un dominio de reconocimiento (R). Una vez que se pone en contacto con ella, el dominio T de la subunidad B sufre un cambio de conformación causado por un cambio de pH que permitirá la entrada de la subunidad A en la célula. La subunidad A es una ADP-ribosilasa que ribosila al factor de elongación EF2, una proteína del ribosoma que interviene en la traducción del ARN. La ribosilación inactiva la proteína, por lo que la toxina actúa como un inhibidor de la traducción, inhibiendo por lo tanto la síntesis de proteínas. Además, el EF2 es un factor que sólo se encuentra en las células eucariotas, por lo que la síntesis de proteínas del microorganismo no se altera.

- Toxinas alteradoras de membranas.

Aquellas que causan la lisis de las células del huésped tras alterar sus membranas lipídicas. Por ejemplo, las estreptolisinas de *Streptococcus pyogenes*.

*S. pyogenes* elabora dos estreptolisinas, la estreptolisina O y la S. La estriptoisina O es una proteína hemolíticamente activa en estado reducido, pero en presencia de oxígeno se inactiva. La estreptolisina S por el contrario es estable al oxígeno y menos inmunogénica. Ambas lesionan las membranas celulares y producen la lisis no solo de eritrocitos sino también de leucocitos.

- Superantígenos.

A diferencia de lo convencional, existen antígenos que estimulan una gran cantidad de linfocitos T saltándose la ruta normal de presentación (a través del complejo principal

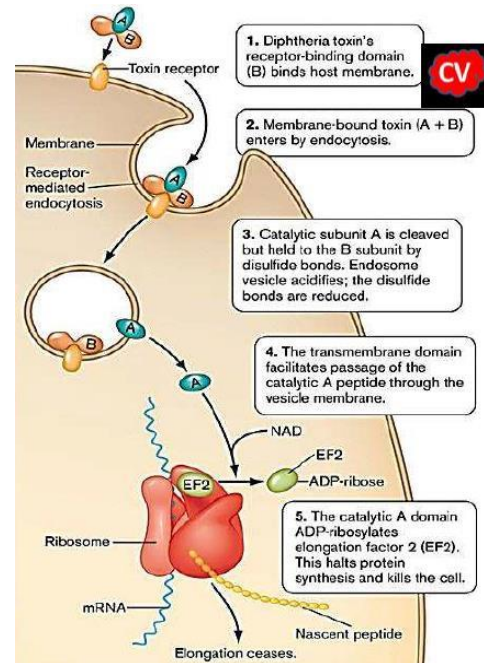


Figura 1. Mecanismo de acción de las toxinas A-B

de histocompatibilidad a Linfocitos T), estos reciben el nombre de superantígenos. Provocan una respuesta inmunitaria muy intensa debido a que no sufren el procesamiento intracelular en las células presentadoras de antígenos e interaccionan con distintas células del sistema inmunitario estimulando de forma no específica la proliferación de linfocitos T. Los superantígenos se unen prácticamente a todas las células T que tienen una región V $\beta$ , lo que implica a 1 de cada 5 linfocitos T, o dicho de otra manera pueden estimular al 20% de los linfocitos T de un individuo, a diferencia de un antígeno convencional que estimula al 1% de los mismos. Los linfocitos T liberan altas cantidades de citoquinas, aumentando su concentración en el torrente sanguíneo lo que da lugar a síntomas como fiebre, náuseas, vómitos, diarrea y, en ocasiones shock y muerte (3). Un ejemplo de superantígeno bacteriano son la toxina de shock tóxico estafilocócica (TSST-1).

El organismo puede neutralizar las exotoxinas mediante la producción de antitoxinas, es decir, anticuerpos que neutralizan a las exotoxinas (4).

Las exotoxinas, dado su naturaleza proteica pueden ser desnaturalizadas mediante compuestos químicos perdiendo su toxicidad y dando lugar a una exotoxina alterada denominada toxoide. La administración de estos toxoides en el organismo como vacunas, estimularán la producción de antitoxinas produciendo inmunidad.

### **3. OBJETIVOS**

Dada la importancia que las toxinas bacterianas tienen en la patogénesis de determinados microorganismos de relevancia clínica, el objetivo planteado es realizar una revisión bibliográfica para profundizar en el conocimiento de las toxinas producidas por *C. difficile* y su relación con la gravedad, sintomatología, etc de la infección por *C. difficile* especialmente en infecciones hospitalarias.

### **4. METODOLOGÍA**

La presente revisión bibliográfica sobre las toxinas de *C. difficile* se ha realizado utilizando principalmente las plataformas Pubmed y ScienceDirect como buscadores, acotando la búsqueda a un rango de antigüedad de 10 años y seleccionando principalmente artículos de acceso gratuito. Con el mismo criterio se ha utilizado Google Scholar para la búsqueda de estudios científicos publicados. También se han consultado fuentes oficiales de datos sanitarios y de investigación, procedente de páginas web de organismo de referencias, como la base de datos de la Agencia Española

de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) empleada con el fin de analizar las fichas técnicas de los distintos fármacos para el tratamiento de la infección por *C. difficile*, o la Organización Mundial de la Salud (OMS).

## **5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **5.1. *Clostridium difficile***

*Clostridium difficile* es un bacilo gram positivo esporulado, anaerobio estricto, no invasivo, productor de toxinas descrito por primera vez en 1935 (5).

Causa una infección del colon que se manifiesta con un cuadro diarreico que aparece frecuentemente tras el uso de antibióticos de amplio espectro que han dañado la microbiota colónica previamente (6).

En las últimas décadas se ha producido un aumento importante de la incidencia de la diarrea asociada a *Clostridium difficile* (DACD), siendo actualmente la principal causa de diarrea en pacientes adultos hospitalizados además de una causa importante de morbilidad y mortalidad.

La primera vez que se identificó como agente causal de la colitis pseudomembranosa en humanos fue en 1978 (5).

#### **5.1.1. Epidemiología**

*C. difficile* (CD) forma parte de la microbiota fecal en el 1-3% de los adultos sanos en la comunidad, aumentando a un 20% en adultos hospitalizados y pudiendo alcanzar un 50% en pacientes crónicos hospitalizados. Los pacientes asintomáticos son un reservorio de gran importancia, al igual que los recién nacidos, con tasas que superan al 50% de los mismos aunque es poco probable que la enfermedad se presente en esta población dado que no presentan los receptores para la toxina de *C. difficile* (5)(6).

El contagio se produce, a menudo, dentro del hospital, por lo que el riesgo aumenta de forma proporcional a la duración de la hospitalización. Sin embargo, en la última década, la proporción de infecciones por *C. difficile* en pacientes fuera del hospital ha aumentado, lo que sugiere un contagio en comunidad, no solamente en el hospital (7).

Además de la estancia en el hospital hay otros factores de riesgo que aumentan la probabilidad de infección por *C. difficile* como el consumo reciente de antibióticos, edad avanzada (>65 años) y la severidad de la enfermedad subyacente.

Este incremento del número y severidad de los casos viene de la mano de la aparición de una cepa denominada B1/NAP1/027, la cual presenta el patrón de restricción [REA] tipo B1, el patrón de campo pulsado NAP1, pertenece al ribotipo 27 y tiene además el

toxino tipo III. Tiene una mayor virulencia debido a una producción aumentada de toxinas, se relaciona con más fracasos terapéuticos debido a su resistencia a una nueva y amplia gama de antibióticos y con una mayor mortalidad asociada a esta patología (8). Sin embargo, el incremento de las infecciones por *C. difficile* no puede atribuirse solamente a esta cepa, sino que se han descrito otras como los ribotipos 001, 053, 106 y 078, los cuales tienen un mecanismo similar de hiperproducción de toxinas.

### 5.1.2. Patogenia

La infección por *C. difficile* es consecuencia de la ingestión de las esporas de una cepa toxigénica. Tras ser ingeridas, estas van a resistir la acción del ácido gástrico llegando al intestino delgado. Allí germinan y colonizan el colon, donde van a elaborar diversas toxinas que inician una serie de fenómenos que culminan con la pérdida de la función de la barrera que poseen las células epiteliales, la aparición de diarrea y la formación de pseudomembranas.

La patogenia de *C. difficile* resulta de la producción por las cepas toxigénicas de dos exotoxinas: mayoritariamente la toxina A (TcdA) enterotóxica, y la toxina B (TcdB) citotóxica, esencial en la virulencia de la bacteria y 10 veces más potente que la TcdA. Ambas son introducidas en la célula mediante endocitosis por células epiteliales. Una vez dentro de la célula van a inactivar procesos reguladores mediados por proteínas Rho y Rac, como explicaremos más adelante.

Algunas cepas como el ribotipo 027, son productoras de una toxina binaria que aumenta la adhesión de *C. difficile* y a nivel del citoesqueleto provoca una mayor pérdida de líquidos.

Como consecuencia de todo este proceso, las células epiteliales se desestructuran separándose entre ellas e incluso muriendo y, facilitando la migración de neutrófilos y mediadores de la inflamación como IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e IL-8 que contribuyen a la respuesta inflamatoria típica de la colitis y la formación de pseudomembranas (5).

### 5.1.3. Manifestaciones clínicas

El periodo de tiempo que se comprende entre la ingestión de la espora hasta la aparición del primer síntoma es variable en función de factores microbiológicos, bioquímicos e inmunológicos del colon del paciente (7).

La diarrea es el síntoma fundamental y más frecuente en la infección por *C. difficile* (ICD). Se define como diarrea la presencia de heces sueltas casi siempre sin mostrar sangre aunque sí mucosidad, de consistencia blanda o acuosa en un alto número de deposiciones al día. Hay que tener en cuenta los casos de íleo adinámico, identificado



en las radiografías de abdomen o tomografía computerizada, porque en este caso se interrumpe la expulsión de heces, derivando a un mal diagnóstico de la ICD. La diarrea asociada a *C. difficile* es la principal causa de diarrea nosocomial en países desarrollados (9).

Los signos clínicos y de laboratorio son fiebre, dolor abdominal, leucocitosis importante ( $<15.000 \cdot 10^9$  células/L), hipoalbuminemia y aumento de la proteína C reactiva.

En función de las manifestaciones clínicas, la mayoría de guías terapéuticas clasifican la ICD en cuatro: ICD no severa, ICD severa, primera recurrencia de ICD y múltiples recurrencias de ICD.

La ICD severa ha sido definida como un episodio de infección por *C. difficile* que cursa con uno o más síntomas específicos, además de una colitis severa o una complicación en el transcurso de la enfermedad con efectos tóxicos significativos a nivel sistémico. Si un paciente sufre megacolon tóxico también es considerada una infección severa dado que cursa con la distensión del colon combinado con una respuesta inflamatoria sistémica severa. La formación de pseudomembranas en el colon es otro signo de enfermedad grave. También incluimos en este grupo a pacientes sin signos de colitis severa con una edad superior a los 65 años, comorbilidades importantes, ingresados en la Unidad de Cuidados Intensivos o inmunodeprimidos (10).

Se considera una recurrencia de la ICD si se presenta en las ocho semanas posteriores al primer episodio, de la mano de los mismos síntomas y tras haber completado el tratamiento inicial.

Las recurrencias aparecen en el 15-30% de los casos tras el primer episodio, y esta recaída se asocia a un cuadro clínico severo asociado a íleo o perforación intestinal hasta en el 11% de los casos. Además, los pacientes que sufren una primera recurrencia, tienen un 33-60% de posibilidades de padecer nuevas recurrencias (6).

Las infecciones extraintestinales por *C. difficile* son mínimas, representando un 0,6% de todas las infecciones por el patógeno. Además, las esporas fuera del colon son resistentes al calor, ácidos y antibióticos, incluyendo los antisépticos y desinfectantes que se usan de forma rutinaria a nivel hospitalario lo que facilita el contagio y la infección.

#### **5.1.4. Diagnóstico**

El diagnóstico se basa en una combinación de criterios clínicos y datos de laboratorio:

a) diarrea (3 deposiciones o más diarias durante más de 24 h sin otra causa identificable); además b) evidenciar la presencia de las toxinas en heces, o c) la

identificación de pseudomembranas en el colon mediante visión directa por colonoscopia. La identificación de pseudomembranas refleja una forma más avanzada de la enfermedad y se identifica sólo en el 50% de los sujetos con diarrea asociada a *C. difficile* (DADC), por tanto, la negatividad de la colonoscopia no descarta la presencia de enfermedad (5).

La muestra de elección son las heces diarreicas frescas, no sólidas, el envío de la muestra ha de ser lo más rápido posible y refrigerada.

El método de referencia para el diagnóstico de DADC son los estudios de la citotoxicidad de las heces en cultivo celular. Es un diagnóstico muy sensible, aunque poco específico dado que la toxicidad también se puede observar por factores no relacionados con las toxinas de *C. difficile*. Para aumentar la especificidad del estudio, se realiza una neutralización con antitoxinas específicas.

Otro método es el aislamiento mediante el cultivo de *C. difficile* a partir de las heces en medios selectivos, tras el cual se realizará la clásica tinción de Gram y finalmente se tendrá que confirmar la identificación mediante pruebas bioquímicas. El inconveniente del cultivo es que es una prueba de poca especificidad dado que también se detecta el crecimiento de las cepas no toxigénicas de *C. difficile*.

El uso combinado de las dos técnicas mencionadas anteriormente, es decir, del cultivo y los estudios de citotoxicidad presentarían una elevada sensibilidad y especificidad, pero tienen una grave desventaja. Se trata del largo periodo de tiempo que hay que esperar para obtener los resultados: 4 días (6).

Actualmente los métodos de elección son las pruebas de detección rápida, como la detección del antígeno glutamato deshidrogenasa (GDH), la detección de toxinas A y/o B o como la detección de ácidos nucleicos relacionados con las toxinas.

La mayoría de los algoritmos propuestos por la literatura sugieren un diagnóstico en dos o tres escalones (figura 3). Utilizan como método de cribado la detección mediante EIA (inmunoensayo enzimático) de la enzima GDH por su alta sensibilidad diagnóstica. En el segundo escalón, que es posible realizarlo a la vez que el primero, se realiza la detección de TcdA y TcdB. Si los resultados son negativos para ambas pruebas se puede concluir como negativa la infección por *C. difficile*; si los resultados dan positivo para GDH y alguna toxina se informa como positivo; y si, los resultados son contrarios para cada una de las pruebas, se requiere la confirmación con un nuevo test que podría ser el cultivo y/o el estudio de citotoxicidad. Dado que esta última confirmación es muy lenta,

se ha sugerido aplicar técnicas moleculares como confirmatorias ya que aportan rapidez y sensibilidad al mismo tiempo (6)(9).

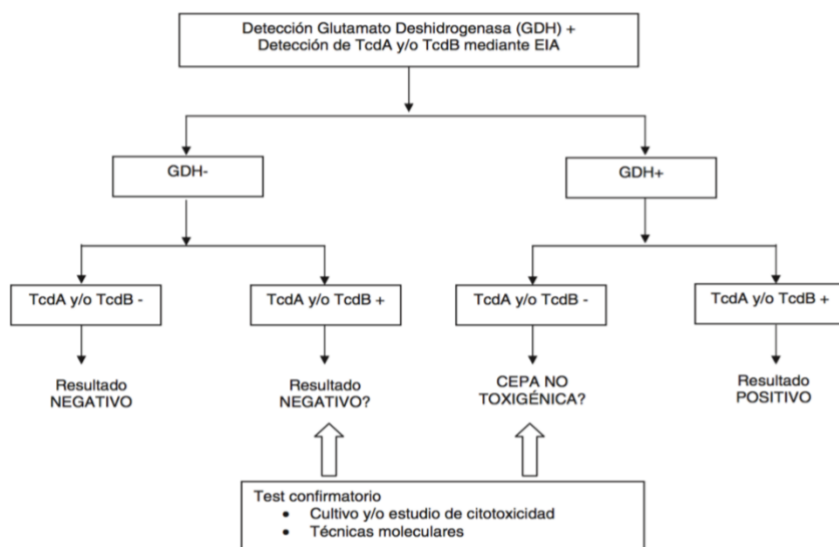


Figura 3. Algoritmo de detección de *C. difficile*

### 5.1.5. Tratamiento

Ante una infección por *C. difficile* se recomienda suprimir el antibiótico que posiblemente ha desencadenado la patología o sustituirlo por otro. Además, el paciente debe recibir un tratamiento de soporte que incluyen la hidratación y reposición hidroelectrolítica (5).

Los antibióticos de elección han sido siempre el metronidazol y la vancomicina, a los que actualmente se suma la fidaxomicina.

#### - Metronidazol:

El metronidazol es un antibiótico bacteriostático, es decir, impide la reproducción del microorganismo, pero no lo mata. Es de administración oral siempre que sea viable, pero se puede recurrir a la administración intravenosa cuando encontramos alguna contraindicación para la oral.

Tiene una alta biodisponibilidad oral, absorbiéndose completamente en el intestino delgado, por lo tanto, va a seguir una distribución sistémica lo que potencialmente va a dar lugar a un mayor número de reacciones adversas al medicamento (RAM). Sin embargo, sus efectos adversos son de una severidad baja o moderada (10).

Es un antibiótico de amplio espectro, por lo que va a causar un daño significativo en la microbiota colónica comensal. Esta disrupción de la microbiota comensal va a predisponer al individuo a recurrencias en la ICD o a una colonización por patógenos como *Candida* (10).

La concentración que el metronidazol y su metabolito el hidroximetronidazol alcanzan en la mucosa colónica varía dependiendo de la consistencia de las heces: conforme la consistencia va siendo menos acuosa, la concentración de estas moléculas va disminuyendo hasta casi desaparecer.

- Vancomicina

La vancomicina es un antibiótico bacteriostático al igual que el metronidazol.

Su administración también es oral salvo en casos en los que no pueda realizarse que se recurre a la administración por vía rectal en forma de enemas. Hay que tener precaución en esta última vía de administración dado que hay riesgo de perforación, además que nunca debe administrarse en monoterapia si se trata de administración rectal para asegurar el alcance de toda la zona afectada, debe asociarse con metronidazol intravenoso (5).

Tiene una baja biodisponibilidad oral, es decir, no se absorbe en el intestino delgado por lo que la vancomicina va a alcanzar unas concentraciones intracolónicas muy elevadas.

En casos de colitis pseudomembranosa, debido a que se presenta con una inflamación colónica, se va a producir la absorción de la vancomicina dando lugar a RAM (10).

Es un antibiótico de amplio espectro por lo que causa un daño a la microbiota colónica al igual que el metronidazol.

La vancomicina ha demostrado ser de mayor eficacia que el metronidazol en casos de infección por CD severa además de dar lugar a un menor índice de recurrencias, mientras que en los casos de infección no severa no ha demostrado una diferencia significativa frente a la eficacia del metronidazol respecto a curación clínica o índices de recurrencia (8).

- Fidaxomicina

Recientemente ha sido comercializado la fidaxomicina, un antibiótico macrólido con actividad bactericida. Actúa inhibiendo la RNA polimerasa de las bacterias gram positivas. Inhibe la esporulación de *C. difficile* (11).

Es un antibiótico de administración oral. Actualmente se está estudiando una nueva pauta en el tratamiento de fidaxomicina mediante pulsos (12).

Tiene una baja biodisponibilidad oral, no se absorbe, por lo que al igual que la vancomicina va a alcanzar unas concentraciones muy elevadas a nivel fecal y prácticamente indetectables en plasma.

Una de sus ventajas es que tiene un espectro más estrecho, con lo que respeta la microbiota colónica con lo que conseguiremos disminuir el índice de recurrencias. Una limitación es su elevado coste (13).

Además del tratamiento antibiótico se recurren a otras medidas para combatir la infección por *C. difficile*:

- Colectomía

La colectomía es una técnica que consiste en una cirugía del intestino grueso. Sólo está indicada ante una perforación del colon o una inflamación sistémica que no responde a antibióticos como íleo severo o megacolon tóxico.

El marcador de gravedad que se emplea para considerar la colectomía es una concentración de lactato igual o superior a 5 mmol/L.

- Trasplante fecal

En nuestra microbiota contamos con más de 50 filos de bacterias, de los cuales predominan Bacteroides, Firmicutes, Proteobacteria y Actinobacteria. Se estima un total de  $10^{14}$  bacterias que componen la microbiota humana, un número 10 veces superior al número de células del cuerpo humano (14). Cuando dicho número de bacterias se modifica da lugar a una disbiosis, la cual favorece el riesgo de recurrencia de la ICD.

El trasplante fecal consiste en la reintroducción de la microbiota normal mediante un donante de heces, lo que ha demostrado que inmediatamente se corrige la disbiosis, restaura la riqueza filogenética, reestablece la resistencia a la colonización permitiendo la recuperación de la función normal del colon (14).

El tratamiento está indicado para recurrencias en infecciones por *C. difficile*, con una eficacia superior al 80%. Los casos de infección refractaria o que no responda a un tratamiento de dosis altas de vancomicina o fidaxomicina suelen cumplir el perfil de elección para el trasplante fecal (15)(14).

El balance coste-efectividad del trasplante fecal ha demostrado un ahorro económico, así como un aumento de la eficacia en relación con la vancomicina (15).

- Anticuerpos monoclonales

Se han desarrollado dos anticuerpos monoclonales humanos, el actoxumab y el bezlotoxumab que neutralizan las toxinas A y B respectivamente.

El MODIFY I y MODIFY II son dos ensayos clínicos de doble ciego en fase III, aleatorizados y con control de placebo que se llevaron a cabo en 1655 pacientes adultos que recibían concomitantemente un tratamiento con antibióticos para tratar la CDI. Los pacientes recibieron una infusión de MK-6072 (bezlotoxumab) con una posología de

10 mg/kg, una infusión de MK-6072 (bezlotoxumab) junto con MK-3415 (azlotoxumab) cada uno de los anticuerpos con la misma posología o placebo. La infusión de MK-3415 (azlotoxumab) en monoterapia se administró solamente en MODIFY I tras el cual se suspendió. El objetivo principal del ensayo era ver la eficacia de los anticuerpos monoclonales en una infección recurrente, es decir, un nuevo episodio de infección por *C. difficile* en las 12 semanas posteriores a una primera infección.

En ambos ensayos, el índice de recurrencias de la infección por *C. difficile* fue significativamente menor con bezlotoxumab en monoterapia. La suma de azlotoxumab no demostró un aumento de la eficacia del tratamiento (16) (17).

Actualmente, el anticuerpo monoclonal bezlotoxumab, cuyo nombre comercial es Zinplava está autorizado por la EMA (Agencia Europea del Medicamento) y pendiente de comercialización en España.

## **5.2. Visión general de la genética, expresión y secreción de las toxinas de *C. difficile***

Aunque hay varios factores de virulencia que contribuyen a la adherencia y colonización de *C. difficile*, los síntomas de la infección por este microorganismo están directamente relacionados con la producción de dos exotoxinas: la toxina A (TcdA) y la toxina B (TcdB) (18).

Los genes que codifican para las toxinas A y B están localizados en un *locus* de patogenicidad (PaLoc) que mide 19,6 kB. Este *locus* está formado por 5 genes (tcdA, tcdB, tcdC, tcdE y tcdR) (figura 4). Los genes tcdA y tcdB codifican dos toxinas TcdA y TcdB respectivamente, proteínas de 308 y 270 kDa responsables de la patogenicidad de *C. difficile* (6). Tanto TcdA como TcdB son citotoxinas con actividad glucosiltransferasa, causando la interrupción de las fibras de actina del citoesqueleto que resulta en una disminución de la resistencia transepitelial, la acumulación de líquido y la destrucción del epitelio intestinal (6).

TcdA y TcdB pertenecen a la familia de toxinas LCTs (large clostridial toxins), un grupo homólogo compuesto por proteínas de alto peso molecular que incluyen las toxinas letales y hemorrágicas de *C. sordellii* (TcsL y TcsH respectivamente), la toxina alfa de *C. novyi* (Tcn-alfa) y una citotoxina de *C. perfringens* (TpeL). Las LCTs son glucotransferasas que inactivan específicamente las GTPasas Rho y Ras, lo que conlleva la pérdida de función de las células del huésped. Algunas cepas de *C. difficile*, como las que tiene el ribotipo 027 y 028, producen una tercera toxina denominada C.

*difficile* transferasa (CDT) denominada también toxina binaria (18). La CDT es una ADP-ribosiltransferasa formada por dos subunidades (CDTa y CDTb), que está implicada en una mayor citotoxicidad de la cepa. Los genes que codifican esta toxina se encuentran en el *locus* Cdt (CdtLoc), distinto del PaLoc que ocupa unos 6,2 kB (figura 4). Las cepas que no poseen la toxina binaria contienen una delección de 2 kB en el CdtLoc.

Las proteínas TcdR, TcdC y TcdE son las encargadas de regular la producción y secreción de toxinas. TcdR actúa como regulador positivo de la expresión de *tcdA* y *tcdB*, además de su propia expresión. TcdC actúa como regulador negativo de la expresión de las toxinas. Y, por último, TcdE codifica una holina que se encargará de hacer poros en la membrana citoplasmática permitiendo la liberación de las toxinas (6).

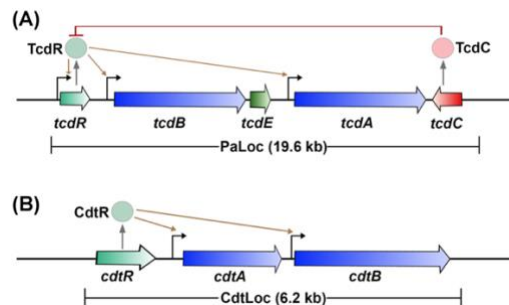


Figura 4. Representación esquemática del PaLoc y CdtLoc

Las cepas no toxigénicas tienen el PaLoc reemplazado por una serie de 75-115 nucleótidos no codificantes o con una secuencia de 7,2 kB de función desconocida.

Cualquier cambio en la región codificante del PaLoc, incluyendo un único polimorfismo en un nucleótido, inserciones o delecciones, se emplean para clasificar las distintas cepas de *C. difficile* (18).

### 5.2.1. Papel de TcdA, TcdB y CDT en CDI

TcdA y TcdB están clasificadas como toxinas AB, donde la subunidad B está involucrada en la llegada de la subunidad enzimática A a su lugar de acción, por lo que TcdA y TcdB actúan sinérgicamente. TcdA daña la integridad epitelial, lo que permite a TcdB entrar.

La subunidad enzimática A de la toxina TcdA y TcdB es un dominio glucosiltransferasa N-terminal (GTD); mientras que la subunidad B está compuesta por tres regiones diferentes (18):

- Un dominio formado por una combinación repetitiva de oligopéptidos (CROP)
- Un dominio de entrega y formación de poros

- Un dominio de autoproseso (APD)

Se ha observado en diversos estudios el comportamiento de cepas virulentas A-B+, concluyendo que TcdB es suficiente para dañar la integridad epitelial y causar toxicidad en el colon. Además, como ya he citado anteriormente, en ensayo clínico de fase III MODIFY II, ha demostrado que el anticuerpo monoclonal que neutraliza la toxina B, bezlotoxumab, puede reducir el índice de recurrencias de la CDI (18).

Resumiendo, los estudios de infección e intoxicación han demostrado que tanto TcdA como TcdB juegan un papel importante en las infecciones, siendo probablemente TcdB más importantes en los aspectos severos de la enfermedad (18).

Sim embargo, las cadenas que producen la toxina binaria CDT pero no TcdA o TcdB, han demostrado, tras haber sido aisladas, que su contribución a la enfermedad es dudosa. Los estudios más recientes *in vitro* e *in vivo* sugieren que la actuación de CDT en solitario no es suficiente para causar la enfermedad por *C. difficile*, sino que actúa junto con TcdA activando el factor de transcripción nuclear NF-kB e induciendo una producción masiva de citoquinas proinflamatorias.

### **5.2.2. Patogenia**

El mecanismo de patogenicidad comienza cuando TcdA y TcdB se unen a los receptores diana de la célula huésped.

Tras la unión al receptor, las toxinas son internalizadas a vesículas unidas a las membranas que luego se fusionan con los endosomas (19). El bajo pH de los endosomas desencadena una serie de cambios conformacionales en las toxinas causando segmentos hidrofóbicos que se van a insertar en la membrana formando poros. Estos poros permiten la traslocación del dominio glucosiltransferasa (GTD) a través de la membrana endosomal al citosol. Los pasos finales de la cascada incluyen una autoescisión que libera el dominio GTD al citosol, donde se glucosila e inactiva pequeñas GTPasas como Rac y Rho, proteínas que juegan un papel crítico en el mantenimiento de la morfología celular y en otros múltiples aspectos de la homeostasis celular (17).

- Receptores celulares y dominios de unión

La estructura CROP situada en el dominio C-terminal del TcdA es homóloga al carbohidrato de la región de unión de las glucosiltransferasas. Por lo que, basándonos en esta homología se propuso que esta región CROP fuera el dominio de unión al receptor de TcdA.



Dos proteínas de superficie han sido implicadas como receptores para el dominio CROP de TcdA: 1) la sucrosa-isomaltasa (SI), una glicoproteína de las células del intestino delgado; y 2) la glicoproteína 96 (gp96), localizada en los colonocitos humanos (19). Sin embargo, hay células que aun no teniendo gp96 o SI son parcialmente sensibles a la intoxicación por TcdA, lo que sugiere una segunda región de unión podría estar presente además del dominio CROP (18).

En TcdB, el papel del dominio CROP como receptor está apoyado por el anticuerpo monoclonal bezlotoxumab, dado que bloquea la unión de la toxina a las células del huésped. Sin embargo, al igual que en la toxina A, se ha demostrado que la unión al receptor no está limitada al dominio CROP, sino que también se han identificado otros como el CSPG4 (chondroitin sulfate proteoglycan), el NECTIN3 y FDZs (receptor frizzled proteins) (18).

- Captación celular

Tras la unión a sus receptores, TcdA y TcdB son endocitados en la célula por distintas vías, probablemente este es el resultado de usar distintos receptores en la unión celular. Ambos usan un mecanismo de entrada dinamina-dependiente. La dinamina es una GTPasa que facilita la escisión y la liberación de las estructuras endocitadas de la membrana plasmática al citosol (18).

- Gracias a Chandrasekaran, el mecanismo de endocitosis de TcdA fue elucidado: es dinamina dependiente pero independiente de clatrina.
- Mientras que la internalización de TcdB fue descrita como dinamina dependiente y mediada por clatrina (19).

- Formación de poros

Una vez que las toxinas han sido internalizadas, requieren un pH bajo para realizar su acción. Este pH se consigue en los endosomas, donde un dominio especializado en la formación de poros y translocación, sufre un cambio conformacional que lleva a la inserción en la membrana de segmentos hidrofóbicos, lo que crea un poro permanente para los iones. Este poro estable es el conducto para que las toxinas lleguen al citosol.

Este proceso es fácilmente inhibido mediante bafilomycin A1 (un agente inhibidor de las ATPasas vacuolares) u otros agentes lisosomales que previenen la acidificación del endosoma. Al inhibir este proceso, bloqueamos la toxicidad de TcdA y TcdB (18)(19).

La estructura del poro y su mecanismo de formación por TcdA y TcdB no han sido determinados todavía, pero sí se sabe que las regiones más hidrofóbicas de TcdA (entre los aminoácidos 958-1130) y TcdB (entre los aminoácidos 956-1128) del dominio de

translocación, de alguna forma están implicados en la inserción en la membrana, la formación del poro y la translocación (19).

- Translocación y autoproteolisis

La toxina TcdB se procesa proteolíticamente en las células del huésped, donde se produce una escisión gracias a un residuo de leucina que concluye con la liberación del dominio GTD N-terminal al citosol mediante translocación. El inductor de esta escisión autocatalítica es el inositol hexaquifosfato (InsP<sub>6</sub>), una molécula de alta carga abundante en las células de mamífero.

TcdA y TcdB comparten el mismo mecanismo inducido por InsP<sub>6</sub>, pero la escisión no es equivalente entre ambas toxinas. TcdB es más sensible que TcdA a la inducción de la escisión por InsP<sub>6</sub>. Diversos estudios indican que el proceso de autoescisión en TcdA está reprimido debido a interacción entre el dominio CROP y el N-terminal (18).

- Glucosilación y sustrato

Como ya he nombrado antes, la subunidad enzimática A de la toxina TcdA y TcdB es un dominio glucosiltransferasa N-terminal (GTD), el cual inactiva GTPasas de la familia Rho. Las GTPasas son interruptores moleculares que cambian su estado de activo (GTP) a inactivo (GDP) (18). En su forma activa, las proteínas Rho de la familia de GTPasas pueden interaccionar con muchas moléculas como kinasas, fosfatasas, lipasas, etc. Lo que les confiere la acción de regular muchas funciones celulares, incluyendo el ensamblado y organización del citoesqueleto de actina, además de que son un componente importante en el mantenimiento de la morfología y polaridad celular.

Consecuentemente, la inactivación mediante glucosilación de las GTPasas por las toxinas TcdA y TcdB resulta en la pérdida de la estructura citoesquelética, la inhibición del intercambio de nucleótidos por los GEFs, la estimulación de la actividad de las GTPasas, la unión de los GDI y la interacción con las proteínas efectoras. Todos estos efectos derivados de la glucosilación impiden la señalización de las GTPasas y han sido relacionadas con los efectos citopáticos y citotóxicos que se observan en estas toxinas.

La inactivación de las GTPasas también afecta al ciclo celular dado que la intoxicación por TcdA y TcdB está asociada con una reducción de la expresión de la ciclina D1, requerida para la progresión de la fase G1 a la G1-S del ciclo.

Por último, la inactivación de la proteína RhoA inhibe la formación del anillo contráctil y con ello la citoquinesis, lo que conduce a la formación de células binucleadas.

Además de los efectos citopáticos y de la inactivación de Rho por TcdA y TcdB, estas pueden promover la muerte de las células epiteliales, es decir, también tienen un efecto citotóxico (18).

### 5.2.3. Efectos celulares causados por TcdA y TcdB

TcdA y TcdB interrumpen las uniones estrechas epiteliales e inducen la muerte de las células epiteliales, causando así una lesión directa del epitelio colónico (figura 5). Además, las toxinas estimulan las células epiteliales colónicas para liberar mediadores proinflamatorios como citoquinas, lo que lleva a una respuesta aguda innata inflamatoria incluyendo un reclutamiento de neutrófilos, una característica clave de la patología de la CDI.

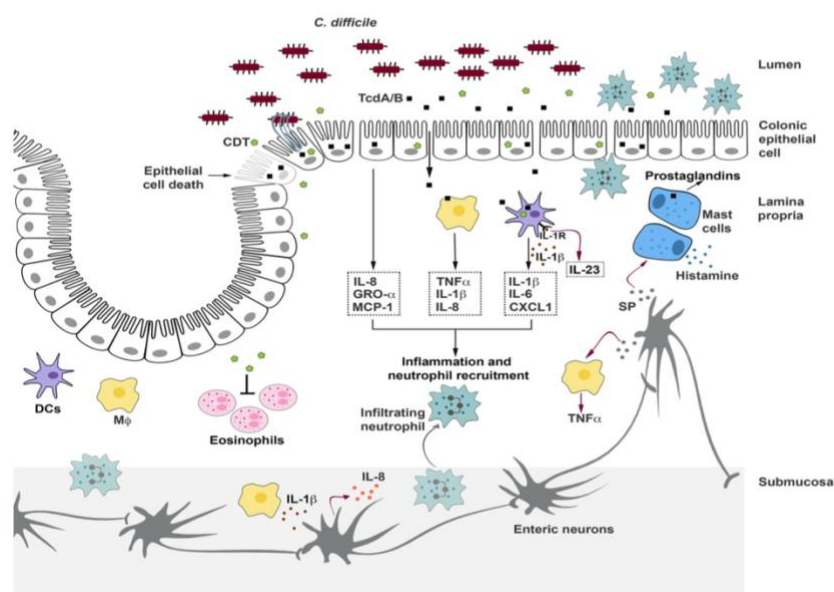


Figura 5. Mecanismo de acción de TcdA y TcdB

Una barrera desgastada junto con una inflamación activa lleva a un aumento de la permeabilidad intestinal y vascular, promoviendo probablemente la secreción de fluidos. La pérdida de la barrera permite la entrada de toxinas y/o bacterias al lumen intestinal, lo que contribuirá a la inflamación.

Una exposición prolongada del sistema inmune innato contra los mediadores proinflamatorios van a amplificar el daño tisular pudiendo comprometer el estado del individuo y conducir a estados severos de la enfermedad (18).

Se piensa que el daño de la barrera epitelial, la respuesta inflamatoria intensa con infiltración de neutrófilos en la luz intestinal y el daño tisular contribuyen a la formación de pseudomembranas, las cuales se observan en los casos severos de infección por *C. difficile*.

## 6. CONCLUSIONES

- Ha habido un importante aumento de la incidencia de ICD infecciones en las últimas décadas, lo que constituye un grave problema médico en pacientes hospitalizados.
- Los síntomas de la infección por *C. difficile* están directamente relacionados con la síntesis de las exotoxinas TcdA y TcdB; y en algunas cepas hipervirulentas también con la CDT.
- La sucrosa-isomaltasa y la pg60 de la superficie de las células epiteliales del colón actúan como receptores para el dominio CROP de TcdA. Mientras que en TcdB, el papel del dominio CROP como receptor está apoyado bezlotoxumab.
- TcdA y TcdB son endocitadas por un mecanismo dinamina-dependiente y el pH ácido del endosoma posibilita la formación de poros y escisión de las toxinas.
- La escisión de TcdA y TcdB está inducida por InsP<sub>6</sub>, siendo liberadas al citosol por translocación.
- La subunidad enzimática A de la toxina TcdA y TcdB tienen actividad glucosiltransferasa afectando a la señalización, al citoesqueleto de actina y a la citoquinas.
- Los efectos citopáticos producidos por las toxinas generan una respuesta inflamatoria en el colon que contribuyen al daño tisular y a los síntomas de la enfermedad.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Ramachandran G. Gram-positive and gram-negative bacterial toxins in sepsis: a brief review. *Virulence*. 2014;5(1):213–8.
2. Tortora G, Funke BR, Case CL. Introducción a la microbiología. Médica Panamericana; 2007 [cited 2017 Dec 26].
3. Santolaya de P ME. Superantígenos y su rol en enfermedades infecciosas. *Rev Med Chil*. 1998 Jul [cited 2018 Jan 11];126(7):846–54.
4. Ingraham JL, Ingraham CA, Prentiss H, Nieto JJ, Quesada E, Ventosa A. Introducción a la microbiología. Reverté; 1998 [cited 2017 Dec 26].
5. Borrás-Pallé SS de MIHUDPV. Infecciones adquiridas en el nosocomio y/o relacionadas con la asistencia sanitaria. Uno de los grandes retos de seguridad.
6. Rodríguez-pardo D, Mirelis B, Navarro F. Infecciones producidas por *Clostridium difficile*. *Med Clin (Barc)*. 2013;31(4):254–63.
7. Martin JSH, Monaghan TM, Wilcox MH. *Clostridium difficile* infection:

- Epidemiology, diagnosis and understanding transmission. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2016;13(4):206–16.
8. Marjin P, Bauer; Jaap T, van Diessel and Ed J, Kuijper. Department of Medical Microbiology and Centre for Infectious Diseases LUMC. *Clostridium difficile* : controversies and approaches to management Martijn P. 2009;
  9. Ribas AM, Mansilla EC. Diagnóstico microbiológico de la infección por.
  10. Microbiology C. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases : Update of the Treatment Guidance Document for *Clostridium difficile* *Clinical Microbiology and Infection*. 2014;20(March).
  11. Evaluaci ADE, Tecnolog DE, Andaluc ASSDE. Fidaxomicina en el tratamiento de la infección por *Clostridium difficile*. 2013.
  12. Guery B, Menichetti F, Goldenberg S, Bisnauthsing K, Garcia MA, Anttila V, et al. Abstract EP0363: Randomized, controlled, open-label study comparing the efficacy of extended-pulsed fidaxomicin (EPPX) with vancomycin therapy for sustained clinical cure of *Clostridium difficile* infection in an older population : the EXTEND study. 27th ECCMID. 2017;(April):6–7.
  13. Burton HE, Mitchell SA, Watt M. A Systematic Literature Review of Economic Evaluations of Antibiotic Treatments for *Clostridium difficile* Infection. *Pharmacoeconomics*. 2017;35(11):1123–40.
  14. Brandt LJ. Fecal Microbiota Therapy With a Focus on *Clostridium difficile* Infection. *Psychosom Med*. 2017;79(8):868–73.
  15. Kelly BJ, Tebas P. Clinical practice and infrastructure review of fecal microbiota transplantation for *Clostridium difficile* infection. *Chest*. 2017;(October):1–12.
  16. Wilcox MH, Gerding DN, Poxton IR, Kelly C, Nathan R, Birch T, et al. Bezlotoxumab for Prevention of Recurrent *Clostridium difficile* Infection. *N Engl J Med*. 2017;376(4):305–17.
  17. Orth P, Xiao L, Hernandez LD, Reichert P, Sheth PR, Beaumont M, et al. Mechanism of action and epitopes of *Clostridium difficile* toxin B-neutralizing antibody bezlotoxumab revealed by X-ray crystallography. *J Biol Chem*. 2014;289(26):18008–21.
  18. Chandrasekaran R, Lacy DB. The role of toxins in *Clostridium difficile* infection. *FEMS Microbiol Rev*. 2017;41(6):723–50.
  19. Orrell KE, Zhang Z, Sugiman-marangos SN, Roman A. *Clostridium difficile* toxins A and B : Receptors , pores , and translocation into cells. 2017;9238(October).