

## **Los principales factores de virulencia de *Clostridium difficile* y el papel de este microorganismo en la colitis pseudomembranosa**

Raúl Garza-Velasco<sup>1</sup>, Angélica Vega-García<sup>1</sup> y Luis Manuel Perea-Mejía<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Química, UNAM

<sup>2</sup>Facultad de Medicina, UNAM

### **RESUMEN**

*Clostridium difficile* integra la flora intestinal de numerosos individuos sanos, pero su papel como simbiote o comensal se puede tornar en antagónico cuando la persona implicada es sometida a terapias prolongadas con antimicrobianos de amplio espectro, tales como clindamicina, ampicilina y cefalosporinas.

Bajo estas condiciones, desaparecen los integrantes de la flora intestinal susceptibles al antibiótico administrado, permitiendo que *C. difficile* crezca en mayores proporciones, hasta alcanzar cantidades suficientes para elaborar potentes exotoxinas que lesionan la mucosa colónica, originando la formación de una clásica pseudomembrana y ulceraciones hemorrágicas que impiden la función entérica.

Lógicamente, este tipo de padecimientos predomina entre los pacientes hospitalizados, aunque también llega a afectar a la población en general. No obstante, quizá lo más trascendente del tema consista en considerar que la colitis pseudomembranosa representa una enfermedad asociada estrechamente al uso excesivo de los antibióticos.

**Palabras clave:** *Clostridium difficile*, colitis pseudomembranosa, antibióticos de amplio espectro, toxinas A y B.

**The main virulence factors of *Clostridium difficile* and the role of this microorganism in the pseudomembranous colitis**

**Abstract**

*Clostridium difficile* colonizes the gut of a diversity of healthy individuals but its role as beneficent or inoffensive microorganism can change drastically to antagonist when the person is submitted to a long therapy with broad spectrum antibiotics such as clindamycin, ampicillin and cephalosporins.

Under these conditions, the susceptible members of the intestinal flora disappear and allow *C. difficile* to overgrow producing two dangerous exotoxins that damage the colonic mucosa resulting in the formation of the classic pseudomembrane and bleeding ulcers.

These kinds of diseases are more prevalent in hospitalized patients especially elderly and immunocompromised people, but they also affects to the community. However it is more important to emphasize that pseudomembranous colitis and other *Clostridium difficile*-associated illness represent serious pathologies related to the overuse of antibiotics.

**Keywords:** *Clostridium difficile*, pseudomembranous colitis, broad spectrum antibiotics, toxins A and B.

## **Los principales factores de virulencia de *Clostridium difficile* y el papel de este microorganismo en la colitis pseudomembranosa**

Raúl Garza-Velasco<sup>1</sup>, Angélica Vega-García<sup>1</sup> y Luis Manuel Perea-Mejía<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Química, UNAM

<sup>2</sup>Facultad de Medicina, UNAM

### **INTRODUCCIÓN**

Actualmente, médicos, químicos, investigadores y otros profesionales de la salud se enfrentan a nuevas enfermedades infecciosas, pero también al resurgimiento de algunas otras, en ambos casos como consecuencia de los cambios y la evolución que han experimentado los agentes etiológicos para poder sobrevivir, superando las defensas constitutivas y adaptativas que protegen al ser humano. Ahora se contienda con los virus de la inmunodeficiencia humana, el síndrome respiratorio agudo grave y la influenza A H1N1, aunque también se ha incrementado notablemente la frecuencia con la que se combaten las patologías causadas por *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Clostridium difficile*.

En las décadas recientes, esta última especie ha vuelto a atraer la atención de médicos, químicos e investigadores, debido al notable aumento de la frecuencia y gravedad de las afecciones que provoca dentro del ambiente nosocomial, destacando entre ellas la colitis pseudomembranosa (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7).

Si bien a *C. difficile* se le detecta en una considerable cantidad de adultos sanos, las cifras que se manejan se elevan hasta en un 40% cuando se habla de

individuos hospitalizados sometidos a tratamientos con antimicrobianos, implicando a numerosas formas bacilares que se reproducen eficazmente liberando toxinas de acción entérica (5, 6, 7).

En 1935, Hall y O'Toole publicaron sobre el aislamiento del microorganismo a partir de heces de niños recién nacidos, estableciendo que podría tratarse de un constituyente común de la flora intestinal. En 1937, Snyder reportó el hallazgo de 17 cepas que manifestaban muchas de las características observadas por Hall y O'Toole, incluyendo la producción de una toxina letal para conejos y cobayos. En 1940, el propio Snyder detectó la presencia de *C. difficile* en heces de niños asintomáticos cuyas edades fluctuaban entre diez semanas y un año.

En la década de los 60s, se le aisló de pacientes con colitis pseudomembranosa asociada al tratamiento con antibióticos de amplio espectro, pero en esa época se pensaba que dicho padecimiento era producto de la isquemia en la mucosa intestinal o de infecciones virales. No obstante, en 1977 Larson y cols se percataron de que las muestras de heces de pacientes afectados contenían una toxina que provocaba cambios citopáticos en los cultivos de células y originaba cuadros de enterocolitis en hámsters (8, 9, 10).

En 1978 por fin se reconoció a *Clostridium difficile* como agente causal de la mencionada enfermedad y, en la actualidad, se considera que este patógeno es responsable de prácticamente todos los casos de colitis pseudomembranosa y de por lo menos el 20 % de los episodios de diarrea asociada al consumo de antibióticos (1, 11, 12, 13, 14, 15).

El presente trabajo señala los más relevantes factores de virulencia de *Clostridium difficile*, así como las principales características de la colitis pseudomembranosa y las medidas terapéuticas relacionadas con su adecuado tratamiento.

## **PRINCIPALES FACTORES DE VIRULENCIA DE *C. perfringens***

### **Toxinas**

Los más relevantes factores de virulencia de *Clostridium difficile* corresponden a dos potentes exotoxinas: la toxina A (TcdA, del inglés *Toxin Clostridium difficile A*), una enterotoxina de 308 Kilodaltones (kDa) y, la toxina B (TcdB), citotoxina de 270 KDa. Diversos estudios han demostrado que la TcdB es cerca de mil veces más potente que la TcdA (como citotoxina) en cultivos de tejido, pero no actúa como enterotoxina en animales (9, 16, 17).

Adicionalmente, se ha logrado caracterizar una tercera toxina, denominada toxina binaria (CDT, del inglés *Clostridium difficile binary Toxin*), pero su impacto en la enfermedad aún no se ha logrado aclarar con certeza (8).

En relación con los genes que codifican para la TcdA y TcdB (*tcdA* y *tcdB*, respectivamente), aquellos se encuentran localizados en un segmento de ADN denominado *locus* de patogenicidad (9, 17).

*Toxinotipos de Clostridium difficile.* Numerosas investigaciones sobre la TcdA y TcdB se han basado en la cepa de referencia VPI 10463, lo que ha dado lugar al

hallazgo de modificaciones genéticas de ambas toxinas en aislamientos clínicos. Las señales ambientales que modulan la expresión de las toxinas aún no se han esclarecido, si bien los estudios *in vitro* indican que su producción puede aumentar bajo condiciones de estrés (como en presencia de antibióticos) y al ocurrir represión catabólica (10, 18).

En el primer caso, algunos trabajos se enfocaron al estudio de la influencia que podrían ejercer diversos agentes antimicrobianos sobre la síntesis de toxinas, encontrándose que niveles subinhibitorios de penicilina y vancomicina aumentaban la concentración de las moléculas tóxicas implicadas. En el segundo, se utilizaron medios definidos con cantidades limitadas de biotina (0.05 nM), observándose un incremento de hasta 64 veces en la producción de la TcdB y de 34 veces en la de TcdA (18).

Por otra parte y, en contraste con estas observaciones, Karlsson encontró que una mezcla de nueve aminoácidos (cisteína, glicina, isoleucina, leucina, metionina, prolina, treonina, triptofano y valina) disminuía la producción de toxinas *in vitro*, y que los propios derivados de los mismos aminoácidos daban lugar a un efecto similar. De hecho, el autor generó una propuesta en el sentido de que la administración de tales aminoácidos al colon humano podría representar parte de una nueva terapia para la diarrea asociada a *Clostridium difficile* (12).

*Mecanismo de acción de las toxinas.* La unión al receptor significa el primer paso “clave” en el proceso de entrada de las toxinas a sus células “blanco”. En el caso de la TcdA, dicho receptor es el disacárido Gal $\beta$ 1-4GlcNAc, el cual forma parte de

los antígenos del grupo sanguíneo Lewis I, X y Y. Otros reportes señalan que la TcdA también reconoce al azúcar  $\text{Gal}\alpha 1\text{-3Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}$ , lo cual parece ser intrascendente, debido a que este compuesto no está presente en células humanas sino en las de varias especies animales (2, 8).

Una vez que las toxinas han reconocido a su receptor, inician su proceso de entrada a la célula “blanco”, lo cual ocurre mediante endocitosis; es decir, tiene lugar la invaginación de la membrana citoplasmática hasta formar un endosoma, que posteriormente se fusiona con lisosomas para tratar de digerir el contenido del primero. Sin embargo, durante tal evento las toxinas suelen escapar del endosoma, debido a que el pH ácido de este compartimiento promueve cambios estructurales en ellas, permitiendo su salida hacia el citosol.

Después de su internalización en el citoplasma, la TcdA y la TcdB interactúan con sus “blancos” específicos: el grupo de las GTPasas Rho, Rac y Cdc42, enzimas a las que inactivan, vía la glucosilación de la treonina 37 de Rho y de la treonina 35 de Rac y de Cdc42 (19).

Es importante tomar en cuenta que las proteínas de la familia Rho representan un regulador primario del citoesqueleto de actina en las células eucariontes y que, con base en ello, desempeñan un papel crucial en la morfogénesis, el control del ciclo celular, la regulación de la transcripción y la apoptosis. La RhoA media la creación de las fibras de estrés, la motilidad y las adhesiones focales, mientras que Rac y Cdc42 están relacionadas con la formación de extensiones estructurales esenciales para el movimiento y la adaptación al ambiente durante la migración

celular. En tal contexto, la afectación de estas proteínas provoca la condensación de actina y, consecuentemente, el redondeo de las células “blanco”, daños a nivel de membrana y la muerte celular vía apoptosis, lo que de alguna manera explica la consistente evolución de la enfermedad implicando notables efectos citopáticos que derivan en la necrosis del tejido afectado (19).

En la colitis pseudomembranosa, una de las alteraciones atribuidas a las dos toxinas involucradas consiste en la ruptura de las sólidas uniones intercelulares del tejido intestinal, misma que termina con la integridad del epitelio entérico y abre una vía para el paso de los neutrófilos hacia el lumen del intestino y, por ende, para la propia formación de las características pseudomembranas sobre el epitelio (3).

En este sentido, los leucocitos polimorfonucleares (PMNs) incrementan drásticamente la producción de especies reactivas de oxígeno y la secreción de monofosfato de adenosina (AMP). La importancia de este último compuesto reside en el hecho de que es convertido en adenosina (por una 5'-ectonucleotidasa) en el lado apical de las células epiteliales, lo cual inhibe la secreción de cloruros hacia el lumen intestinal (8, 10, 19).

La TcdA ejerce interesantes efectos sobre los macrófagos, monocitos y mastocitos, originando que liberen las citocinas proinflamatorias IL-1, IL-6, IL-8 y TNF- $\alpha$ . De esa manera, la IL-1 y el TNF- $\alpha$  estimulan la biosíntesis de prostaglandinas (PGs), vía la activación de la fosfolipasa A<sub>2</sub> y de la ciclooxigenasa 2, respectivamente, y ello incrementa la secreción de agua y electrolitos hacia el lumen del intestino. De hecho, se ha comprobado que muchos de los efectos inflamatorios y secretorios



disminuyen con la administración de inhibidores del factor activador de plaquetas, de la fosfolipasa A<sub>2</sub> y de la síntesis de PGs (19).

Adicionalmente, se ha relacionado a la TcdA con las neuronas de la submucosa: Mantyh y cols encontraron que un antagonista de la sustancia P atenúa la respuesta intestinal en ratas tratadas con la toxina. La sustancia P corresponde a un pequeño péptido que se encuentra en el tejido intestinal y en el sistema nervioso central; actúa como neurotransmisor y se le ha asociado a la diarrea inflamatoria. El mecanismo mediante el cual la TcdA modula la producción de dicho péptido aún se desconoce, pero se ha demostrado que al tratar con toxina el ileon de ratas se incrementa su producción y ello conduce a la activación de los mastocitos. Los efectos de la TcdA que contribuyen a la generación de la colitis pseudomembranosa se pueden resumir de la siguiente manera (2, 3, 18):

- Aumento de la permeabilidad epitelial
- Infiltración de neutrófilos
- Producción de intermediarios reactivos de oxígeno
- Daño directo a la mucosa intestinal
- Liberación de sustancia P
- Activación de mastocitos, macrófagos y monocitos
- Producción de citocinas y quimiocinas
- Activación de las neuronas situadas en la submucosa

Diversos estudios habían sugerido que la TcdB no causaba daño en el intestino a menos que la TcdA estuviera presente, e inclusive, se consideraba que ambas

toxinas actuaban de manera sinérgica. Sin embargo, recientemente se ha venido incrementando el número de reportes sobre aislamientos clínicos de cepas virulentas de *Clostridium difficile* TcdA negativas (TcdA<sup>-</sup>) pero TcdB positivas. Tal es el caso de los toxinotipos VIII, X, XVI y XXII, en los cuales se observa que el gen que codifica para la TcdA presenta una delección vecina al C-terminal, que da lugar a la producción de una proteína incompleta incapaz de causar daño (9, 16, 17, 18).

Se ha propuesto una posible hipótesis para tratar de explicar la existencia de estas cepas, la cual infiere que la TcdB puede tener un papel aún más importante en la enfermedad que el que se le reconocía previamente, o bien, sustituye o compensa la ausencia de la TcdA. Esta afirmación aparece en reportes cuyos autores detectaron que la TcdB podría tener potencial como enterotoxina (9, 16, 17).

*Inmunidad frente a la TcdA y la TcdB.* La primera línea de defensa contra la infección ocasionada por *Clostridium difficile* reside en la presencia de la flora habitual del intestino, la cual limita el crecimiento de este patógeno tanto *in vivo* como *in vitro*. Un segundo factor de protección para el hospedero consiste en la acidez gástrica, que podría reducir el número de esporas viables e inactivaría a las toxinas ingeridas. A las barreras anteriores se suma el peristaltismo normal del intestino, ya que los movimientos expulsan del tracto digestivo a una buena parte de las células bacterianas y a sus toxinas.

A pesar de la importante participación de estos mecanismos defensivos, la respuesta inmune humoral suele considerarse como el factor decisivo para

restringir la duración y severidad de la enfermedad. Así lo demuestran los trabajos de Kyne, quien observó que sólo el 50% de los pacientes colonizados desarrolla la patología y que, además, el análisis del suero de los enfermos evidencia niveles séricos de anticuerpos IgG e IgM contra la toxina A, hasta tres veces más altos en los individuos que presentan diarrea que en los asintomáticos. Adicionalmente, Kelly y cols reportaron que los anticuerpos IgA de la mucosa intestinal inhiben la unión de la TcdA a su receptor. Si bien estos hallazgos solamente se refieren a los anticuerpos contra dicha toxina, no se descarta algún fenómeno similar asociado a la TcdB (8, 18).

Finalmente, la inmunización representa otro mecanismo que requiere ser estudiado a mayor profundidad. Ciertamente, durante la década de los 80s se logró observar que la inoculación de pequeñas dosis de TcdA en hámsters hembras protegía a las crías de éstas; sin embargo, es claro que la importancia del tema merece la realización de experimentos que conduzcan a la valoración de la eventual inmunización en humanos.

*Otras toxinas producidas por Clostridium difficile.* Además de la TcdA y la TcdB, algunas cepas de *Clostridium difficile* producen una tercera toxina, denominada CDT, por *Clostridium difficile binary toxin*. La frecuencia de las cepas que la sintetizan fluctúa entre 8.3 y 23.5%, habiéndose detectado la toxina en heces de humanos y de algunos equinos y caninos. Genéticamente, la CDT está conformada por un dominio enzimático de 48 kDa (CDTa, por *Clostridium difficile binary toxin a*), la cual funciona como una ADP-ribosiltransferasa y, además, por un dominio de

unión de 99 kDa (CDTb), que promueve la entrada de la CDTa a la célula hospedera (8, 19).

Barbut y cols reportaron que las cepas CDT positivas causan síntomas más severos que las no productoras de esa toxina, si bien ello no coincide con lo establecido por otros autores, quienes concluyen que el espectro de la enfermedad es el mismo para ambos tipos de cepas. Por lo tanto, se puede afirmar que mientras el papel de la TcdA y la TcdB ya se ha reconocido como esencial en la afección, la eventual contribución de la CDT aún no se ha comprobado ni aceptado por la mayoría de los expertos.

### **Adhesinas**

Para numerosos patógenos que ocasionan toxi-infecciones, la expresión de la virulencia suele depender de la producción de adhesinas y toxinas. Mientras las primeras propician que los microorganismos puedan adherirse a las células del hospedero, las toxinas son secretadas al medio extracelular para que actúen sobre el tejido “blanco”. *Clostridium difficile* lesiona los tejidos basándose predominantemente en la acción de TcdA y TcdB, si bien su posibilidad de colonizar previamente el intestino depende de proteínas que presentan propiedades adhesivas, entre las cuales destacan las siguientes (2, 3, 10):

*Flagelos y diversas moléculas situadas en la superficie bacteriana. Clostridium difficile* debe su movilidad a flagelos peritricos que son el producto de dos genes: *fliC* y *fliD*. El primero da lugar a una proteína de 39 kDa, denominada flagelina, que corresponde al mayor componente estructural del flagelo y, el segundo, origina una

molécula proteica de 56 kDa, la proteína Cap, requerida para el anclaje del flagelo a la membrana bacteriana. Aunque se ha comprobado que tanto las cepas flageladas como las no flageladas contienen ambos genes, aún se desconoce porqué sólo parte de ellas presentan dichos organelos (20).

Tasteyre y cols realizaron algunos experimentos *in vitro* en los cuales compararon la adherencia de la bacteria al tejido intestinal murino y porcino, observando que la unión sólo ocurría al tejido de ratón, debido probablemente a que éste presentaba un receptor para el flagelo (20).

Por otra parte, recientemente se han estudiado algunas proteínas superficiales de *Clostridium difficile* que también podrían contribuir a la colonización tisular, destacando los trabajos de Waligora y cols. Ellos detectaron que la Cwp66 (por *clostridial wall protein*), de 66 kDa, mostraba propiedades como adhesina (21).

Hennequin localizó a la Fbp68 (por *fibronectin-binding protein*), de 68 kDa, que posibilita la unión bacteriana a fibronectina, una importante glicoproteína que se encuentra en los fluidos corporales y en la matriz extracelular de los vertebrados; su función sería la de adherir el bacilo a la matrix extracelular, fibrinógeno, colágeno y vitronectina (22).

Por otro lado, se detectó otro grupo de proteínas que forman parte de la capa S de *Clostridium difficile*, una estructura asociada a la superficie bacteriana de numerosos géneros, la cual está formada por dos grupos: uno de 36 kDa, denominado proteínas de bajo peso molecular de la capa S y, el restante, de 45

kDa, conocido como proteínas de alto peso molecular de la capa S. La bacteria se une *in vitro* a las células HEp-2 (células de carcinoma laríngeo humano) vía la capa S, e *in vivo* se ha demostrado el mismo patrón en ratones, lo que ha sugerido que podría tratarse de una adhesina relevante (4).

Es importante tomar en cuenta que el suero de los pacientes con colitis pseudomembranosa presenta anticuerpos contra algunas adhesinas, tales como la FliC y la FliD. Con base en esta observación, O'Brien y cols probaron los efectos de la inmunización pasiva en hámsters, inoculándoles anticuerpos anti-proteínas de la superficie bacteriana, observando que el progreso de la infección disminuye, dado que se inhibe la unión del patógeno al tejido intestinal y se incrementa la fagocitosis. Este hallazgo ha evidenciado que el desarrollo de vacunas podría proteger al humano de la colitis pseudomembranosa (20).

### **Enzimas hidrolíticas**

Steffen, Seddon y Fedorko observaron la producción de hialuronidasa, condroitina-4-sulfatasa, gelatinasa, colagenasa y L-prolina-aminopeptidasa, por parte del microorganismo. La hialuronidasa es utilizada por el bacilo para hidrolizar el ácido hialurónico que funge como matriz extracelular en diversos órganos, produciendo N-acetilglucosamina, molécula necesaria en el metabolismo del bacilo. En conjunto, este grupo de enzimas aumenta la disponibilidad de nutrientes en el intestino y, por ende, promueve el crecimiento de la bacteria en los tejidos del hospedero (3, 10).

### **Cápsula**

Los trabajos de Davies y Borriello con 9 cepas toxigénicas y 6 no toxigénicas revelaron la presencia de una cápsula compacta o difusa en diversas clonas. Un año más tarde, Baldassarri reportó que dicha cápsula medía 30 a 80 nm en algunos aislados de pacientes con colitis pseudomembranosa y 10 a 20 nm en los provenientes de niños asintomáticos. Hasta el momento, los estudios sugieren que este factor de virulencia tiene solo actividad antifagocitaria y no propiedades adhesivas (10).

## **PATOLOGÍA**

### **Factores de riesgo**

Desde los 60s, la administración de antibióticos de amplio espectro está considerada como el más significativo y frecuente factor de riesgo para la aparición de la enfermedad asociada a *Clostridium difficile*. La razón principal de esta afirmación reside en el hecho de que una de las principales defensas contra la colonización del tejido gastrointestinal radica en el mantenimiento del ecosistema entérico; así, cuando algún invasor oportunista alcanza esos tejidos, su crecimiento se verá limitado o nulificado, merced a los componentes de la flora habitual, fenómeno al cual se conoce como “resistencia a la colonización”.

Sin embargo, es claro que la administración de antibióticos de amplio espectro puede destruir el mencionado equilibrio y permitir al patógeno incrementar su crecimiento en los tejidos intestinales, ante la abrupta desaparición de los simbiontes sensibles al antimicrobiano en turno. Los antibióticos más comúnmente implicados en este proceso, son: clindamicina y cefalosporinas (de alto riesgo);

ampicilina, amoxicilina, clotrimazol, macrólidos y tetraciclinas (de riesgo moderado); y aminoglucósidos, metronidazol, quinolonas y rifampicina (de bajo riesgo) (1, 4, 7, 12, 13).

En 1970, surgió un mayor interés por la colitis pseudomembranosa, después de la publicación de un estudio que reportó a 200 pacientes que habían sido tratados con clindamicina; el 21% había desarrollado diarrea y el 10% colitis pseudomembranosa; una reunión originada por el fenómeno dio lugar al término “colitis asociada a clindamicina” (6, 13, 15).

Prácticamente al mismo tiempo, se observó que el antimicrobiano también inducía cecitis letal en hámsters y que los filtrados de heces de estos animales contenían una toxina capaz de manifestar citotoxicidad en cultivos de células. Actualmente, el antibiótico es prescrito raramente, lo que ha disminuido su incidencia en los casos de colitis (12).

Por su parte, las cefalosporinas también están consideradas como un importante factor de riesgo para adquirir diarrea asociada a *Clostridium difficile*, en especial las denominadas de tercera generación, tales como la ceftazidima y la ceftriaxona. De hecho, son más potentes que otros antibióticos de amplio espectro, incluidas la gentamicina y las penicilinas, por lo que numerosos autores proponen su uso racional para evitar casos de colitis pseudomembranosa.

Es importante señalar que los grupos más afectados por *Clostridium difficile* son los conformados por pacientes hospitalizados y, en especial, por quienes sufren de



deterioro inmunológico, tales como los ancianos mayores que han recibido terapia de antibióticos; cabe agregar que la probabilidad de adquirir al patógeno se incrementa con el tiempo de hospitalización (5, 11, 13).

Otro grupo vulnerable está constituido por 10 a 15% de los niños recién nacidos e infantes de hasta 2 años, en quienes se llegan a encontrar toxinas en niveles similares a las de los adultos con colitis severa. Sin embargo, es preciso subrayar que algunos no desarrollan síntomas aparentes, al parecer debido a que, en etapas tempranas de la vida, el receptor para la toxina A aún no se ha desarrollado en cantidades importantes (11).

Otros factores predisponentes, aunque por fortuna de baja incidencia, consisten en las cirugías gastrointestinales, la presencia de sondas de succión nasogástrica, el manejo odontológico con antibióticos de amplio espectro, las enfermedades crónicas graves, sobre todo las renales, hepáticas y causantes de inmunodepresión, los procedimientos gastrointestinales invasivos repetidos (endoscopías), el uso de agentes antiulcerosos, la quimioterapia, la estancia en unidades de terapia intensiva, la alimentación por sonda pospilórica, la infección cruzada con las manos del personal médico y la contaminación de superficies y objetos tales como los termómetros electrónicos rectales. Finalmente, es oportuno mencionar que, en años recientes, *Clostridium difficile* ha surgido como una de las causas de diarrea crónica en los pacientes con SIDA (6).

### **Signos y síntomas de la enfermedad**

Sin lugar a dudas, se debe sospechar de la enfermedad asociada a *Clostridium difficile* en todo paciente que presente diarrea a partir del tercer día de hospitalización y por más de dos días consecutivos, sin alguna causa que la explique y, en especial, cuando se trate de casos con antecedente de uso de antibióticos en los meses previos (2, 11, 13).

El espectro clínico correspondiente es amplio y comprende, en orden de gravedad, al estado de portador asintomático, a la diarrea simple o asociada a colitis, a la colitis pseudomembranosa y a la colitis fulminante (con o sin megacolon tóxico) (1, 11).

Los signos y síntomas aparecen generalmente en forma abrupta durante el tratamiento antibiótico (aunque en el 20% de los enfermos aparecen dentro de los sesenta días posteriores), y consisten en diarrea acuosa, fiebre moderada, dolor abdominal, náuseas, anorexia, distensión abdominal, deshidratación y compromiso del estado general. Dichas manifestaciones adquieren una mayor intensidad y frecuencia a medida que la patología evoluciona, desde una diarrea simple hasta las formas más graves. La quinta parte de los casos graves pueden presentarse sin diarrea, con abdomen agudo e íleo, signos sépticos y falla orgánica múltiple, especialmente en pacientes que también padecen de otro tipo de afecciones (7, 14).

Histológicamente, se observa una alteración difusa de la mucosa colónica, la cual adquiere un color rojo intenso, con erosiones superficiales y parcialmente cubiertas por placas blanco-amarillentas de aproximadamente 2 a 10 mm de espesor; éstas

corresponden a las características pseudomembranas que dan origen al nombre del padecimiento. Microscópicamente, se observan tres tipos de lesiones, de acuerdo con la severidad del cuadro (6, 11):

Lesión tipo I o temprana. Se caracteriza por necrosis epitelial en forma de parches, acompañada por exudados de fibrina y con neutrófilos en la luz del colon.

Lesión tipo II. Es más exudativa y prominente, por lo que es conocida como lesión tipo volcán, ya que aparece como una ulceración epitelial, en tanto que la mucosa circundante permanece intacta.

Lesión tipo III. Se caracteriza por necrosis epitelial difusa y una ulceración recubierta por una pseudomembrana compuesta por mucina, fibrina, leucocitos y desechos celulares.

En las pruebas de laboratorio, son frecuentes la leucocitosis, hipoalbuminemia y alteraciones hidroelectrolíticas. Cuando la infección se resuelve, la mucosa regresa a la normalidad, aunque puede persistir alguna irregularidad glandular residual.

## **Tratamiento**

El primer paso para llevar a cabo el tratamiento de la diarrea asociada a *Clostridium difficile* consiste en suspender la administración del antibiótico de amplio espectro que desencadenó el cuadro; el 15 a 25% de los pacientes mejora con esta sola medida. La segunda estrategia reside en la restitución del equilibrio hidroelectrolítico y evitar el uso de antiperistálticos (como loperamida y

difenoxilato), ya que éstos aumentan el tiempo de permanencia de las toxinas en el intestino (12).

Adicionalmente, los agentes orales usados como primera línea terapéutica incluyen al metronidazol, en dosis de 250 a 500 mg, 4 veces al día durante 7 a 14 días o, desde luego, a la vancomicina (125 a 500 mg), 4 veces al día por 5 a 14 días. De esta manera, el 95% de los pacientes muestra signos evidentes de recuperación. Cabe señalar que, hasta ahora, no se han encontrado diferencias significativas en cuanto a la respuesta que se obtiene con uno u otro antimicrobianos; sin embargo, el metronidazol suele ser el de primera elección, debido a su bajo costo y a la vancomicina generalmente se le elige para los casos más severos, las pacientes embarazadas y los enfermos que no toleran al primero o son alérgicos a él (12, 14).

Frecuentemente, los regímenes terapéuticos antes mencionados aportan resultados satisfactorios; la diarrea mejora dentro de los 4 días posteriores al inicio del tratamiento y desaparece durante las 2 primeras semanas. Empero, es conveniente considerar que el 12 al 24% de los pacientes llegan a desarrollar nuevos episodios de diarrea en alrededor de los 2 meses posteriores al tratamiento, haciendo necesario insistir con la antibióticoterapia para erradicar la patología en forma definitiva (12).

Al parecer, las recaídas se presentan cuando se suspende el régimen terapéutico y, con base en ello, las esporas endógenas que aún no habían sido destruidas germinan en el intestino, en donde la flora habitual se encuentra desequilibrada.

Por el contrario, las reinfecciones ocurren comúnmente, debido a la exposición del paciente a una nueva cepa, con frecuencia debido a contaminación de las manos del personal hospitalario o del propio ambiente nosocomial (23).

Como agentes terapéuticos de apoyo, las propuestas de los expertos incluyen la aplicación de probióticos al enfermo. Se trata de una mezcla de microorganismos vivos que se administran para reestablecer la flora habitual del paciente, lo que resulta fundamental cuando se ha prescrito y administrado una antibiòticoterapia; sin embargo, los probióticos también son importantes para la estimulación de la respuesta inmune y el aumento de la producción de enzimas que degradan toxinas patógenas. Los microorganismos más utilizados incluyen a *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus paracasei* subespecie *paracasei*, en dosis de  $5 \times 10^{10}$  UFC/día, así como a *Saccharomyces boulardii*, en dosis de  $2 \times 10^{10}$  UFC/día. Estos se administran junto con el antibiòtico de elección durante un período de 28 a 38 días (12).

El empleo de agentes terapéuticos de corte inmunológico se encuentra en fase de prueba y, aparentemente, también podría resultar exitoso. A este respecto, se han desarrollado dos productos: el primero, una inmunoglobulina humana IgG dirigida contra la TcdA, la cual se administra por vía intravenosa, en dosis de 200 a 500 mg/kg durante 2 a 3 semanas, en combinación con el antimicrobiano de elección (metronidazol o vancomicina). Al parecer los pacientes se recuperan rápidamente sin experimentar recaídas (23).

El segundo corresponde a un polvo oral que contiene anticuerpos policlonales obtenidos a partir de la leche de vacas inmunizadas con el toxoide correspondiente. Se administra 3 veces al día durante 2 semanas, junto con metronidazol o vancomicina y, frecuentemente, los pacientes se recuperan sin sufrir de recaídas.

Lógicamente, para los casos en los que el enfermo no responde positivamente a ninguno de los regímenes terapéuticos más eficaces, la cirugía constituye el último recurso, antes de que el padecimiento evolucione hasta el grado de ocasionar perforaciones en el colon, abdomen agudo o megacolon tóxico, ya que estas lesiones se asocian a mortalidades altas, que alcanzan cifras de 32 al 50% (11, 12, 13, 14).

## COMENTARIOS FINALES

Sin lugar a dudas, como ocurre en muchas otras enfermedades, la prevención resulta la mejor opción para combatir a la colitis pseudomembranosa y, en general, a las afecciones ocasionadas por *C. difficile*. Las principales medidas preventivas, son:

- La restricción en el uso de antibióticos, tanto para erradicar infecciones ajenas a *Clostridium difficile*, como para prevenir la reincidencia de la colonización intestinal por esta especie.
- El aislamiento y la debida atención de los pacientes afectados.
- La educación del personal encargado del cuidado de los enfermos.

- El escrupuloso lavado de las manos del personal para evitar la propagación y transmisión entre los internos.
- La desinfección de los objetos contaminados, con hipoclorito de sodio y soluciones de formaldehído.
- El uso de termómetros rectales desechables.

Finalmente, una nueva opción profiláctica que aún se encuentra bajo investigación consiste en la aplicación de vacunas. Hasta el momento se ha probado la inmunización con los toxoides A y B de *Clostridium difficile* en animales, observándose que se genera una efectiva protección contra los efectos de las toxinas.

### Referencias bibliográficas

1. Adams S.D. and Mercer D.W.: Fulminant *Clostridium difficile* colitis, *Curr Opin Critical Care*, 2007; 13(4): 450-455.
2. Bobak D.A.: The molecular pathogenesis of *Clostridium difficile*-associated disease, *Curr Infect Dis Rep*, 2008; 10(2):111-115.
3. Cookson B.: Hypervirulent strains of *Clostridium difficile*, *Postgr Med J*, 2007; 83(979): 291-295.
4. He M., Sebahia M., Lawley T.D., Stabler R.A., Dawson L.F., Martin M.J., Holt K.E., Seth-Smith H.M.B., Quail M.A., Rance R., Brooks K., Churcher C., Harris D., Bentley S.D., Burrows C., Clark L., Corton C., Murray V., Rose G., Thurston S., van Tonder A., Walker D., Wren B:W., Dougan G. and Parkhill J.: Evolutionary dynamics of *Clostridium difficile* over short and long time scales, *Proc Natl Acad Sci*, 2010; 107(16): 7527-32.
5. Nasereddin L.M Bakri F.G. and Shehabi A.: A *Clostridium difficile* infections among jordanian adult hospitalized patients, *Am J Infect Control*, 2009; 37(10): 864-866.
6. Oughton M.T. and Miller M.A.: Clinical and epidemiological aspects of *Clostridium difficile*, *Clin Microbiol News*, 2008; (30): 87-95

7. Shears P.: Hospital-based epidemiology: a strategy for 'dealing with *Clostridium difficile*', *J Hosp Infect*, 2010; 74(4): 319-25.
8. Giesemman T., Egerer M., Jank T. and Aktories K.: Processing of *Clostridium difficile* toxins, *J Med Microbiol*, 2008; 57: 690-696.
9. Lyras D., O'Connor J.R., Howarth P.M., Sambol S.P., Carter G.P., Phumoonna T., Poon R., Adams V., Vedantam G., Johnson S., Gerding D. N. and Rood J.: Toxin B is essential for virulence of *Clostridium difficile*, *Nature*, 2009; (458): 1176-1179.
10. Razaq N., Sambol S., Nagaro K., Zukowski W., Cheknis A., Johnson S. and Gerding D.N.: Infection of hamsters with historical and epidemic BI types of *Clostridium difficile*, *J Infect Dis*, 2007; 196(12): 1813-1819.
11. Elliot B., Chang B.J., Golledge C.L. and Riley T.V.: *Clostridium difficile*-associated diarrhea, *Inter Med J*, 2007; 37(8): 561-568.
12. Gould D.: Prevention and control of *Clostridium difficile* infection. *Nurs Older People*, 2010; 22(3): 29-34.
13. Hookman P. and Barkin J.S.: *Clostridium difficile* associated infection, diarrhea and colitis, *WJG*, 2009; 15(13): 1554-1580.
14. Issa M., Ananthakrishnan A.N. and Binion D.G.: *Clostridium difficile* and inflammatory bowel disease, *Inflammatory bowel diseases*, 2008; 14(10): 1432-1442.
15. Lavallée C., Laufer B, Pépin J., Mitchell A., Dubé S., Labbé A.C.: Fatal *Clostridium difficile* enteritis caused by the BI/NAP1/027 strain: a case series of ileal *C. difficile* infections, *Clin Microbiol Infect*, 2009; 15(12): 1093-1099.
16. Albesa-Jove D., Bertrand T., Carpenter E.P, Swain G.V. Lim J., Zhang J., Haire L.F., Vasisht N., Braun V., Lange A., von Eichel-Streiber Ch., Svergun D.I., Fairweather N.F. and Brown K.A.: Four distinct structural domains in *Clostridium difficile* toxin B visualized using SAXS, *J Mol Biol*, 2010; 396(5):1260-1270.
17. Drudy D., Fanning S. and Kyne L.: Toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile*, *intern J Infect Dis*, 2007; (11): 5-10.
18. Rupnik M.: Heterogeneity of large clostridial toxins: importance of *Clostridium difficile* toxinotypes, *FEMS*, 2008; 32(3):541-555.
19. Schoentaube J., Olling A., Tatge H., Just I. and Gerhard R.: Serine-71 phosphorylation of Rac1/Cdc42 diminishes the pathogenic effect of *Clostridium difficile* toxin A, *Cel Microbiol*, 2009; 11(12):1816-1826.



20. Tasteyre A., Barc M.C, Collignon A., Boureau H. and Karjalainen T.: Role of FliC and FliD flagellar proteins of *Clostridium difficile* in adherence and gut colonization, *Infect Immun*, 2001; 69(12): 7937–7940.
21. Waligora A.J., Hennequin C., Mullany P., Bourlioux P., Collignon A. and Karjalainen T.: Characterization of a Cell Surface Protein of *Clostridium difficile* with adhesive properties, *Infect Immun*, 2001; 69(4): 2144–2153.
22. Calabi E., Calabi F., Phillips A.D. and Fairweather N.F.: Binding of *Clostridium difficile* surface layer proteins to gastrointestinal tissues, *Infect Immun*, 2002; 70(10): 5770–5778.
23. Linsky A.: Proton pump inhibitors and risk for recurrent *Clostridium difficile* infection. *Arch Intern Med*, 2010; 170(9): 772-8.