



Universidad
Zaragoza



Facultad de Ciencias
Universidad Zaragoza

Grado en Biotecnología

Trabajo Fin de Grado

***Clostridioides difficile*: Patogenia, resistencia antimicrobiana y avances en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. Revisión bibliográfica.**

Clostridioides difficile: Pathogenicity, antimicrobial resistance and advances in the development of new therapeutic strategies. A bibliographical review.

Autor:

Álvaro Hernández Ruiz

Director:

Dr. Andrés González Rodríguez

Área de Bioquímica y Biología Molecular

Julio 2024

ÍNDICE

1.	RESUMEN	2
2.	INTRODUCCIÓN	3
2.1.	Aspectos microbiológicos y epidemiológicos	3
2.1.1.	<i>Taxonomía y clasificación</i>	3
2.1.2.	<i>Morfología y metabolismo</i>	3
2.1.3.	<i>Condiciones de crecimiento y medios de cultivo</i>	5
2.1.4.	<i>Ecología y distribución</i>	5
2.1.5.	<i>El hombre como portador asintomático</i>	6
3.	OBJETIVOS	7
4.	METODOLOGÍA	8
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	8
5.1.	Patogenia	8
5.1.1.	<i>Manifestaciones clínicas y prevalencia.</i>	8
5.1.2.	<i>Factores de riesgo en el desarrollo de colitis</i>	9
5.1.3.	<i>Papel de la microbiota normal en la resistencia a la infección por C. difficile</i>	10
5.1.4.	<i>Factores de virulencia</i>	10
	Esporas	10
	Toxinas	12
	a) TcdA y TcdB	12
	b) Toxina binaria	13
	Motilidad y adherencia	14
	Biofilm	15
5.1.5.	<i>Diagnóstico</i>	15
5.1.6.	<i>Tratamiento</i>	16
5.2.	Resistencia antimicrobiana	17
5.2.1.	<i>Causas</i>	17
5.2.2.	<i>Patrones de resistencia</i>	18
5.2.3.	<i>Mecanismos moleculares de resistencias antibióticas en C. difficile</i>	18
5.3.	Avances en el desarrollo de nuevas terapias	20
5.3.1.	<i>Tratamientos sin antimicrobianos</i>	20
5.3.2.	<i>Nuevas dianas terapéuticas</i>	21
6.	CONCLUSIONES	22
	BIBLIOGRAFÍA	23

1. RESUMEN

Clostridioides difficile es un bacilo anaeróbico Gram-positivo, formador de esporas, que se distribuye ampliamente en el tracto intestinal de humanos y animales y en el medio ambiente. La transmisión se produce por vía fecal-oral o por contacto directo con superficies contaminadas con esporas. Una vez en el intestino, las esporas pueden germinar en presencia de condiciones apropiadas, dando lugar a una célula vegetativa que es capaz de multiplicarse activamente, colonizar el intestino grueso y producir toxinas. Las exotoxinas A (TcdA) y B (TcdB) de *C. difficile* son las principales responsables del daño tisular, necrosis e inflamación que caracterizan a esta enfermedad. Los factores de riesgo más importantes para la infección por *C. difficile* incluyen la terapia con antibióticos, la edad avanzada y la estancia hospitalaria prolongada o en residencias de ancianos. El cuadro clínico es diverso y abarca desde el estado de portador asintomático, pasando por diversos grados de diarrea e inflamación del colon (colitis pseudomembranosa), hasta una colitis más grave con toxicidad sistémica y potencialmente mortal conocida como megacolon tóxico, perforación intestinal, sepsis, fallo multiorgánico y muerte. Dado que las opciones terapéuticas frente a la infección por *C. difficile* son actualmente muy limitadas y el desarrollo de resistencias hacia estos antibióticos aumenta, la búsqueda de agentes antimicrobianos más específicos y eficaces para el tratamiento de la infección por *C. difficile* resulta de urgente necesidad para prevenir las recurrencias y disminuir el riesgo de complicaciones graves. En el presente trabajo nos proponemos analizar los aspectos microbiológicos y epidemiológicos más relevantes de *C. difficile* y valorar el estado actual de los avances en la investigación de posibles nuevas terapias que hagan frente a la infección por este patógeno.

ABSTRACT

Clostridioides difficile is an anaerobic, Gram-positive, spore-forming bacillus that is widely distributed in the intestinal tract of humans and animals and in the environment. Transmission occurs by the fecal-oral route or by direct contact with surfaces contaminated with spores. Once in the intestine, spores can germinate in the presence of appropriate conditions, giving rise to a vegetative cell that is capable of actively multiplying, colonizing the large intestine and producing toxins. *C. difficile* exotoxins A (TcdA) and B (TcdB) are primarily responsible for the tissue damage, necrosis and inflammation that characterize this disease. The most important risk factors for *C. difficile* infection include antibiotic therapy, advanced age, and prolonged hospital or nursing home stay. The clinical picture is diverse and ranges from asymptomatic carrier state, through varying degrees of diarrhea and inflammation of the colon (pseudomembranous colitis), to more severe colitis with systemic and potentially fatal toxicity known as toxic megacolon, intestinal perforation, sepsis, multi-organ failure and death. Given that therapeutic options for *C. difficile* infection are currently very limited and the development of resistance to these antibiotics is increasing, the search for more specific and effective antimicrobial agents for the treatment of *C. difficile* infection is urgently needed to prevent recurrences and reduce the risk of serious complications. In the present work, we propose to analyze the most relevant microbiological and epidemiological aspects of *C. difficile* and to evaluate the current state of the art in the research of possible new therapies to deal with infection by this pathogen.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Aspectos microbiológicos y epidemiológicos

2.1.1. Taxonomía y clasificación

Clostridioides difficile (en adelante *C. difficile*) es una de las especies pertenecientes al género *Clostridioides*, que engloba bacterias Gram positivas, anaerobias estrictas, morfología bacilar y capaz de formar esporas (1). *C. difficile* fue aislada por primera vez en el año 1935 por Hall y O'Toole, que la agruparon bajo el género *Bacillus* y le atribuyeron la especie *difficile* debido a la gran dificultad que presentaba para aislarla y cultivarla (2,3). No fue hasta 1978 cuando se asoció esta bacteria con la enfermedad que producía: diarrea asociada al uso de antibióticos (4).

Una posterior clasificación englobó esta especie bajo el género *Clostridium*, el cual agrupa especies de características morfológicas y metabólicas similares. Sin embargo, en el año 2015, se plantea en el trabajo de Lawson y Rainey (5) restringir este género únicamente a *C. butyricum* y especies relacionadas molecularmente con esta, siendo necesario un análisis exhaustivo (fomentado por los avances en clasificación molecular) de las especies que conformaban el género (6). Esta revisión concluyó que *C. difficile* debía incluirse en la familia *Peptostreptococcaceae*, surgiendo la necesidad de crear un nuevo género, preferiblemente de nombre similar a *Clostridium* que facilitase el cambio, de tal manera que surgió *Clostridioides* (6).

La reestructuración del género *Clostridium* surge en base al exhaustivo análisis fenotípico, quimiotaxonómico y filogenético de las especies pertenecientes al mismo (7). En sus inicios, el género *Clostridium* se estableció en el año 1880 y terminó por agrupar especies bacterianas Gram+ anaerobias que formen esporas y de morfología bacilar (7). Con la implementación de métodos moleculares, como el análisis del 16S rRNA o el DNA-rRNA pairing, se empezaron a estudiar de una manera más detallada las diferencias entre las especies que formaban parte de este género (7).

En este sentido, la descripción establecida en 2016 por el propio Lawson et al. (7) para las bacterias que conforman la especie *Clostridioides difficile* es la siguiente: células Gram positivas en forma de bacilos y anaerobias estrictas, productoras de esporas y dotadas de movilidad. Producen abundante gas en medio de cultivo PYG, así como un amplio rango de ácidos grasos ramificados y no ramificados. Los productos de la fermentación en PYG son los ácidos acético, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico, isocapróico, fórmico y láctico. El aminoácido de diagnóstico de su peptidoglicano es el meso-DAP. Además, este mismo artículo menciona la especie *Clostridioides mangenotti* como la más cercana filogenéticamente, compartiendo un 94,7% de homología de secuencia, además de otros marcadores fenotípicos. El cambio de nombre a *Clostridioides difficile* fue aprobado por la *International Committee on Systematics of Prokaryotes* (ICSP), siendo publicado el 1 de septiembre de 2016 en la revista *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (IJSEM) (8).

2.1.2. Morfología y metabolismo

C. difficile presenta una morfología bacilar, peritrica y normalmente tiene movilidad en cultivos (7). El tamaño de las células rondan los 0,5-1,9 x 3,0-16,9 micras y algunas cepas de esta especie forman cadenas de entre 2 y 6 células (7) (Figura 1). Esta especie bacteriana se caracteriza por ser capaz de utilizar una amplia variedad de nutrientes presentes en el metaboloma intestinal (principalmente carbohidratos y aminoácidos) para su desarrollo (9).

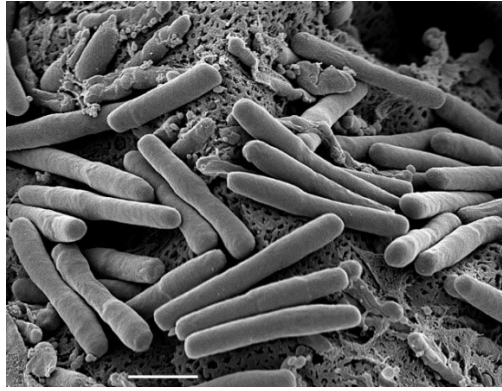


Figura 1. Imagen de microscopía electrónica de barrido de células de *C. difficile*. Fuente: Robert Koch Institute, Alemania (<https://www.rki.de>).

Tanto los carbohidratos como los aminoácidos, abundantes en el intestino de los pacientes que se encuentran sometidos a antibióticos (entorno en el que se desarrolla frecuentemente *C. difficile*) son importantes nutrientes para la infección de esta bacteria, (9). Con respecto al metabolismo central del carbono, *C. difficile* presenta las clásicas vías de glucólisis y gluconeogénesis, aunque por similitudes genéticas con *C. acetobutylicum*, se cree que carece de un ciclo de Krebs completo (10). Estas vías dan como productos piruvato el cual, junto al aminoácido cisteína, inhiben la producción de toxinas (10). Esto refleja que el metabolismo también se encuentra relacionado con la virulencia de diversas maneras. Por ejemplo, ante la baja disponibilidad de nutrientes, *C. difficile* comienza a producir toxinas que favorecen un ambiente proinflamatorio y citotóxico, liberando nutrientes a partir de las células del hospedador (9). Estudiando la base molecular de este aspecto, se ha descubierto que los reguladores globales de respuesta a nutrientes como la glucosa, los aminoácidos ramificados, el GTP o la prolina inducen la inhibición de la síntesis de toxinas cuando hay exceso de los nutrientes que regulan (9). Algunos de los carbohidratos que puede aprovechar por fermentación *C. difficile* son la glucosa, fructosa, manosa, manitol, sorbitol o celobiosa, pero es incapaz de fermentar arabinosa, galactosa, lactosa, maltosa o sacarosa (9,11).

También con respecto a los carbohidratos, muchos de los carbohidratos que no son digeribles por el hospedador sirven como nutrientes para *C. difficile*, aunque también son útiles para otros microorganismos. Es por ello que *C. difficile* se encuentra en condiciones favorables ante disbiosis, ya que ocupa el lugar de otros microorganismos con los que compite por el consumo de nutrientes (9). En relación a reacciones específicas de aminoácidos, destaca la vía metabólica de Stickland, caracterizada por causar la fermentación acoplada de dos aminoácidos (uno se oxida y el otro se reduce) para la obtención de energía en forma de ATP mediante fosforilación a nivel de sustrato y el mantenimiento del ratio NADH/NAD^+ (9,10).

Otra molécula de gran relevancia a nivel metabólico, en relación a la vía metabólica de Stickland, y especialmente en el caso de las infecciones asintomáticas, es la ornitina. Esta molécula puede ser aprovechada mediante la fase oxidativa de esta vía, produciendo acetyl-CoA, amonio y alanina. Se ha demostrado que la delección de una de las enzimas involucradas en esta transformación supone para las bacterias mutadas una desventaja con respecto a las no mutadas (9). Esta ornitina también puede ser transformada a prolina a través de la enzima ornitina ciclodesaminasa, pudiendo entrar también al metabolismo de Stickland de esta forma (9).

Otro metabolismo importante para *C. difficile* es el de la etanolamina. Esta molécula se obtiene mediante hidrólisis del fosfatidiletanolamina, liberado al lumen intestinal tras la acción de las toxinas de *C. difficile*. La bacteria puede aprovechar esta molécula como fuente de carbono y nitrógeno debido

a la producción de amonio y acetaldehído, el cual se transformará en etanol o acetil-CoA. En caso de transformarse en este último, puede ser aprovechado tanto para vías anabólicas como para la producción de ATP mediante fosforilación a nivel de sustrato (9). Pese a ser un metabolito útil para *C. difficile*, a diferencia de otros patógenos intestinales, no se ha determinado una relación entre el metabolismo de la etanolamina y la patogenicidad de *C. difficile* (9).

2.1.3. Condiciones de crecimiento y medios de cultivo

Comúnmente, se evita el cultivo bacteriano de *C. difficile* debido a lo tedioso que es trabajar con ella y la posibilidad de detectar su presencia mediante otro tipo de ensayos de laboratorio (12). Esto hace que sean reducidas las muestras disponibles de esta bacteria para evaluación de aspectos epidemiológicos o clínicos como resistencia a antibióticos, identificado de factores de virulencia o tipificación molecular (12).

En caso necesario, es posible establecer cultivos de *C. difficile*, tanto en medio líquido como en agar, aislándola previamente de muestras fecales o ambientales (1). Especialmente, los cultivos de muestras fecales se realizan para establecer el diagnóstico cuando otros test no aportan resultados concluyentes (13). Para el caso de las muestras ambientales, debido a que las esporas pueden encontrarse en bajas cantidades o haber estado sometidas a estrés, es aconsejable añadir lisozima en el cultivo para recuperar una mayor cantidad (13). Se cree que esta enzima es capaz de favorecer la germinación de las esporas que han sufrido daño por estrés en las proteínas de su envoltura (13).

Esta bacteria comienza a crecer tras las primeras 48h en el medios de cultivo tras una primera fase de incubación bajo condiciones anaerobias y a temperaturas entorno a los 37°C (1,13). Puede ser cultivada en medios no selectivos como agar sangre, donde no produce hemólisis (1). Sus colonias pueden medir entre 12 y 15 mm, de apariencia marrón cristalina y emitiendo un olor característico comúnmente asociado a heces de caballo o granero, resultante de la capacidad de este microorganismo de fermentar tirosina a para-cresol, un compuesto fenólico que, detectado mediante HPLC, nos es útil para diferenciar *C. difficile* de especies similares a esta (1).

Tal y como se describe en el estudio de Marler et al. (14) , la principal opción de medio de cultivo para *C. difficile* es el medio CCFA, caracterizado por contener cicloserina, cefotaxima y fructosa. También destaca el medio CCMA, que presenta manitol en vez de fructosa (11).

2.1.4. Ecología y distribución

C. difficile es de distribución ubicua y sus tres principales reservorios son la naturaleza, los humanos y los animales, pudiendo ser aislada principalmente de tierra, aguas residuales o en heces de mamíferos (15,16). Mientras que el artículo de revisión de Abad *et al.* (17) estima que esta especie bacteriana coloniza a más del 70% de los bebés a lo largo del primer año de vida, el trabajo elaborado por Groscher (18) reduce esta estimación a un 50% y añade que raramente produce síntomas en estos individuos y, conforme la flora intestinal cambia durante el desarrollo del niño, la población de *C. difficile* se ve en detrimento. En adultos, esta bacteria representa entre el 1 y el 3% de la flora comensal adulta (11).

Los primeros estudios que describen la presencia de *C. difficile* en animales son de 1974 (19), donde se ubica a esta especie en heces de conejo, caballo y vaca (16). El mismo trabajo ratifica la aparición de esta bacteria en paja, arena y fangos de río. Además de estudiar la aparición de *C. difficile* en animales de granja y el impacto económico que puede generar su infección en estos, los grupos de investigación a nivel global están enfocados en analizar la relación entre los distintos reservorios de este patógeno y su relación con el ser humano, principalmente identificación de las cepas en un caso y otro y comparación (16).

Los estudios medioambientales reiteran la importancia que tiene el ambiente hospitalario en la distribución de *C. difficile*, suponiendo un entorno altamente contaminado por las esporas de esta bacteria y que complica el combate contra ella (11).

En Europa, desde comienzos de los años 2000, se ha producido un incremento en la expansión y severidad de casos de *C. difficile*, pasando de 2,45 casos por cada 10.000 pacientes en 2005 a 7 por cada 10.000 pacientes en 2013 (20). Un reciente estudio de 2020 (21) estima que la incidencia de infecciones de *C. difficile* adquiridas por pacientes en el ámbito hospitalario se eleva a 8,3 por cada 10.000 pacientes. Este incremento en la prevalencia se atribuye tanto a una mayor conciencia y métodos de diagnóstico de mayor sensibilidad relacionados con esta bacteria, como a la aparición de una variante hipervirulenta denominada bajo el ribotipo 027, caracterizada por una variación en su genoma que se traduce en una sobreproducción de toxinas, así como mayor resistencia a ciertos antibióticos (20,22). Todo ello deriva en infecciones recurrentes que generan mayores complicaciones. A pesar del impacto negativo que este ribotipo impone sobre la salud de los pacientes y lo notoria que es su infección, cabe destacar que no es el ribotipo más común en Europa (20). Un estudio realizado a nivel europeo en 2011 (23) destaca a los ribotipos 014/020, 001 y 078 como los más abundantes en las muestras analizadas a nivel europeo (20).

Debe hacerse una especial mención a la relación existente entre la epidemia de COVID-19 las infecciones por *C. difficile*. Desde el comienzo de la pandemia se pudo apreciar un aumento de la incidencia de la infección por esta bacteria, lo cual se explica principalmente por el uso abusivo de antibióticos. Un estudio (24) que analiza la correlación entre la pandemia de coronavirus y las infecciones de *C. difficile* en Rumanía afirma que, durante este evento, fueron recetados antibióticos para tratar co-infecciones bacterianas, así como de manera profiláctica, en casos de infecciones por agentes patógenos. Es principalmente este uso excesivo de antibióticos el que produce una disbiosis de la flora bacteriana, desarrollando una mayor incidencia de infecciones por esta bacteria, así como la aparición de cepas resistentes que incrementen la problemática.

Tal y como afirma el trabajo publicado por Spigaglia (25), por un lado, los esfuerzos en el diagnóstico, monitorización y prevención de infecciones nosocomiales como *C. difficile* se ha visto en detrimento en favor de un mayor control sobre COVID-19, por otro lado, la puesta en práctica de métodos de higiene personal y equipos de protección individual, la limpieza de las infraestructuras o el aislamiento de los pacientes han supuesto un efecto positivo sobre los contagios por esta bacteria. Todo ello ha hecho que, pese al uso masivo de antibióticos (la autora aporta que el entorno al 70% de los pacientes de COVID-19 fueron administrados antibióticos para hacer frente a infecciones bacterianas derivadas), la incidencia de infecciones por *C. difficile* disminuyese durante la pandemia. También cabe destacar que algunos de los antibióticos utilizados durante las infecciones por SARS-CoV-2 suponen un riesgo menor para contraer *C. difficile*, tales como azitromicina. Resaltar que, como bien se ha dicho, es posible que haya habido una subestimación en el diagnóstico, tanto porque se han destinado más recursos al COVID-19, como porque algunos de los síntomas de *C. difficile*, como la diarrea, coinciden con aquellos del virus.

2.1.5. El hombre como portador asintomático

Gran parte de la problemática que genera esta especie es debido a la elevada cantidad de portadores asintomáticos que genera. No existe una definición única en lo que a la infección asintomática se respecta. Sin embargo, en un reciente estudio de Furuya-Kanamori *et al.* (26) que analiza el criterio de numerosos autores en este tema, se define la infección asintomática como la detección de *C. difficile* o de sus toxinas en ausencia de los síntomas que la infección causa, haciendo especial hincapié en la

diarrea y la colitis pseudomembranosa; a excepción que los síntomas se encuentren presentes pero puedan ser asociados a otra causa.

No existen evidencias que concluyan que las cepas no toxigénicas de *C. difficile* sean capaces de desembocar en enfermedad (26). Es por ello que, en caso de encontrar cepas no toxigénicas en pacientes que desarrollen diarrea, estas no deben ser consideradas como el agente causal y por ende se considerará al paciente asintomático a no ser que sean hallados otros síntomas como la colitis (26). Por el contrario, los portadores asintomáticos no tienen por qué estar infectados por cepas no toxigénicas; las cepas toxigénicas son las responsables de las infecciones asintomáticas en el 62-86% de los casos (1)

Se estima que entre el 4-15% de los adultos sanos pueden estar colonizados asintomáticamente por *C. difficile*, destacando la alarmante preocupación de aquellas infecciones que son adquiridas en el ámbito hospitalario (27). Tanto pacientes ambulatorios como enfermos que requieren ser ingresados son frecuentemente infectados con esta bacteria, produciendo casos en los que se produce enfermedad (con los consecuentes síntomas), así como infecciones asintomáticas pero con la misma capacidad para contagiar que un enfermo (1). Los pacientes que presentan otras patologías previas como la fibrosis quística muestran una mayor prevalencia de esta bacteria (26). En este caso, se atribuye la mayor colonización a la alteración del transporte de electrolitos por las células epiteliales, lo cual reduce la protección ante las toxinas (26).

Se ha estimado que las infecciones asintomáticas de esta bacteria son debidas a que el portador puede desarrollar una respuesta humoral a las toxinas, y la prevalencia de estas infecciones depende de factores propios del patógeno, del hospedador y del entorno, y estos factores son importantes para analizar la contribución de los portadores asintomáticos sobre la transmisión en ambientes sanitarios y su relación con infecciones sintomáticas y la transmisión de nuevas cepas con alta capacidad toxigénica (26).

Los contagios asintomáticos se ven propiciados por las esporas, las cuales pueden ser transportadas en las manos o utensilios del personal sanitario y encontrar un nuevo hospedador (28). Estas esporas resisten los ácidos gástricos y, ante las condiciones anaerobias del intestino grueso, germinan al estado vegetativo, colonizando principalmente el colon (26).

3. OBJETIVOS

Objetivo general:

Profundizar en el conocimiento sobre la patogenia, el fenómeno de la resistencia antimicrobiana y los avances recientes en el desarrollo de nuevos tratamientos frente al patógeno *C. difficile*.

Objetivos específicos:

1. Analizar los aspectos de mayor interés en la patogenia de *C. difficile*, incluyendo los factores de riesgo de la infección, las manifestaciones clínicas más relevantes, los factores de virulencia y los métodos diagnósticos.
2. Valorar el papel del microbioma intestinal humano en la prevención, progresión y tratamiento de la infección por *C. difficile*.
3. Analizar las causas, principales mecanismos moleculares y patrones de resistencia de *C. difficile*.
4. Conocer los actuales avances en el tratamiento, terapias no antimicrobianas y nuevas dianas terapéuticas para el desarrollo de antibióticos frente a *C. difficile*.

4. METODOLOGÍA

Para llevar a cabo este trabajo de revisión bibliográfica, se realizó una búsqueda exhaustiva de artículos de investigación, artículos de revisión, capítulos de libros y monografías especializadas, a través de la base de datos PubMed y del buscador Google Scholar. Para la revisión y acceso a gran parte de la bibliografía se utilizó el buscador AlcorZe de la biblioteca de la Universidad de Zaragoza y la plataforma online ResearchGate.

Para la búsqueda bibliográfica, se emplearon las palabras esenciales "*Clostridioides*", "*difficile*" "*Clostridium*", "*infection*", en combinación con palabras claves como "*virulence*" "*pathogenicity*" "*toxin*" "*prevalence*" "*treatment*" "*antibiotics*" "*taxonomy*" "*clasification*" "*risk factor*" "*spore*" "*culture*" "*dysbiosis*" "*microbiota*" "*fidaxomicin*" "*diagnosis*" "*assymptomatic*" "*motility*" "*adherence*". Inicialmente la búsqueda se realizó sin acotar fechas de publicación. Debido a la gran cantidad de bibliografía disponible, en algunos temas la búsqueda se acotó a los últimos 20 años, prestando especial interés a los aportes de los últimos 10 años.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Patogenia

5.1.1. Manifestaciones clínicas y prevalencia.

C. difficile es ampliamente conocida uno de los principales orígenes de la diarrea asociada a antibióticos, siendo la causa de aproximadamente una de cada tres casos de esta patología (17), aunque esta no es la única problemática que causa esta bacteria.

Tal y como se ha destacado anteriormente, existen infecciones asintomáticas de esta bacteria que no llegan a desarrollar enfermedad. Sin embargo, para que una persona desarrolle los síntomas propios de la enfermedad causada por esta bacteria, debe encontrarse expuesta a las esporas de una cepa toxigénica lo suficiente como para permitirles entrar en el organismo, proliferar en el intestino (frecuentemente en el tramo del colon distal) y producir las toxinas propias (17,29). Es frecuente que la persona que haya contraído una infección por *C. difficile* presente infecciones recurrentes. Se define recurrencia como un episodio de infección entre 2 y 8 semanas tras un episodio previo. El riesgo de recurrencia aumenta en caso de haber habido una primera recurrencia, y la mortalidad es mayor en pacientes con recurrencia que en el primer episodio.

En caso de desarrollar enfermedad, los síntomas más reconocibles que causa la infección sintomática de *C. difficile* son la diarrea, el tenesmo (incremento en la sensación de necesitar ir al baño sin poder) y el malestar gastrointestinal, pudiendo empeorar a síntomas de mayor gravedad como la colitis pseudomembranosa o megacolon tóxico (17,30). Estos no son los únicos síntomas, también destacan la leucocitosis (incremento de glóbulos blancos en el organismo), así como fiebre y diarrea hemorrágica en menor medida (1). Finalmente, es digno de mencionar que en casos muy reducidos esta enfermedad puede desencadenar en síntomas muy graves como deshidratación, distensión abdominal, shock circulatorio o colitis fulminante, resultando letal en este caso (1,17).

Pese a las alarmantes complicaciones citadas, la mayoría de los pacientes desarrollan únicamente diarrea moderada, la cual suele remitir a los 5-10 días de cesar el tratamiento con antibióticos que ha causado la infección de *C. difficile* (17). Otras manifestaciones clínicas ajenas al colon tales como la infiltración intestinal, artritis reactiva o bacteriemia son altamente infrecuentes (17).

En base a las manifestaciones clínicas y los resultados de análisis de laboratorio que presente el paciente, se puede clasificar la infección por *C. difficile* en 3 tipos: moderada, severa o fulminante. Normalmente, se utilizan criterios específicos para asignar a los pacientes en uno de estos tres grupos. Los pacientes que presentan una infección severa suelen tener un recuento de glóbulos blancos mayor que 15×10^6 por litro de sangre, o un nivel de creatina en suero mayor a 1,5 mg/dl. Para la clasificación en fulminante, el paciente debe presentar hipotensión, sepsis, shock, encontrarse bajo cuidados intensivos, mostrar megacolon o perforación del intestino o necesitar la instalación de una colectomía. Si el paciente no presenta los signos de las infecciones severa o fulminante, se le incluye en el grupo de infección moderada (31).

En Europa, se estima que el número de casos de infección por *C. difficile* al año es de unos 124.000, consolidándose en el sexto puesto en la lista de microorganismos responsables de infecciones nosocomiales en 2016-2017 (22).. Otro estudio de *Spigaglia, 2022* (25) aporta que el número de casos anuales de infección por *C. difficile* se eleva a medio millón en Estados Unidos, derivando en unas 29.000 muertes, frente a los 152.900 casos anuales que se producen anualmente y las 8382 muertes asociadas.

Las infecciones por *Clostridioides difficile* suponen un importante impacto económico en nuestra sociedad, estimándose en pérdidas anuales de 300 millones de euros en la Unión Europea y 796 millones de dólares en Estados Unidos (32). Existe un informe epidemiológico emitido por la *European Centre for Disease Prevention and Control* en el intervalo 2018-2020 (33), pero los resultados no son tan completos como podrían ya que en el 2020 se priorizó el seguimiento de la pandemia de SARS-CoV-2 y participaron la mitad de los países que participaron en el anterior informe. Dicho informe aporta que en el año 2020 se reportaron un total de 31.731 casos de infección por *C. difficile* entre 8 países europeos, la mayoría adquiridos en ambiente hospitalario, alcanzando una incidencia de 2,58 caso por cada 10.000 pacientes-día. Este informe no hace distinción entre los grupos poblacionales más afectados.

5.1.2. Factores de riesgo en el desarrollo de colitis

La infección por *C. difficile* se ve favorecida por múltiples factores de riesgo, entre los que se destacan los siguientes:

- **Uso de antibióticos:** se considera el factor de riesgo más preocupante para la infección por *C. difficile*, puesto que entre el 5 y el 25% de las personas tratadas con antibióticos desarrollan las citadas diarreas (17). Casi todos los antibióticos han sido relacionados con un mayor riesgo de contraer una infección por *C. difficile*, haciendo especial hincapié en vancomicina y metronidazol (antibióticos usados frecuentemente para tratar la propia infección de *C. difficile*), la clindamicina y algunas penicilinas, fluoroquinolonas y cefalosporinas de amplio espectro, que han demostrado generar un riesgo mayor (17,34). El motivo por el cual el uso de antibióticos resulta perjudicial ante la infección de *C. difficile* reside en la desestabilización de la flora microbiana intestinal.
- **Edad:** Una edad superior a los 65 años implica tanto una mayor facilidad para desarrollar esta infección como una mayor gravedad de los síntomas, causando una mayor mortalidad (34).
- La infección por *C. difficile* se encuentra altamente relacionada con la **exposición al ambiente hospitalario** (11).
- **Inmunosupresión** como consecuencia de alguna patología como SIDA, cáncer o fármacos inmunosupresores (35).
- **Tratamiento con inhibidores de bombas de protones** (36).

- **Enfermedades previas** como la enfermedad inflamatoria de Bowel, enfermedades de riñón o cirugías gastrointestinales (37).

5.1.3. *Papel de la microbiota normal en la resistencia a la infección por C. difficile*

Las paredes del intestino se encuentran tapizadas de manera normal por microorganismos como bacterias, hongos y virus que ejercen efectos positivos sobre nuestro organismo, tales como la regulación del sistema inmune, el mantenimiento de la función de barrera y regulación metabólica (30). Algunos mecanismos mediante los que la flora intestinal protege ante la infección de *C. difficile* son la reducción del pH intestinal, la competición por los nutrientes, la producción de ácidos grasos de cadena corta, la regulación de la producción de ácidos biliares o la producción de bacteriocinas (30). La alteración de esta microbiota normal y de su función se denomina disbiosis y es uno de los principales factores de riesgo ante la contracción de una infección por *C. difficile*. Esta disbiosis está fomentada por la acción de los antibióticos, que alteran la composición de la flora intestinal, reduciendo la presencia de los microorganismos beneficiosos y con ello la resistencia del tracto intestinal a la colonización de patógenos, favoreciendo la proliferación de *C. difficile* tanto de origen endógeno como exógeno (17,30).

Destaca el papel de la microbiota normal en el metabolismo de los ácidos biliares. Estos son producidos en el hígado y son desconjugados y transformados gracias a la acción de ciertas especies bacterianas que habitan en el intestino (30). Particularmente, han de ser mencionados desoxicólico y litocólico, producidos por especies del género *Clostridium* (Nota: no *Clostridioides*, las del género *Clostridium* pueden formar parte de la microbiota sana). Ambos ácidos biliares imposibilitan la colonización de bacterias patógenas tales como *C. difficile* (30). Además, a medida que van apareciendo ácidos biliares secundarios, así reduciendo los primarios, los cuales son uno de los principales agentes que posibilitan la germinación de las esporas (30).

El estudio de Semon et al. (38) hace referencia a que los niños poseen esta especie bacteriana en su intestino en niveles elevados, sin embargo, no desarrollan enfermedad, y propone que la colonización de esta bacteria tiene lugar en el ámbito hospitalario y no mediante transferencia vertical (38). Es posible que la composición bacteriana del intestino a edades temprana favorezca la colonización de *C. difficile*, y a su vez se ha demostrado que la presencia de *C. difficile* favorece la colonización de patógenos oportunistas como *K. pneumoniae* o *R. gnavus* (38). Existen diferentes teorías sobre el motivo por el que *C. difficile* no causa enfermedades (es decir, no genera síntomas) en pacientes infantiles, tales como la ausencia de receptores de las toxinas específicas de *C. difficile* o la presencia de anticuerpos contra las toxinas procedentes de la leche materna (38). Sin embargo, al igual que existen estas hipótesis, también este trabajo recoge argumentos en contra de estas y que las desestiman (38).

5.1.4. *Factores de virulencia*

Esporas

El principal mecanismo mediante el cual *C. difficile* causa su infección son las endosporas (39). Estas endosporas se encuentran en un estado latente metabólicamente, y son capaces de soportar estreses muy comunes como calor, desinfectantes o aerobiosis. Esto supone un factor de virulencia a tener presente, ya que la resistencia de estas esporas dificulta el tratamiento de los individuos infectados o desinfección de las instalaciones, entre otros aspectos (39). La reproducción asexual de estas bacterias ocurre mediante fisión binaria, si bien, ante estímulos ambientales como la carencia de nutrientes, la bacteria alterna de un ciclo vegetativo a la esporulación (39) (Figura 2).

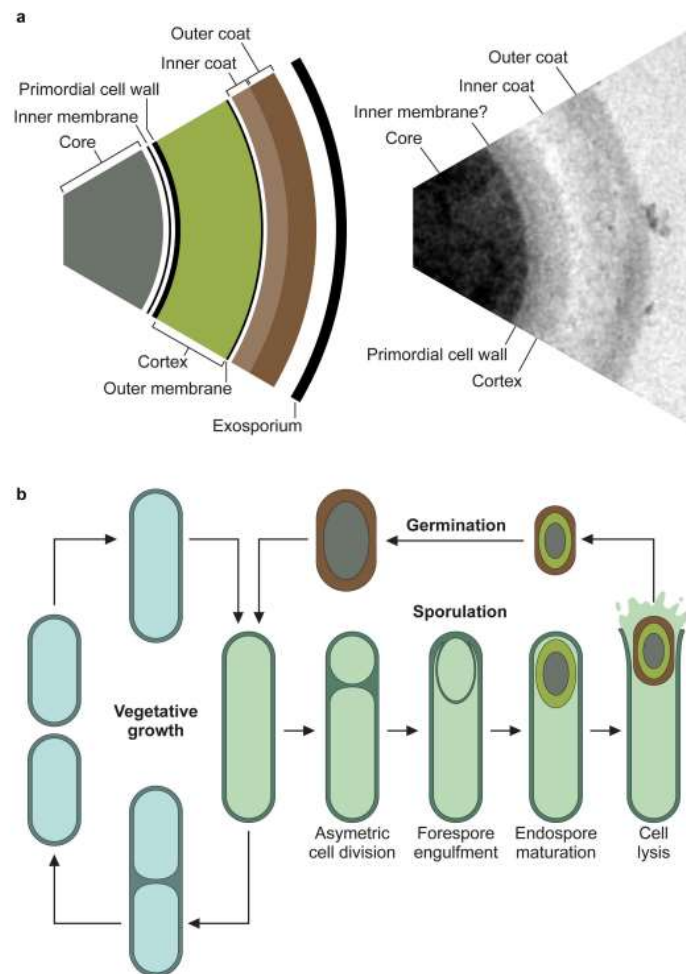


Figura 2: A. Estructura multicapa de la espora *C. difficile*. B. Ciclo vital de *C. difficile*. (39).

El estudio de Buddle y Fagan (39) desarrolla detalladamente el proceso de esporulación de *C. difficile*. Esta comienza con una primera etapa en la que se forma un septo asimétrico, el cual diferencia a la célula madre de la pre-espore. La célula madre rodea a la pre-espore, aportándole una doble membrana a esta. El siguiente paso es una síntesis de una capa gruesa de peptidoglicano, así como envolturas proteicas. En el interior de la espore se acumulan ácido dipicolínico, que combinado con calcio favorece la deshidratación de la espore y, junto a las proteínas pequeñas solubles en ácido (SASPs), protege al ADN del daño producido por las altas temperaturas. Una vez terminan de formarse completamente las envolturas y las capas de la corteza, la célula madre se lisa y libera la espore madura, que resulta ser la forma infecciosa de esta bacteria. Una vez estas esporas son ingeridas por el hospedador, se produce la germinación de la espore ante las condiciones adecuadas (aquellas presentes en el intestino) y la bacteria comienza nuevamente su ciclo vegetativo mediante fisión binaria (30).

La regulación de la esporulación se ve condicionada por la integración de múltiples factores ambientales y nutricionales, entre otros. A pH reducidos, aumenta la producción de esporas, y ante la presencia de glucosa, aminoácidos ramificados y GTP se produce represión del gen *spo0A*, que es el principal responsable de desencadenar la esporulación, gracias a los represores CodY y CcpA (39). Por su parte, la germinación de la espore viene provocada por agentes químicos llamados germinantes, los cuales inducen señales de que la espore se encuentra en un entorno óptimo para la proliferación

del estado vegetativo de la bacteria. El principal germinante de *C. difficile* es el taurocolato, un ácido biliar derivado del colesterol que es detectado por la pseudoproteasa bacteriana CspC que activa la hidrolasa SleC, iniciando el ciclo vegetativo de la bacteria. En este ciclo vegetativo, las bacterias se encargarán tanto de la producción de toxinas, generando enfermedad en su hospedador, como nuevas esporas que garantizarán tanto la transmisión a nuevos hospedadores como de generar infecciones recurrentes en el mismo hospedador ante el cese del tratamiento con antibióticos (39). Asimismo, también existen otros ácidos biliares que inhiben la germinación de las esporas, tales como el ácido quenodesoxicólico (22).

Toxinas

a) TcdA y TcdB

Las toxinas A y B son el principal factor de virulencia de *C. difficile* (39). Estas toxinas son internalizadas en las células epiteliales del intestino, produciendo la glicosilación de proteínas Rho y derivando en última instancia en la muerte celular y, por lo tanto, la pérdida de la función de barrera que presenta el epitelio intestinal (39).

Las toxinas A y B están codificadas por una región llamada Pathogenicity locus (PaLoc) (Figura 3), la cual engloba a los genes *tcdA* y *tcdB*, que sintetizan ambas toxinas respectivamente, y tres genes más: *tcdR*, *tcdC* y *tcdE* (39):

- TcdR actúa como un regulador positivo de la producción de las toxinas A y B. Es capaz de unirse a su propio promotor para aumentar su transcripción, lo cual favorece la retroalimentación positiva sobre la producción de toxinas (39). Además, su actividad se ve regulada por factores ambientales como la temperatura o la disponibilidad de nutrientes (40).
- TcdC se describe como un modulador de la producción de toxina. Se cree que realiza su función secuestrando a TcdR (39).
- TcdE ha sido recientemente descrito como una holina. Estas son proteínas de membrana comúnmente codificadas por fagos que permiten la lisis celular, aunque en este caso se cree que su función es la secreción de las toxinas al medio (39).

Además, el artículo de revisión de Kordus et al. (40) describe otro elemento incluido en el PaLoc, llamado *tcdL*. Este es un fragmento de pequeño tamaño de un gen de endolisina. El gen ya no presenta esta actividad, y aunque su función es incierta, un estudio teoriza sobre su papel facilitador de la secreción de la toxina mediante unión a TcdB (40).

La secuencia de las toxinas A y B presenta una alta similitud, lo cual sugiere que su origen se remonta a un proceso de duplicación génica (39). Esta estructura está compuesta por cuatro dominios en ambos casos: un dominio glucosiltransferasa en el extremo N-terminal, uno autoproteasa, un dominio relacionado con la interacción con el receptor, formación del poro, entre otras funciones, y un último dominio formado por secuencias combinadas de oligopéptidos repetidos. La estructura global de ambas toxinas se asemeja a una cabeza polilobulada con dos colas, la primera correspondiente al dominio de oligopéptidos y la segunda al dominio de interacción (40). A pesar de ello, los receptores con los que interactúan son diferentes, siendo el principal receptor para la toxina A son los glicosaminoglicanos sulfatados y el receptor de la LDL, mientras que la toxina B presenta un abanico más amplio de receptores a los que unirse, incluyendo el PVRL3 y los receptores Frizzled 1,2 y 7 (39). El mecanismo de acción de las toxinas A y B es muy similar, siguen un modelo de acción denominado ABCD (*Activity, Binding, Cutting, Delivery*) (39). Las toxinas se unen a su receptor de membrana, desencadenando una endocitosis dependiente de clatrina y dinamina (39). El endosoma sufre un proceso de acidificación, lo cual induce un cambio en la conformación de la toxina que permite su

inserción en la membrana del endosoma y formación de canal (39). A través de este canal se libera la toxina al citoplasma, donde sufrirá otro cambio conformacional al ponerse en contacto con una molécula inductora, liberando el dominio glucosiltransferasa en el citosol (39). Este dominio es capaz de interactuar con proteínas de la familia de GTPasas Rho, alterando la transducción de señales y la despolimerización de la actina y la ruptura de las uniones estrechas, concluyendo en la apoptosis o la necrosis de la célula afectada (22,39).

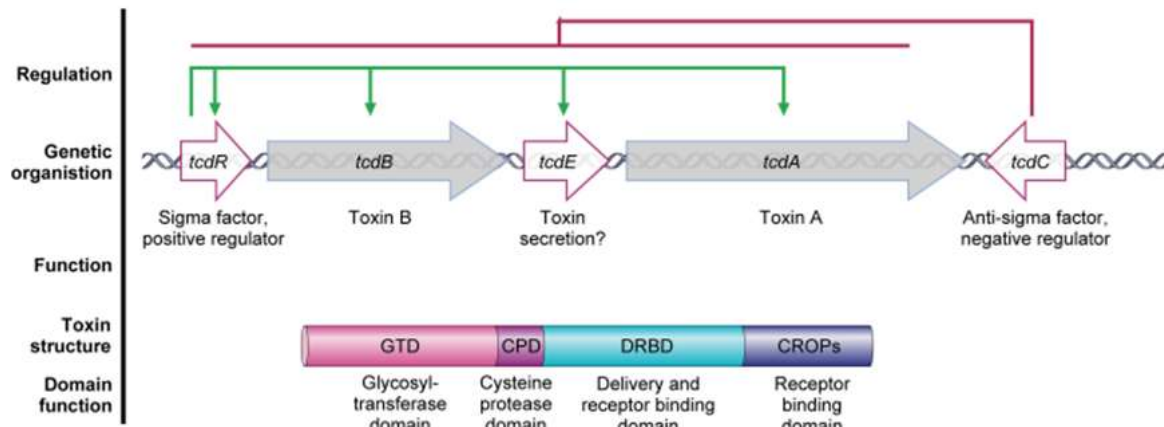


Figura 3. Locus de patogenicidad PaLoc de *C. difficile* (39)

b) Toxina binaria

La toxina binaria de *C. difficile* es una toxina producida por ciertos ribotipos hipervirulentos como el RT027 y RT078, siendo el primero especialmente problemática debido a su alta resistencia a fluoroquinolonas y la severidad de las infecciones que produce (17,36). Esta toxina formada por dos componentes proteicos:

- El primer componente, llamado CDTa, costa de dos dominios, un dominio ADP-ribosiltransferasa que cataliza la ADP-ribosilación de la actina globular, y un dominio pseudo ADP-ribosiltransferasa, que permite la unión al componente CDTb de la toxina (40).
- El segundo componente, llamado CDTb, presenta cinco dominios que, en conjunto, permiten la adhesión a la célula hospedadora, la formación de un poro en su membrana y la entrada de CDTa en la célula (40).

El mecanismo de acción de esta toxina comienza con su unión al receptor de la LDL, presente en las células del epitelio intestinal entre otras (39), aunque el artículo de revisión de Kordus *et al.* (40) propone al receptor LSR como el involucrado en esta interacción. Según este último, ante la interacción con el receptor, unas serín-proteasas intracelulares escinden un péptido del extremo N-terminal de CDTb, lo cual promueve su polimerización a un heptámero, que interactuará con el dominio pseudo ADP-ribosiltransferasa de CDTa para unir por completo al CDTa. Toda esta asociación entre CDTa y CDTb es endocitada en el interior de la célula, y es en este la membrana de este endosoma donde CDTb cambia de conformación a un barril beta que forma un poro y permite el traslado al citosol de CDTa. Una vez en el citosol, las proteínas HSP90 y ciclofilina A repliegan a CDTa, cuyo dominio ADP-ribosiltransferasa se encarga de modificar el residuo Arg177 de la actina. Esto altera aspectos fisiológicos y morfológicos de la célula hospedadora, tales como la ruptura de las uniones estrechas o la aparición de protusiones de microtúbulos sobre la superficie celular, que terminan por dañar las células del epitelio intestinal.

Con respecto a las protusiones de microtúbulos mencionadas, cabe destacar que se producen porque la actina, de manera natural, impide su crecimiento desmesurado. Sin embargo, debido a la acción de la toxina binaria, se pierde la regulación sobre este aspecto. De hecho, tanto este estudio como el de Buddle y Fagan (39) coinciden en que estas prolongaciones de microtúbulos al exterior celular facilitan la adherencia de *C. difficile* durante su infección. Finalmente, la toxina binaria también es capaz de favorecer la activación de la vía de NF- κ B, lo cual puede favorecer la respuesta inflamatoria en el hospedador en conjunto a la acción de las toxinas A y B (39).

La regulación de esta toxina ocurre de manera diferente a las toxinas A y B. Se encuentra en un locus genético distinto, denominado CdtLoc, el cual contiene el propio gen de la toxina y el gen *cdtR*, un regulador positivo tanto de esta toxina como de las toxinas A y B. Se han descrito algunos casos en los que la presencia de la toxina binaria, pero sin las toxinas A y B, ha sido suficiente para desencadenar síntomas en el organismo infectado, aunque no suele ser el escenario más común (39).

Motilidad y adherencia

Con respecto a la adherencia de la bacteria, esta está facilitada gracias a la acción de las adhesinas. Estas proteínas se encuentran tanto en las esporas como en las células vegetativas de *C. difficile*. Son cruciales en la colonización intestinal, favoreciendo la unión y la internalización de la spora al epitelio intestinal (41). Algunas de las proteínas que destaca el trabajo de Monaghan *et al.* (41) como encargadas de la adhesión son la CotE o la BclA1.

Otras proteínas que también participan en la adhesión de la bacteria son las proteínas de superficie o S-layer. En el caso de *C. difficile*, el gen *slpA* codifica para dos proteínas S-layer, una de alto y otra de bajo peso molecular. Adicionalmente, también contienen las proteínas FliC y FliD, involucradas en el anclaje a la pared epitelial y por lo tanto involucradas en la adhesión (41).

Finalmente, destacar en cuanto a la motilidad que *C. difficile* es una bacteria con flagelos, pero su expresión es variable en función de la fase del ciclo de vida. Una vez presentes, facilitan la motilidad y la producción de toxinas (41). Estos flagelos también pueden ser reconocidos por el sistema inmune innato del hospedador, desencadenando respuesta inmune y por lo tanto suponiendo un factor de virulencia de la bacteria (42).

El papel de los flagelos de *C. difficile* es detallado extensamente en el trabajo de Marvaud *et al.* (42), resaltando 4 funciones principales:

- Motilidad hacia nutrientes: Teoriza sobre la posibilidad de presentar quimiotaxis hacia los nutrientes con ayuda de los flagelos debido a la presencia de genes y operones relacionados con la quimiotaxis. Sin embargo, resalta que la motilidad de *C. difficile* en diferentes medios no ha sido un tema de profundo estudio por lo general.
- Adherencia a las células hospedadoras: Existen todo tipo de estudios que se contradicen en cuanto a si los flagelos juegan algún papel en la adhesión al epitelio intestinal. Los autores del citado artículo de revisión una vez analizados los resultados de diversos artículos con argumentos a favor y en contra del papel que juegan los flagelos en la adhesión de la bacteria, llegan a la conclusión de que este depende de la cepa y de sus mecanismos de regulación del locus flagelar.
- Biofilm: Se propone que los flagelos no son necesarios para el establecimiento inicial del biofilm, sin embargo, sí que son necesarios en etapas posteriores del desarrollo del biofilm.
- Inmunomodulación por activación de citoquinas proinflamatorias: A través del receptor TLR5, la flagelina es reconocida como una molécula asociada a patógeno, desencadenando una respuesta inmune. Este receptor se encuentra en la membrana basolateral, y se cree que la toxina binaria es la responsable de permitir que la flagelina pueda penetrar en la célula hospedadora y alcanzar

el receptor. También se cree que la flagelina desencadena respuesta inmune activando el inflamasoma intracelular de NLRC4.

Biofilm

La producción de biofilm por *C. difficile* está relacionada con la patogénesis y persistencia de esta especie (43). Supone un inconveniente a la hora de hacer frente a las bacterias, ya que aumenta la resistencia a los antibióticos mediante diversos mecanismos, incluyendo la barrera física que impide el acceso del antibiótico hasta las bacterias, la aparición de células persistentes o el incremento de mutaciones en el interior de la matriz (43).

El biofilm consiste en una matriz extracelular de sustancias poliméricas que otorgan a las bacterias protección ante la presencia de desinfectantes, antibióticos o carencia de nutrientes (43). Sus principales componentes son proteínas, ADN extracelular y polisacáridos y se cree que o bien puede formar biofilms aislados del resto de especies, o biofilms formados por más de una especie (43). Además, en estos biofilms coexisten tanto células vegetativas como células en esporulación y sustancias celulares en suspensión (43). También se pueden encontrar esporas de esta bacteria en los biofilms, facilitando mantener una reserva de esporas que potencialmente pueden propagar la infección (43). Hasta la fecha, la capacidad de *C. difficile* de producir biofilms in vitro está clara, así como en el intestino de especies de mamíferos como ratones o hámsteres (43). Sin embargo, los estudios en los que se describa el desarrollo de *C. difficile* en humanos son reducidos (43). Aun así, se ha logrado identificar ciertos elementos propios de esta bacteria que le permiten desarrollar el biofilm, destacando los pili tipo IV, los flagelos y las proteínas S-layer, todos ellos dependiendo de factores genéticos (43).

Cabe destacar que recientes estudios han demostrado que el biofilm permite a *C. difficile* tener una resistencia mayor a vancomicina y metronidazol, que hasta 2021, eran los dos antibióticos que se utilizaban como primera respuesta ante infecciones de esta bacteria (44).

Debido a que los antibióticos resultan ineficaces para erradicar las bacterias que se encuentran embebidas en el biofilm, se baraja la posibilidad de usar **compuestos antibiofilm**, los cuales pueden impedir su formación evitando la adhesión de las bacterias, deshacer los ya existentes o afectar a la comunicación entre las bacterias. Este método, de momento, ha sido probado con compuestos como la miel de Manuka o la turicina, dando datos prometedores para el tratamiento de biofilms de *C. difficile* (43). Otras propuestas más innovadoras para el tratamiento de biofilms son los bacteriófagos o la terapia fotodinámica (43).

5.1.5. Diagnóstico

El primer indicio que nos hace sospechar de una posible infección por *C. difficile* es el desarrollo de 3 o más heces diarreicas en un periodo de 24 h (salvo en caso que el paciente haya consumido laxantes en las últimas 48 h) (17,29). Ante este escenario, se realiza un ensayo sobre muestras de heces para determinar o bien de toxinas o bien de cepas toxigénicas de *C. difficile* (29). Los métodos más ampliamente utilizados son:

- Cultivo toxigénico (TC): Tradicionalmente ha sido el método más utilizado en los laboratorios. Consiste en el cultivo de *C. difficile* a partir de muestras de heces y el análisis de su capacidad para generar toxinas. Pese a que su sensibilidad es mayor al 95%, requiere un periodo de 3-5 días para obtener un resultado, lo que la hace inviable para diagnóstico rápido. Además, en muchos casos, se le achaca el diagnóstico de falsos positivos.
- Ensayo de neutralización de la citotoxicidad (CNNA) (17)

- Inmunoensayo para la detección de la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH EIA), presente en *Clostridioides difficile*.
- Inmunoensayo para la detección de las toxinas A y B (EIA)
- Test de amplificación de ácidos nucleicos (NAAT): Se realiza una PCR para detectar el ADN correspondiente al gen de las toxinas A o B. No puede distinguir entre presencia o producción de toxina (puede encontrarse codificada en el genoma, pero sin sintetizarse). Es más costoso que los demás, pero presenta una sensibilidad cercana al 100% y es rápida. Comúnmente se detecta el gen de la toxina B (17).

Para aumentar la eficiencia del diagnóstico, se recomienda el uso combinado de algunos de estos métodos antes que la aplicación aislada de uno de ellos (29). Un ejemplo de esto es la combinación de los métodos EIA y GDH, que hasta 2009 fue un protocolo muy empleado, con una sensibilidad de hasta el 60% y especificidad del 97-100% (a partir de este año se empezó a apostar por NAAT). Ambos métodos tienen riesgo de detectar falsos positivos, lo que sobreestima el diagnóstico. Una alternativa a los métodos descritos a considerar es la detección de colitis pseudomembranosa mediante colonoscopia o histopatología (29).

Actualmente, la Sociedad Americana de Enfermedades infecciosas (siglas en inglés IDSA) y la Sociedad Europea de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (ESCMID) recomiendan sus respectivos protocolos para el diagnóstico de infecciones por *C. difficile*. Por un lado, la ESCMID aboga desde 2016 por un protocolo constituido por dos algoritmos (45):

- Un primer algoritmo que comienza con el uso de un test de gran sensibilidad, como puede ser el NAAT o el GDH EIA. En caso de obtener un resultado positivo a partir de este, utilizar un segundo método de mayor especificidad como EIA de las toxinas A y B. En caso de también obtener un resultado positivo de este segundo test, hay alta probabilidad de que haya infección. Sin embargo, si este segundo resultado es negativo, se puede realizar un tercer ensayo para verificar el diagnóstico.
- El segundo algoritmo que propone consiste en comenzar realizando simultáneamente un EIA de las toxinas A y B y un GDH EIA. Si el resultado de ambos test es negativo, es improbable que la infección esté presente, y si el resultado de ambos es positivo, es probable que lo esté. Sin embargo, si el GDH EIA da positivo y el ensayo de las toxinas es negativo, se puede hacer un segundo ensayo como el NAAT o TC para verificar la infección.

Por otro lado, la IDSA actualizó por última vez su recomendación para el diagnóstico de infecciones de *C. difficile* en el año 2018 (22). En este sentido, propuso un único algoritmo en el que deben ser enviadas al laboratorio muestras fecales de pacientes que no se encuentren bajo efectos de laxantes y en determinadas condiciones. Sobre esta muestra puede realizarse, o bien un algoritmo múltiple como el propuesto por la ESCMID o bien únicamente un NAAT, que será el que determine la presencia o ausencia de infección.

5.1.6. Tratamiento

Según la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América y la Sociedad de Epidemiología Sanitaria de América (siglas en inglés IDSA y SHEA, respectivamente) hasta 2021, el tratamiento para la infección por *C. difficile* cuando los síntomas no son graves consistía en la aplicación de vancomicina (31). Sin embargo, esta misma institución sugirió un cambio en el protocolo de tratamiento para proponer, en orden de prioridad, la **fidaxomicina** como primera respuesta (tanto frente a primeras infecciones como infecciones recurrentes), seguida de la vancomicina como primera alternativa y, en caso de que ninguna de las dos se encuentre disponible, usar metronidazol (44,46). La razón por la que IDSA y SHEA

priorizan el tratamiento con fidaxomicina es “debido a los efectos beneficiosos y la seguridad de la fidaxomicina” (46). Esta misma sociedad también argumenta que “La fidaxomicina es un antibiótico altamente activo contra *C. difficile*, en pocas ocasiones se tiene constancia de resistencia frente a fidaxomicina por parte de esta bacteria y tiene actividad limitada frente a otras bacterias comensales entéricas” (46).

Con respecto a las directrices europeas, la Sociedad Europea de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (ESCMID) también emitió en 2021 una actualización del protocolo de tratamiento para *C. difficile*. Esta también antepone la **fidaxomicina** como tratamiento inicial ante infecciones iniciales y primeras recurrentes, así como la vancomicina en caso de no disponibilidad del primero (47). Sin embargo, esta institución ya no señala el metronidazol como un tratamiento recomendado para las infecciones por *C. difficile*, y en caso de segundas recurrencias o posteriores (y primeras recurrencias bajo determinadas condiciones), aconseja el uso de bezlotoxumab en conjunto con antibióticos de cuidado estándar o trasplante de materia fecal (47). Tal y como comentan en el documento de 2021, “las directrices actuales tienen en cuenta el riesgo de infecciones recurrentes como factor que determina la estrategia de tratamiento para cada paciente de manera individual, por encima de la severidad de la enfermedad” (47).

La fidaxomicina es un antibiótico aislado por primera vez en el año 1972 que ha demostrado ser eficaz frente a bacterias Gram positivas, y en especial contra cepas que son resistentes a otros antibióticos (48). El mecanismo de acción de este antibiótico consiste en la interferencia de la síntesis del RNA mediante la inactivación de la RNA polimerasa e impidiéndole reconocer los elementos promotores de la secuencia de DNA molde (48).

Por su parte, el mecanismo de acción de la vancomicina consiste en la unión a ciertos intermediarios del proceso de maduración del peptidoglicano bacteriano, impidiendo la actividad de las proteínas de unión a penicilina para formar un peptidoglicano maduro (49). De esta forma, altera la integridad de la pared celular y deriva en la lisis osmótica de la bacteria (49).

5.2. Resistencia antimicrobiana

5.2.1. Causas

Clostridioides difficile es un patógeno resistente a múltiples antibióticos, clasificado como una amenaza urgente de resistencia antimicrobiana por el Centro Americano de Prevención y Control de Enfermedades (siglas en inglés CDC) (23). Supone una amenaza no solo porque dificulta su propio tratamiento, sino porque también actúa como un reservorio de genes de resistencia a antibióticos que pueden ser intercambiados mediante mecanismos de transferencia génica con otras bacterias patógenas, generando una mayor cantidad de especies resistentes (45). Según el artículo de revisión de Boyanova et al. (31), la resistencia antimicrobiana que presenta *C. difficile* puede ser debida a la presencia de genes de resistencia en el cromosoma bacteriano, transferencia de plásmidos o trasposones que contengan dichos genes, bombas de eflujo y la producción de biofilm.

Algunos de los antibióticos frente a los que *C. difficile* presenta resistencia son las tetraciclinas, los macrólidos, las cefalosporinas, las penicilinas y las fluoroquinolonas, destacando otros frente a los que presenta una mayor ratio de resistencia como la ciprofloxacina, levofloxacina, eritromicina y ácido fusídico (45). Además, tal y como suele ocurrir con las bacterias anaerobias de forma general, *C. difficile* presenta mayor ratio de resistencia frente a antibióticos de primeras generaciones que frente a los de última generación (45). La alta resistencia que esta bacteria presenta a tantos antibióticos dificulta enormemente su tratamiento, requiriendo buscar alternativas para hacerle frente, y fomenta su colonización en el intestino, persistencia y recurrencia (39).

Destaca la especial preocupación por el desarrollo de resistencia frente a los antibióticos comúnmente usados para tratar la infección por la propia bacteria: fidaxomicina y vancomicina, que, aunque no son muchos los casos en los que el tratamiento con estos antibióticos ha fallado, existen y deben tenerse en cuenta (45). El tratamiento con estos antibióticos se encuentra en continuo riesgo debido a que, a causa de la gran adaptabilidad y flexibilidad en el genoma de *C. difficile*, puede ser capaz de desarrollar resistencia a estos en cualquier momento (39). Los patrones de resistencia que presenta *C. difficile* pueden variar drásticamente en función de la cepa predominante en cada región geográfica, así como del grupo poblacional al que infecta (diferencias entre las cepas predominantes entre adultos y menores) (31).

5.2.2. Patrones de resistencia

Es especialmente preocupante las cepas bacterianas de *C. difficile* que presenta resistencia a más de un antibiótico. Siendo que se puede subdividir esta especie en diferentes clados en función de su ribotipo, destacan en resistencia a múltiples antibióticos los clados a los que pertenecen los ribotipos RT027 (mencionado en este trabajo como un ribotipo hipervirulento) y RT017 (36). Esta resistencia a múltiples antibióticos está en parte relacionada con marcadores genéticos localizados en trasposones (36). Un reciente artículo de revisión elaborado por Boyanova et al. (36) recopila trabajos de 6 países diferentes, donde se han detectado aislamientos con resistencia a 5 o 6 antibióticos diferentes de manera simultánea. Destacando de entre estos trabajos el estudio realizado en Canadá, realizado por Karlowsky et al. (50), en el que de 25 aislamientos resistentes a vancomicina, el 72% de estos presentaban resistencias a, al menos, un antibiótico más, pero un 40% eran resistentes a 4 antibióticos más. Otro de los trabajos, realizado en Polonia por Aptekorz et al. (51), toma una muestra de mayor tamaño (215 aislamientos de cepas toxigénicas y no toxigénicas) y detecta que el 23,3% de ellos era quintuple resistente a antibióticos, pero ninguno de ellos siendo los vancomicina, fidaxomicina o metronidazol (los comúnmente utilizados para el tratamiento por *C. difficile*).

La incidencia y severidad de las infecciones por *C. difficile* ha aumentado desde inicios del siglo XXI debido a la proliferación de ribotipos como el mencionado RT027 (52). Estos no solo presentan factores de virulencia como la toxina binaria, ausente en otros ribotipos, sino que también acumulan múltiples resistencias a antibióticos, pudiendo ocasionar brotes de importante gravedad y mortalidad.

5.2.3. Mecanismos moleculares de resistencias antibióticas en *C. difficile*

En este trabajo, se hace una distinción entre los mecanismos moleculares de resistencia a antibióticos a los tres antibióticos más utilizados para el tratamiento de las infecciones por *C. difficile* (fidaxomicina, vancomicina y metronidazol), y otros antibióticos que no suelen usarse para su tratamiento, pero frente a los que también puede ser resistente, pudiendo así favorecer la citada disbiosis en el intestino y facilitar su colonización.

- Son pocos los casos en los que se menciona la resistencia a la **fidaxomicina**, estimados en una media del 0,1% de los aislamientos (36). Es un antibiótico que tiene efecto bactericida sobre *C. difficile* y es de espectro reducido. La resistencia a este antibiótico se produce debido a mutaciones en el gen *rpoB* y *rpoC*, que codifican para subunidades de la RNA polimerasa bacteriana (44). El motivo por el que las mutaciones que otorgan resistencia a fidaxomicina no son muy comunes lo podemos encontrar en el estudio de Kuehne et al., que afirma que las bacterias que contenían esta resistencia presentaban una menor supervivencia y virulencia, con lo cual supondría una desventaja para ellas y no perduraría en las bacterias (53).
- Con respecto a la **vancomicina**, la resistencia a este antibiótico es debida principalmente a la modificación de los sitios de unión del antibiótico en el peptidoglicano (36). En muchas bacterias

destaca la resistencia por el *cluster* de genes *van*, que median la alteración del extremo terminal del peptidoglicano para reducir su afinidad por la vancomicina bajo el control del elemento regulador VanSR (36,54). Este *cluster* de genes suele encontrarse en bacterias de *C. difficile*, sin embargo, cuando se aplica este antibiótico a las muestras, parece no conferirles resistencia, mientras que la clonación de este operón en bacterias como *Enterococcus faecalis* parece funcionar y conferirle resistencia (54).

Otros mecanismos que también propician la resistencia a la vancomicina son la alteración de la vía de la glicosiltransferasa *MurG*, los plásmidos pX18-498, las bombas de eflujo o los biofilm (36). Se tiene constancia de ciertos ribotipos de *C. difficile* que tienen menor susceptibilidad a la vancomicina, tales como el 027 (54).

- El estudio de Boekhoud et al. (55) analiza el caso de la resistencia a **metronidazol**. Comenta que esta resistencia es inestable, inducible y heterogénea, y es más frecuente en las cepas no toxigénicas de esta bacteria. En otros organismos, la resistencia al metronidazol corre a cargo de enzimas como la 5-nitroimidazol reductasa (codificada por los genes *nim*), la piruvato-ferredoxina reductasa o adaptaciones ante estrés oxidativo. No obstante, en el caso de *C. difficile*, la resistencia parece estar codificada por un plásmido denominado pCD-METRO. No se sabe a ciencia cierta el motivo por el que este genera resistencia, porque pese a que contiene en su secuencia un gen truncado similar a los genes *nim*, se cree que este no es el responsable de la resistencia ya que no contiene en su secuencia el dominio catalítico de esta enzima. Además, algunas cepas de *C. difficile* contienen en su genoma la secuencia de genes *nim* y no son resistentes, lo cual indica que este gen no otorga resistencia en la especie. Los autores no alcanzan una conclusión firme, pero comentan que el alto número de copias que este plásmido presenta en las bacterias puede ser uno de los motivos pertenecientes al hipotético proceso multifactorial en el que consiste la resistencia a metronidazol. El trabajo de Wickramage et al. (52) añade que el metronidazol es administrado en su forma inactiva y, dentro de la célula, se transforma en su forma activa por el ambiente reductor y las vías metabólicas dependientes de hierro. Por lo tanto, la modificación de estas condiciones impediría la conversión a la forma activa del antibiótico y favorecería la resistencia al mismo.
- Finalmente, con respecto a otros antibióticos frente a los que es resistente, destacan entre otros las tetraciclinas como la tigeciclina o las rifamicinas como la rifaximina
 - En relación a las tetraciclinas, se estima que el 20% de las muestras de *C. difficile* procedentes de humanos son resistentes a estos antibióticos (44). La resistencia a las tetraciclinas suele deberse a una proteína de protección ribosomal que se encuentra en elementos de tipo trasposón, denominada *tet(M)* (44). Especialmente, para el caso de la tigeciclina, al ser una tetraciclina de gran afinidad por el ribosoma, no suele verse afectada por *tet(M)*, sino que en este caso la responsable de la resistencia sería la tetraciclina destructasa codificada por el gen *Tet(X)*, que se encargaría de inactivar las tetraciclinas (44). Esta última enzima ha sido aislada en muestras de *C. difficile* procedentes tanto de humanos como de animales (44).
 - Las cepas de *C. difficile* resistentes a rifamicinas son frecuentes en el ambiente hospitalario, lo cual supone un riesgo durante el tratamiento de las infecciones (44). Además, de manera natural esta bacteria presenta una probabilidad alta de sufrir mutaciones que la hagan resistente a rifamicinas sin perjudicar su supervivencia (44). Lo que suele causar la resistencia a rifamicinas son mutaciones en el gen de la *rpoB*, alterando la interacción entre el antibiótico y la enzima (54). Sin embargo, los datos que ofrece *C. difficile* no concuerdan con los esperados ante una mutación de este estilo, con lo que no está confirmado que sea este el mecanismo que hace resistente a *C. difficile* ante rifamicinas (54).

5.3. Avances en el desarrollo de nuevas terapias

5.3.1. Tratamientos sin antimicrobianos

Debido a la problemática que supone la adquisición de resistencia a numerosos antibióticos por parte de estos patógenos, han sido desarrollados (y se siguen desarrollando) tratamientos para la infección de *C. difficile* no relacionados con los antibióticos. Un detallado estudio de Bratkovic et al. (56) enumera múltiples alternativas a los antibióticos, entre otras:

- La alternativa más extendida al uso de antibióticos consiste en la **administración de microbios para la modificación de la microbiota**. Se debe tener en cuenta que, incluso cuando los antibióticos son capaces de acabar con las células vegetativas de *C. difficile*, sus esporas son capaces de resistir, pudiendo generar recurrencias de la infección en un ambiente de disbiosis generado por los propios antibióticos (37,57). Aquí juega un papel crucial la recuperación de la microbiota bacteriana intestinal. En este sentido, destaca el **trasplante de microbiota fecal (FMT)**. Consiste en la aplicación de una suspensión de la microbiota fecal de un donante sano en el colon de un paciente para la restauración de su flora intestinal (57). Se puede introducir este trasplante mediante endoscopia, enema o cápsulas liofilizadas o congeladas, y se cree que las bacterias de los filos *Bacteroidetes* y *Firmicutes* presentes en ellas son las responsables de la efectividad del tratamiento (57). Este método presenta cierto escepticismo porque, en las muestras utilizadas para el trasplante, pueden hallarse agentes infecciosos como el virus del VIH o de la Hepatitis, aunque existen métodos de *screening* que permiten detectar algunos de estos patógenos y descartar las muestras que los contengan, pudiendo detectar hasta el SARS-CoV-2 (57,58).

Alternativas al FMT pueden ser productos que contengan microbiota fecal, cuya problemática es menor y que algunos de ellos ya han sido aprobados por agencias reguladoras, tales como Rebyota o SER-109 (56). Otros productos relacionados con la recuperación de la microbiota intestinal son los probióticos, el uso de cepas no toxigénicas de *C. difficile* y el desarrollo de bioterapéuticos microbianos controlados (56).

- Uso de anticuerpos para neutralizar las toxinas: Ya existen anticuerpos monoclonales usándose en clínica para el tratamiento de las infecciones por *C. difficile*, pero además, se está probando el uso de anticuerpos policlonales, fragmentos de anticuerpos y otros aglutinadores alternativos. La mayor parte de estas terapias con antibióticos se centran en la unión a toxinas para evitar la colonización de esta bacteria en el intestino
- Péptidos antibacterianos contra las toxinas: Estos péptidos se encuentran tanto en organismos procariotas como eucariotas y participan en la respuesta inmune innata. La mayoría de estos actúan formando un poro en la envoltura bacteriana, despolarizando la membrana y conduciendo a la muerte celular. Para el caso de *C. difficile*, estos péptidos actúan sobre las toxinas de manera no específica y evitando su acción sobre las células epiteliales del intestino. Algunos ejemplos de estos péptidos son las defensinas o la catelicidina
- Neutralización de los antibióticos en el colon: Se trabaja con fórmulas que permiten la inactivación local de antibióticos en el intestino para evitar un exceso del fármaco activo que pueda generar un ambiente propicio para el desarrollo de *C. difficile*. Algunos ejemplos de este tratamiento son el DAV132, que se encuentra en fase III de ensayos clínicos, o enzimas capaces de degradar el antibiótico, como el fármaco Ribaxamase.
- Terapia basada en fagos: Este tratamiento ha sido planteado para solventar la actual crisis de resistencia a antibióticos. Tienen un espectro reducido de actividad que podría ser la solución a la disbiosis en la que *C. difficile* prolifera. Además, se requieren dosis menores que de un fármaco

convencional. Sin embargo, hasta la fecha, no se ha hallado ningún fago lítico específico para *C. difficile* y, por el contrario, se ha descubierto integrasas en el genoma de estos fagos, lo cual favorecería un ciclo lisogénico y reduciría la eficacia. Otras alternativas que usan fagos son las endolisinas de fagos o partículas similares a la cola de fagos.

5.3.2. Nuevas dianas terapéuticas

En estos momentos, los esfuerzos en el tratamiento de la infección de *C. difficile* se centran en hallar nuevas dianas para la obtención de antibióticos, así como nuevas dianas inmunogénicas frente a las que poder generar vacunas y dianas relacionadas con el hospedador.

En primer lugar, las nuevas dianas para antibióticos resultan principalmente de estudios bioinformáticos sobre el genoma de la especie, lo que permite descubrir nuevos elementos bacterianos contra los que se pueden diseñar antibióticos. El análisis pangenómico e interactómico elaborado por Golchha et al. (59), centrándose en aquellos genes comunes a todas las cepas de *C. difficile*, anotó 8 posibles dianas proteicas frente a las que se podrían desarrollar antibióticos, de las cuales 3 ya se tenían en consideración como dianas para otros patógenos y existen antibióticos contra ellas, y las otras 5 son nuevas dianas descubiertas, destacando algunas como la DAHP sintasa, la HisC o la SpoOA. Uno de los posibles antibióticos que podría utilizarse para el tratamiento contra *C. difficile* es el Ridinilazol. Es uno de los antibióticos que se encuentra en ensayos clínicos, siendo capaz de demostrar una alta actividad contra numerosas cepas de *C. difficile* (incluido el problemático ribotipo 027) en modelos in vivo, in vitro y modelos intestinales (60). Su mecanismo de acción consiste en la inhibición de la formación del septo durante la división celular, reduciendo la cantidad de toxina producida y, en consecuencia, la inflamación intestinal en el hospedador (60).

En segundo lugar, con respecto a las vacunas, numerosos estudios recurren al estudio, predicción e identificación de proteínas que podrían desarrollar una respuesta inmune al ser administradas en forma de vacunas, de tal manera que generen en el organismo los mecanismos de defensa necesarios ante una infección por esta bacteria. Ya existen vacunas que se encuentran en ensayos clínicos, tales como CDIFFENSE, basada en las toxinas A y B inactivadas, o VLE 84, que contiene una fusión de las mismas toxinas (61). El trabajo de Noori Goodarzi et al. (61) propone usar proteínas de superficie, así como proteínas de secreción, como agentes inmunogénicos, ofreciendo la posibilidad de formular una vacuna a partir de una combinación de toxoides de *C. difficile* y proteínas de superficie. Esto podría solucionar parte de la problemática existente, ya que al generar vacunas para las toxinas evitamos el desarrollo de enfermedad, pero permanece el riesgo ante colonización por esta bacteria y diseminación de sus esporas. En particular, proponen una vacuna que combine tanto los toxoides de las toxinas A y B junto a alguna proteína de superficie como Acd.

En tercer lugar, el trabajo de Monaghan et al. (41) propone la terapia dirigida al hospedador como una interesante alternativa para tratar las infecciones por *C. difficile*. En vez de centrarse en atacar estructuras propias de la bacteria para paliar la infección, se podrían alterar ciertos mecanismos propios del hospedador para evitar la enfermedad. En este sentido, destacan estrategias como bloquear el receptor de VEGF-A (factor de crecimiento vascular endotelial), una molécula que ha demostrado intervenir en la patogénesis de *C. difficile*; sobreexpresar ciertas proteínas que se ven afectadas durante la infección como el transportador iónico de membrana NHE3 o la proteína DRA mediante ácido lisofosfatídico y el probiótico *L. acidophilus*, respectivamente.

6. CONCLUSIONES

- *Clostridioides difficile* es un bacilo anaeróbico Gram-positivo, formador de esporas, toxinas y biofilm. Es capaz de generar infecciones de diversos tipos, incluyendo asintomáticas y recurrentes, abarcando un rango de manifestaciones clínicas desde diarrea leve hasta colon megatóxica, con consecuencias potencialmente letales.
- Los protocolos de diagnóstico vienen determinados por organismos reguladores a nivel europeo o americano. Los principales métodos usados son el test de amplificación de ácidos nucleicos, el inmunoensayo para la detección de la glutamato deshidrogenasa o de las toxinas A y B.
- La microbiota intestinal juega un papel esencial en la defensa frente a la colonización por *C. difficile* en el organismo, actuando como barrera protectora del intestino para evitar la proliferación de este patógeno. Algunos de los mecanismos propios de la microbiota comensal que evitan la colonización son la regulación del pH intestinal, la producción de bacteriocinas o la regulación de la producción de ácidos biliares.
- En los últimos años ha ocurrido un incremento significativo de la resistencia antimicrobiana en cepas de este patógeno, incluyendo el auge de cepas multirresistentes. Destacan la resistencia a tetraciclina, ocasionada por los genes *tet(M)* y *tet(X)*, por ser de las más frecuentes; y la resistencia a la vancomicina, causada por el clúster de genes *van* que codifican para proteínas que alteran el peptidoglicano.
- Importantes avances han sido introducidos o se encuentran actualmente en estudios para la mejora del tratamiento de esta infección. Resaltan propuestas de vacunas como CDIFFENSE, antibióticos como Ridinilazol o el trasplante de microbiota fecal como alternativas al tratamiento convencional.

CONCLUSIONS

- *Clostridioides difficile* is a Gram-positive, anaerobic, spore-forming, toxin- and biofilm-producer bacillus. It is capable of generating infections of various types, including asymptomatic and recurrent, covering a range of clinical manifestations from mild diarrhea to megatoxic colon, with potentially lethal consequences.
- Diagnostic protocols are determined by European or American regulatory bodies. The main methods used are the nucleic acid amplification test, the immunoassay for the detection of glutamate dehydrogenase or toxins A and B.
- The intestinal microbiota plays an essential role in the defense against colonization by *C. difficile* in the organism, acting as a protective barrier in the intestine to prevent the proliferation of this pathogen. Some of the mechanisms of the commensal microbiota that prevent colonization are the regulation of intestinal pH, the production of bacteriocins or the regulation of bile acid production.
- In recent years, there has been a significant increase in antimicrobial resistance in strains of this pathogen, including the rise of multiresistant strains. Resistance to tetracycline, caused by the *tet(M)* and *tet(X)* genes, stand out as the most frequent; and resistance to vancomycin, caused by the cluster of *van* genes coding for proteins that alter peptidoglycan.
- Important advances have been introduced or are currently under study to improve the treatment of this infection. Vaccines such as CDIFFENSE, antibiotics such as Ridinilazole or fecal microbiota transplantation as alternatives to conventional treatment stand out.

BIBLIOGRAFÍA

1. Curry S. *Clostridium difficile*. Vol. 30, Clinics in Laboratory Medicine. 2010. p. 329–42.
2. Hall IC, O'Toole E. Intestinal flora in new-born infants with a description of a new pathogenic anaerobe: *Bacillus difficilis*. Arch Surg. 1935;133(7):783.
3. Kelly CP, LaMont JT. *Clostridium difficile*--more difficult than ever [published correction appears in N Engl J Med. 2010 Oct 14;363(16):1585]. N Engl J Med. 2008;359(18):1932-1940. doi:10.1056/NEJMra0707500
4. Bartlett JG, Moon N, Chang TW, Taylor N, Onderdonk AB. Role of *Clostridium difficile* in antibiotic-associated pseudomembranous colitis. Gastroenterology [Internet]. 1978;75(5):778–82. Available from: [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(78\)90457-2](https://doi.org/10.1016/0016-5085(78)90457-2)
5. Lawson PA, Rainey FA. Proposal to restrict the genus *Clostridium prazmowski* to *Clostridium butyricum* and related species. Int J Syst Evol Microbiol. 2016;66(2):1009–16.
6. The Lancet Infectious Diseases. *C difficile*—a rose by any other name.... Lancet Infect Dis [Internet]. 2019;19(5):449. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(19\)30177-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30177-X)
7. Lawson PA, Citron DM, Tyrrell KL, Finegold SM. Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O'Toole 1935) Prévot 1938. Anaerobe. 2016;40:95–9.
8. Oren A, Garrity GM. List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. Int J Syst Evol Microbiol. 2016;66(9):3761–4.
9. Marshall A, McGrath JW, Graham R, McMullan G. Food for thought-The link between *Clostridioides difficile* metabolism and pathogenesis. Vol. 19, PLoS Pathogens. Public Library of Science; 2023.
10. Neumann-Schaal M, Jahn D, Schmidt-Hohagen K. Metabolism the difficile way: The key to the success of the pathogen *Clostridioides difficile*. Vol. 10, Frontiers in Microbiology. Frontiers Media S.A.; 2019.
11. Kamiya S. Microbial ecology between *Clostridioides difficile* and gut microbiota. Vol. 42, Bioscience of Microbiota, Food and Health. BMFH Press; 2023. p. 229–35.
12. Arroyo LG, Rousseau J, Willey BM, Low DE, Staempfli H, McGeer A, et al. Use of a selective enrichment broth to recover *Clostridium difficile* from stool swabs stored under different conditions. J Clin Microbiol. 2005 Oct;43(10):5341–3.
13. Wren M. *Clostridium difficile* isolation and culture techniques. Methods Mol Biol. 2010;646:39–52.
14. Marler LM, Siders JA, Wolters LC, Pettigrew Y, Skitt BL, Allen SD. Comparison of Five Cultural Procedures for Isolation of *Clostridium difficile* from Stools [Internet]. Vol. 30, JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. 1992. Available from: <https://journals.asm.org/journal/jcm>
15. Al Saif N, Brazier JS. The distribution of *Clostridium difficile* in the environment of South Wales. J Med Microbiol. 1996;45(2):133–7.
16. Rodriguez Diaz C, Seyboldt C, Rupnik M. Non-human *C. difficile* reservoirs and sources: Animals, food, environment. Adv Exp Med Biol. 2018;1050:227–43.
17. Abad CLR, Safdar N. A Review of *Clostridioides difficile* Infection and Antibiotic-Associated Diarrhea. Gastroenterol Clin North Am [Internet]. 2021;50(2):323–40. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2021.02.010>
18. Groschel DHM. *Clostridium difficile* Infection. 1996;33(3):203–45.
19. Hafiz S. *Clostridium difficile* and its toxins. 1974.
20. Couturier J, Davies K, Barbut F. Ribotypes and New Virulent Strains Across Europe. Adv Exp Med Biol. 2024;1435:151–68.
21. Marra AR, Perencevich EN, Nelson RE, Samore M, Khader K, Chiang HY, et al. Incidence and Outcomes Associated with *Clostridium difficile* Infections: A Systematic Review and Meta-analysis. JAMA Netw Open. 2020;3(1):1–19.
22. Guery B, Galperine T, Barbut F. *Clostridioides difficile*: Diagnosis and treatments. BMJ. 2019;366.
23. Bauer MP, Notermans DW, Van Benthem BH, Brazier JS, Wilcox MH, Rupnik M, et al. *Clostridium*

- difficile* infection in Europe: A hospital-based survey. Lancet [Internet]. 2011;377(9759):63–73. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61266-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61266-4)
24. Stoian M, Andone A, Boeriu A, Bândilă SR, Dobru D, Laszlo S Ștefan, et al. COVID-19 and *Clostridioides difficile* Coinfection Analysis in the Intensive Care Unit. Antibiotics. 2024;13(4):1–13.
 25. Spigaglia P. *Clostridioides difficile* infection (CDI) during the COVID-19 pandemic. Anaerobe [Internet]. 2022;74:102518. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2022.102518>
 26. Furuya-Kanamori L, Marquess J, Yakob L, Riley T V., Paterson DL, Foster NF, et al. Asymptomatic *Clostridium difficile* colonization: Epidemiology and clinical implications. BMC Infect Dis. 2015;15(1).
 27. Ozaki E, Kato H, Kita H, Karasawa T, Maegawa T, Koino Y, et al. *Clostridium difficile* colonization in healthy adults: Transient colonization and correlation with enterococcal colonization. J Med Microbiol. 2004;53(2):167–72.
 28. Clabots CR, Johnson S, Olson MM, Peterson LR, Gerding DN. Acquisition of *Clostridium difficile* by hospitalized patients: Evidence for colonized new admissions as a source of infection. J Infect Dis. 1992;166(3):561–7.
 29. Lee HS, Plechot K, Gohil S, Le J. *Clostridium difficile*: Diagnosis and the Consequence of Over Diagnosis. Infect Dis Ther [Internet]. 2021;10(2):687–97. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40121-021-00417-7>
 30. Seekatz AM, Safdar N, Khanna S. The role of the gut microbiome in colonization resistance and recurrent *Clostridioides difficile* infection. Ther Adv Vaccines. 2022;9(6):259–61.
 31. Jarmo O, Veli-Jukka A, Eero M. Treatment of *Clostridioides (Clostridium) difficile* infection. Ann Med [Internet]. 2020;52(1–2):12–20. Available from: <https://doi.org/10.1080/07853890.2019.1701703>
 32. Finn E, Andersson FL, Madin-Warburton M. Burden of *Clostridioides difficile* infection (CDI) - a systematic review of the epidemiology of primary and recurrent CDI. BMC Infect Dis. 2021;21(1):1–11.
 33. Mori N. *Clostridioides Difficile* Infection. IRYO - Japanese J Natl Med Serv. 2021;75(3):270–3.
 34. Shin JH, Chaves-Olarte E, Warren CA. *Clostridium difficile* infection. Emerg Infect Dis. 2016;22(1):94–104.
 35. About *C. diff* [Internet]. U.S. Centers for Disease Control and Prevention. 2024. Available from: <https://www.cdc.gov/c-diff/about/>
 36. Boyanova L, Dimitrov G, Gergova R, Hadzhiyski P, Markovska R. *Clostridioides difficile* resistance to antibiotics, including post-COVID-19 data. Expert Rev Clin Pharmacol [Internet]. 2023;16(10):925–38. Available from: <https://doi.org/10.1080/17512433.2023.2252331>
 37. Yakout A, Bi Y, Harris DM. *Clostridioides Difficile*: A Concise Review of Best Practices and Updates. J Prim Care Community Heal. 2024;15:4–11.
 38. Semon AK, Keenan O, Zackular JP. *Clostridioides difficile* and the microbiota early in life. J Pediatric Infect Dis Soc. 2021;10(Suppl 3):S3–7.
 39. Buddle JE, Fagan RP. Pathogenicity and virulence of *Clostridioides difficile*. Vol. 14, Virulence. Taylor and Francis Ltd.; 2023.
 40. Kordus SL, Thomas AK, Lacy DB. *Clostridioides difficile* toxins: mechanisms of action and antitoxin therapeutics. Nat Rev Microbiol. 2022;20(5):285–98.
 41. Monaghan TM, Seekatz AM, Mullish BH, Moore-Gillon CCER, Dawson LF, Ahmed A, et al. *Clostridioides difficile*: innovations in target discovery and potential for therapeutic success. Expert Opin Ther Targets [Internet]. 2021;25(11):949–63. Available from: <https://doi.org/10.1080/14728222.2021.2008907>
 42. Marvaud JC, Bouttier S, Saunier J, Kansau I. *Clostridioides difficile* Flagella. Int J Mol Sci. 2024;25(4):1–14.
 43. Vuotto C, Donelli G, Buckley A, Chilton C. *Clostridium difficile* biofilm. Adv Exp Med Biol. 2018;1050(Cdi):97–115.
 44. Dureja C, Olaitan AO, Hurdle JG. Mechanisms and impact of antimicrobial resistance in

- Clostridioides difficile*. Curr Opin Microbiol [Internet]. 2022;66:63–72. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2022.01.004>
45. Crobach MJT, Planche T, Eckert C, Barbut F, Terveer EM, Dekkers OM, et al. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the diagnostic guidance document for *Clostridium difficile* infection. Clin Microbiol Infect [Internet]. 2016;22:S63–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2016.03.010>
 46. Johnson S, Laverigne V, Skinner AM, Gonzales-luna AJ, Garey KW, Kelly CP, et al. Clinical Practice Guideline by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA): 2021 Focused Update Guidelines on Management of *Clostridioides difficile* Infection in Adults. 2021;73:1029–44.
 47. Prehn J Van, Reigadas E, Vogelzang EH, Bouza E, Hristea A, Guery B, et al. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases : 2021 update on the treatment guidance document for *Clostridioides difficile* infection in adults. 2021;27.
 48. Dorst A, Jung E, Gademann K. Recent Advances in Mode of Action and Biosynthesis Studies of the Clinically Used Antibiotic Fidaxomicin. 2020;74(4):270–3.
 49. Stogios PJ, Savchenko A. Molecular mechanisms of vancomycin resistance. Protein Sci. 2020;29(3):654–69.
 50. Karlowsky JA, Adam HJ, Baxter MR, Dutka CW, Nichol KA, Laing NM, et al. Antimicrobial susceptibility of *Clostridioides difficile* isolated from diarrhoeal stool specimens of Canadian patients: Summary of results from the Canadian *Clostridioides difficile* (CAN-DIFF) surveillance study from 2013 to 2017. J Antimicrob Chemother. 2020;75(7):1824–32.
 51. Aptekorz M, Sacha K, Gofron Z, Kabała M, Harmanus C, Kuijper E, et al. Antibiotic Resistance Profile of RT 027 / 176 Versus Other. Pathogens. 2022;11(8):949.
 52. Wickramage I, Spigaglia P, Sun X. Mechanisms of antibiotic resistance of *Clostridioides difficile*. J Antimicrob Chemother. 2021;76(12):3077–90.
 53. Kuehne SA, Dempster AW, Collery MM, Joshi N, Jowett J, Kelly ML, et al. Characterization of the impact of *rpoB* mutations on the in vitro and in vivo competitive fitness of *Clostridium difficile* and susceptibility to fidaxomicin. J Antimicrob Chemother. 2018;73(4):973–80.
 54. O’Grady K, Knight DR, Riley T V. Antimicrobial resistance in *Clostridioides difficile*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis [Internet]. 2021;40(12):2459–78. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10096-021-04311-5>
 55. Boekhoud IM, Hornung BVH, Sevilla E, Harmanus C, Bos-Sanders IMJG, Terveer EM, et al. Plasmid-mediated metronidazole resistance in *Clostridioides difficile*. Nat Commun [Internet]. 2020;11(1):1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-14382-1>
 56. Bratković T, Zahirović A, Bizjak M, Rupnik M, Berlec A. New treatment approaches for *Clostridioides difficile* infections: alternatives to antibiotics and fecal microbiota transplantation. Gut Microbes [Internet]. 2024;16(1). Available from: <https://doi.org/10.1080/19490976.2024.2337312>
 57. Darkoh C, Deaton M, Dupont HL. Nonantimicrobial drug targets for *Clostridium difficile* infections. Future Microbiol. 2017;12(11):975–85.
 58. Khanna S. Advances in *Clostridioides difficile* therapeutics. Expert Rev Anti Infect Ther [Internet]. 2021;19(9):1067–70. Available from: <https://doi.org/10.1080/14787210.2021.1874919>
 59. Golchha NC, Nighojkar A, Nighojkar S. Redefining genomic view of *Clostridioides difficile* through pangenome analysis and identification of drug targets from its core genome. Drug Target Insights. 2022;16(1):17–24.
 60. Collins DA, Riley T V. Ridinilazole: a novel, narrow-spectrum antimicrobial agent targeting *Clostridium (Clostridioides) difficile*. Lett Appl Microbiol. 2022;75(3):526–36.
 61. Noori Goodarzi N, Fereshteh S, Azizi O, Rahimi H, Bolourchi N, Badmasti F. Subtractive genomic approach toward introduction of novel immunogenic targets against *Clostridioides difficile*: Thinking out of the box. Microb Pathog. 2022;162.