

**INFECCIÓN POR *CLOSTRIDIUM DIFFICILE*: INMUNOPATOGÉNESIS Y
DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE UNA INFECCIÓN INTRAHOSPITALARIA
EMERGENTE**

Trabajo Final de Grado
de la alumna



Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.

Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.

Pergamino,.....

**INFECCIÓN POR *CLOSTRIDIUM DIFFICILE*: INMUNOPATOGENESIS Y
DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE UNA INFECCIÓN INTRAHOSPITALARIA
EMERGENTE**

Trabajo Final de Grado
de la alumna

JOSEFINA CELANO

Aprobada por el Tribunal Evaluador

(Nombre y Apellido)
Evaluador

(Nombre y Apellido)
Evaluador

(Nombre y Apellido)
Evaluador

Virginia Pasquinelli
Director

**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales,
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires**

Pergamino,.....

Agradecimientos

A Vir, por permitirme realizar la tesis en Inmunología, rama de la Ciencia que más me gusta, por el aprendizaje de todos los días, por seguir apoyándome después de cada “Me la mandé!”; a Anyi, Lupe, Martín y Rodri, que hicieron más divertidos aún los días de laboratorio y sobre todo por la ayuda brindada en todo momento y la paciencia en este último tiempo.

A toda la gente del CIBA: Ale, Dai, Fio, Sofi P, Giani, Na, Leti, Sofi V, Nati, Jose T, Gastón, Moni, Lau A, Lau P, Caro. Por el día a día y por haberme integrado al grupo como una más en tan poco tiempo.

A las chicas del Hospital de Junín, María y Mónica, por la predisposición y el entusiasmo y por la ayuda que me brindaron.

A todas las personas que conocí en la UNNOBA y me acompañaron en este recorrido y lo hicieron sin dudas increíblemente divertido. A Yesi, por enseñarme que todo se logra con esfuerzo y por elegir compartir, no sólo los días de estudio, si no también el día a día. A Estefi, Rami y Ale, por todos los momentos compartidos, las risas, el aguante, el compañerismo, las charlas, los viajes y los momentos que aún nos quedan por compartir! ¡GRACIAS AMIGOS!

A mis amigos de Pergamino que conocí fuera de la facultad. A la China, Debo, Ana, Martín, Hernán y Fede. Por alegrar aún más los últimos dos años en Pergamino, las comidas en la vecindad, por la compañía, por esa distracción tan necesaria después de cada día de estudio.

A mi amiga del alma, Cin, por el apoyo a la distancia y siempre esperar sin reproches mi ida a Chacabuco y haber aguantado mis desapariciones por momentos.

Por último agradecer a mi familia, a mis viejos y a mi hermano. No hubiera sido posible que esté escribiendo esto hoy si no fuera por ellos. Por el sacrificio y el aguante infinito todos estos años, por las charlas y el ánimo brindado siempre, por estar listos para apoyarme en todo momento. A mis abuelos, siempre acompañándome. A Guille, por aguantar mis estados de ánimo, por el aliento a seguir en algún que otro momento de locura aún hasta el día de hoy, por tus palabras, por seguirme a Junín sin dudarlo. Sin dudas transitar este último tiempo juntos hizo todo mucho más fácil y feliz.

¡GRACIAS!

Índice

RESUMEN	8
ABREVIATURAS.....	13
INTRODUCCIÓN	16
Epidemiología	17
Patogénesis.....	22
<i>Diagnóstico</i>	24
<i>Microbiota</i>	29
<i>Factores de virulencia</i>	31
Respuesta inmune frente a la infección por <i>C. difficile</i>	34
<i>Respuesta inmune innata</i>	34
<i>Respuesta inmune adaptativa</i>	38
OBJETIVOS.....	49
MATERIALES Y MÉTODOS.....	52
Colonias aisladas de <i>C. difficile</i> en placa de Agar chocolate cultivadas en anaerobiosis	53
RESULTADOS	64
Diagnóstico molecular de la infección por <i>C. difficile</i>	65
Puesta a punto de PCR para TcdB para el diagnóstico molecular de la CDI.....	65
Comparación de la PCR para TcdB con el kit AmpliVue <i>C. difficile</i> Assay	67
Respuesta inmune innata en respuesta a <i>C. difficile</i>	70
Evaluación de la viabilidad celular luego del estímulo con extractos de <i>C. difficile</i>	70
Expresión de SLAM y TNF- α en monocitos frente a <i>C. difficile</i>	73
Evaluación de la fagocitosis de <i>C. difficile</i> por células THP-1.....	76
Caracterización de la respuesta T: regulación de citoquinas y moléculas coestimuladoras.....	77
Regulación de IFN- γ por <i>C. difficile</i>	77
Co-expresión de IFN- γ e IL-17 en respuesta a <i>C. difficile</i>	81
Regulación de la expresión de ICOS, SLAM y PD-1	83
Regulación de la expresión de ICOS, SLAM y PD-1 en células T productoras de IFN- γ	87
DISCUSIÓN.....	90
CONCLUSIONES	104
BIBLIOGRAFÍA.....	107

RESUMEN

La infección causada por *Clostridium difficile* es una de las principales causas de infecciones nosocomiales. *C. difficile* es una bacteria anaeróbica obligada, gram-positiva, formadora de esporas, es transmitida a través de la vía fecal-oral y la sintomatología clínica va desde la colonización transitoria del intestino hasta la enfermedad fulminante. El aumento de la incidencia y la gravedad de la infección por *C. difficile* (CDI) ha llevado a una carga económica importante en los sistemas de salud debido a los costos asociados con el tratamiento y las estadías prolongadas de los pacientes en el hospital. Además del reciente incremento en la incidencia y gravedad de la enfermedad, la CDI tiene una alta tasa de recidiva clínica. La causa más común de susceptibilidad a la CDI son los antibióticos y la práctica estándar para el tratamiento de la CDI es el uso de antibióticos que producen una disrupción de la flora microbiana, creando un nicho para CDI adicionales.

La CDI se diagnostica por la combinación de síntomas clínicos y una prueba de heces positiva para las toxinas de *C. difficile* o hallazgos endoscópicos o histológicos de colitis pseudomembranosa. Actualmente, el diagnóstico en nuestro país se realiza por Enzimoimmunoensayo (EIA), un test de alta especificidad pero baja sensibilidad. Teniendo en cuenta que:

- el diagnóstico rápido y preciso de la CDI es esencial para el control nosocomial de la CDI.
- existen muy pocos reportes en nuestro país acerca de la incidencia de la CDI y muy pocos reportes a nivel global acerca de la portación asintomática y del impacto de la misma en el desarrollo de la enfermedad.
- el diagnóstico en nuestra región se realiza utilizando un método poco sensible.

Uno de los objetivos del presente trabajo final de grado fue establecer un método de diagnóstico molecular para la detección rápida y sensible de *C. difficile*. En colaboración con personal del Hospital Interzonal de Agudos “Abraham Piñeyro”, se realizó la puesta a punto de una PCR directa de la toxina B para el diagnóstico de la CDI. La especificidad de los resultados se corroboró por comparación con muestras positivas cuyo diagnóstico había sido realizado por EIA. Asimismo, se comparó con un método molecular comercial, AmpliVue de *Quidel*, obteniendo también resultados positivos. En esta primera etapa hemos establecido la puesta a punto de la técnica y su implementación por personal del Hospital Regional de Junín. Los resultados obtenidos nos permiten sentar las bases para la futura validación del método de diagnóstico por PCR directa en un mayor número de muestras y su implementación como método de rutina en los centros de salud de la región.

Por otro lado, el hecho de que la colonización asintomática persista sin ninguna manifestación de la enfermedad aparente sugiere que factores del hospedador como la respuesta inmune y la inflamación podrían tener un rol crítico en el desenlace de la enfermedad. La capacidad de *C. difficile* para causar colitis depende de los factores de virulencia, incluyendo toxinas, y factores de adherencia y su motilidad. Las toxinas A y B estimulan la liberación de citoquinas pro-inflamatorias (por ejemplo, IL-1 β , IFN- γ , TNF- α , IL-8) a partir de células epiteliales y células inmunes residentes de las mucosas, lo que conduce a una destrucción adicional del revestimiento intestinal. Sin embargo, se conoce poco sobre el rol de las células T frente a la infección por *C. difficile*. La desregulación de subpoblaciones de células T está relacionada con la patogénesis del intestino en las enfermedades inflamatorias y en el cáncer.

Así, otro de los objetivos del presente trabajo fue evaluar los mecanismos que median la generación de una respuesta inmune protectora y aquellos que por el contrario podrían llevar a la inmunopatogénesis. Para esto, nos propusimos estudiar la respuesta inmune generada por *C. difficile* en Células Mononucleares de Sangre Periférica (CMSP) de Dadores Sanos (DS) estimuladas con extractos de *C. difficile* inactivados por calor o con formol. Se observó que *C. difficile* regula positivamente la expresión de la molécula coestimuladora SLAM y la producción de TNF- α en monocitos. Asimismo, se observó que las células THP-1 fagocitan a *C. difficile* y que SLAM podría tener una función moduladora en la activación de los monocitos/macrófagos en respuesta a *C. difficile*.

Dado el carácter pro-inflamatorio de la infección por *C. difficile*, decidimos caracterizar la respuesta T y la producción de IFN- γ e IL-17. Los resultados obtenidos demuestran que *C. difficile* lleva a una regulación positiva del IFN- γ , y que más del 70% de las células productoras de citoquinas son doble positivas, productoras de IFN- γ e IL17. Esto podría sugerir una respuesta T Th1 y Th17 frente a la infección por *C. difficile* y una posible plasticidad Th1/Th17.

Las moléculas coestimuladoras son esenciales en la activación T. Para continuar la caracterización de las respuesta T frente a *C. difficile*, se decidió estudiar la regulación de las moléculas coestimuladoras ICOS, SLAM y PD-1. Los resultados mostraron una modesta regulación de la expresión de SLAM y de PD-1 sólo en las células T estimuladas con *C. difficile* inactivado por tratamiento con formol, mientras que la expresión de ICOS no varió, tanto con *C. difficile* inactivado por calor como con el tratamiento con formol. Además, la estimulación con *C. difficile* inactivado con formol indujo un aumento de las

células SLAMF7⁺IFN- γ ⁺ y de las células PD-1⁺IFN- γ ⁺, lo cual podría indicar que la bacteria es capaz de activar a las células T y que estas moléculas coestimuladoras podrían estar implicadas en la regulación del IFN- γ en la respuesta inmune frente a *C. difficile*.

Conocer más sobre la respuesta inmune como también establecer un método de diagnóstico óptimo frente a la infección por *C. difficile* es necesario para prevenir brotes de la enfermedad, alcanzar un tratamiento eficaz y evitar recurrencias de la infección por *C. difficile*.

ABREVIATURAS

BP	Buffer de Permeabilización
CDI	Infección por <i>C. difficile</i>
CDAD	enfermedad asociada a <i>C. difficile</i>
CD Calor	<i>C. difficile</i> inactivada por calor
CDs	células dendríticas
CDT	toxina binaria (conocida como <i>C. difficile</i> transferase
CD Formol	<i>C. difficile</i> inactivada con formol
CMSP	Células mononucleares de sangre periférica
Cwps	Proteínas de la pared celular
DS	Dadores Sanos
EIA	Inmunoensayo enzimático
FMT	Transplante de microbiota fecal
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GDH	Glutamato deshidrogenasa de <i>C. Difficile</i>
HDA	Amplificación dependiente de helicasa
IBD	Enfermedad inflamatoria intestinal
ICOS	Coestimulador inducible
IECs	Células epiteliales intestinales
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
ILCs	Células linfoides innatas
IP	Ioduro de Propidio
LTi	Células inductoras de tejidos linfoides
MIP-1a	Proteína inflamatoria de macrófagos 1a
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina

NK	Células asesinas naturales
PAMPs	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)
PD-1	Receptor de muerte programada-1
PFA	Paraformaldehído
PMA	Forbol 12-miristato 14-acetato
PPVs	Valores predictivos positivos
PRRs	Receptores de Reconocimiento de Patrones
ROS	Especies reactivas del oxígeno
RNS	Especies reactivas del Nitrógeno
SLAM	Moléculas Linfocitaria Activadora de Señales
SLP	Proteínas de la capa S
TcdA	Toxina A de <i>C.difficile</i>
TcdB	Toxina B de <i>C.difficile</i>
TCM	Células T de memoria central
TEM	Células T de memoria efectora
Th	Células T colaboradoras
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral alfa
Treg	Célula T regulatoria

INTRODUCCIÓN

Epidemiología

Clostridium difficile es una bacteria anaeróbica obligada gram-positiva que originalmente fue identificada como parte de la flora de infantes sanos en 1935, descrita como “activamente móvil, varilla de cuerpo pesado con esporas alargadas subterminales o casi terminales”. En ese tiempo, la cepa se denominó *Bacillus difficilis* para reflejar la dificultad experimentada al momento de aislarla y cultivarla. A pesar de estar presente como una bacteria comensal en los recién nacidos, investigadores observaron que podría inducir enfermedad en los animales, probablemente debido a la producción de una toxina secretada. El siguiente trabajo estableció a las toxinas clostridiales de alto peso molecular, la toxina A (TcdA) y la toxina B (TcdB), como los principales factores de virulencia de *C. difficile*. Un rasgo característico de *C. difficile*, que lo distingue de otras especies de la clase Clostridia, es su capacidad de descarboxilar ácido parahidroxifenilacético para producir p-cresol, lo que da a *C. difficile* el olor característico tipo alquitrán u olor a cerdo.⁵

No fue hasta los años setenta que una caracterización detallada de la bacteria, entonces llamada *C. difficile*, reveló su implicancia en la enfermedad humana. Esta enfermedad se conoció ampliamente como enfermedad asociada a *C. difficile* (CDAD); actualmente se prefiere el término infección por *C. difficile* (CDI). A principios del año 2000, se observó un aumento en los casos graves de CDI en Canadá, Estados Unidos y Europa. Ahora se reconoce como la principal causa de diarrea infecciosa asociada a la asistencia sanitaria y está cada vez más relacionada con casos de colitis adquiridos en la comunidad. *C. difficile* se puede encontrar en el tracto intestinal de los seres humanos y

animales, pero sus esporas también son ubicuas en el medio ambiente y pueden aislarse de los alimentos.⁵

El aumento de la incidencia y la gravedad de la infección por *C. difficile* ha llevado a una carga económica importante en los sistemas de salud debido a los costos asociados con el tratamiento y las estadías prolongadas de los pacientes en el hospital.⁶ Se estima que representa más de mil millones de dólares por año sólo en los EE.UU.⁷ Más aún, actualmente es la principal causa de infección nosocomial en Estados Unidos, superando a *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA). Los últimos reportes estiman aproximadamente 453.000 infecciones por *C. difficile* al año con 29.300 muertes relacionadas.⁸

En los últimos 15 años se observaron cambios en la epidemiología de la CDI, lo que llevó a una reevaluación de este patógeno. Esto se debió en gran medida a la aparición en América del Norte en los años 2000 de una cepa "hipervirulenta", NAP1/BI/027, asociada con una mayor morbilidad y mortalidad, que se extendió a otros países y causó brotes a escala mundial.⁶ Aunque la incidencia de la infección por *C. difficile* en Norteamérica y Europa está bien documentada, se sabe poco sobre la propagación de esta enfermedad en América Latina. Quesada-Gómez y colaboradores (2010) describieron, por primera vez, el aislamiento de la cepa 027/BI/NAP-1 de pacientes con CDI en un hospital de Costa Rica. Además de las toxinas A y B, esta cepa produce una toxina binaria (conocida como *C. difficile* transferase (CDT)), producida también por otras cepas (por ejemplo, los ribotipos 078 y 023). La infección causada por estas cepas productoras de la toxina binaria se ha asociado con un aumento de la severidad de la enfermedad y la mortalidad.⁹ La detección de esta cepa

hipervirulenta en un país latinoamericano destaca el problema y la facilidad de diseminación de *C. difficile* en todo el mundo.¹⁰

Sólo se dispone de escasos datos sobre la prevalencia de *C. difficile* como causa de diarrea en la Argentina. Fernández Canigia y colaboradores (2001) encontraron que sólo el 6,5% de los casos (16/245 muestras de pacientes con diarrea), que representan 13 pacientes hospitalizados y 3 pacientes ambulatorios sin hospitalización previa, se asociaron con *C. difficile*. Estos resultados están de acuerdo con otros estudios sobre grupos de riesgo para el desarrollo de CDI, que incluyen edad avanzada, hospitalización, enfermedades subyacentes y terapia antimicrobiana y/o inmunosupresora. En un estudio de un año realizado con pacientes sintomáticos de un hospital general, Legaria e investigadores (2003) observaron una mayor frecuencia de CDI, que se detectó en el 36,8% (32/87) de los pacientes analizados. Nuevamente, se observaron los grupos de riesgo esperados para el desarrollo de la enfermedad. Los principales fármacos utilizados antes del desarrollo de los síntomas fueron clindamicina, ampicilina, amoxicilina o cefalosporinas de tercera generación y esteroides o agentes quimioterapéuticos. Curiosamente, el 15% de los casos de CDI se detectaron en pacientes ambulatorios que presentaban diarrea, destacando el problema de la adquisición comunitaria de *C. difficile*. El aumento de la presión sobre los hospitales para el alta hospitalaria podría ser la causa de la diseminación de la bacteria al aumentar la circulación de cepas en la comunidad. Si bien la colonización de adultos sanos y ambulatorios con *C. difficile* es infrecuente, entre los pacientes hospitalizados, la tasa de colonización aumenta rápidamente de 13% para los pacientes hospitalizados

de 1-2 semanas a 50% para los pacientes hospitalizados por más de 4 semanas.¹¹

C. difficile es transmitida a través de la vía fecal-oral.⁵ El período desde la ingestión de esporas hasta el comienzo de los síntomas es variable, pero típicamente corto. El momento y el desarrollo de la enfermedad clínica dependen de factores microbiológicos, bioquímicos e inmunes presentes en el intestino del paciente. Es importante destacar que la ingestión de esporas no siempre da como resultado una infección sintomática. El resultado clínico después de la adquisición de esporas es variable y va desde la colonización transitoria del intestino hasta la enfermedad fulminante.⁹ Las personas con una respuesta inmune adecuada eliminarán la infección y/o se convertirán en portadores asintomáticos de *C. difficile*.⁵ Estos proporcionan un reservorio potencial para su posterior transmisión, especialmente dentro de una población hospitalaria.⁹ Aunque los portadores aumentan la contaminación ambiental y aumentan el riesgo de transmisión a otros, la colonización asintomática no aumenta el riesgo de CDI; por el contrario, ha sido sugerido que los portadores asintomáticos podrían estar protegidos contra la enfermedad sintomática generando una respuesta inmune exitosa frente a la infección.¹²

Una característica sorprendente de la CDI, además del reciente incremento en la incidencia y gravedad de la enfermedad, es la alta tasa de recidiva clínica. Entre el 20 y el 30% de los pacientes experimentan recurrencia después de su episodio inicial de CDI; estos pacientes tienen un riesgo aún mayor (40%) de una segunda recurrencia. Los que tienen una segunda recidiva tienen más de un 50% de probabilidades de recurrencia, lo que provoca repetidos y prolongados ciclos de antimicrobianos, frecuentes visitas clínicas y

hospitalizaciones, desnutrición y frustración. Aunque una proporción considerable de estos episodios recurrentes se producen después de la re-exposición a antimicrobianos sistémicos, la recurrencia es común, incluso sin una exposición a la bacteria.¹³

Los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) presentan mayor riesgo de desarrollar una infección por *C. difficile*, tienen un peor pronóstico/resolución de la enfermedad, incluyendo tasas más altas de colectomía y muerte; y experimentan mayores tasas de recurrencia. Sin embargo, todavía no está claro si *C. difficile* es una causa o una consecuencia de la IBD. Los pacientes con IBD que presentan CDI tienden a ser más jóvenes, tienen menos exposición previa a los antibióticos, y la mayoría de los casos de CDI en estos pacientes representan infecciones de adquisición ambulatoria.¹⁴

La práctica estándar para el tratamiento de la CDI es el uso de antibióticos que producen una disrupción de la flora microbiana, creando un nicho para CDI adicionales.¹⁵ Los antibióticos actualmente disponibles que se recomiendan para el tratamiento son metronidazol, vancomicina y fidaxomicina. Existen pruebas limitadas que apoyan el uso de probióticos para disminuir la recurrencia de CDI y actualmente no se dispone de una inmunoterapia efectiva. Por otro lado, el trasplante de microbiota fecal (FMT) es un tratamiento altamente efectivo y debe considerarse en pacientes que han tenido > 2 recurrencias, ya que la eficacia de los antibióticos en estos pacientes es ~ 30%.⁵

Aunque se considera una enfermedad nosocomial, la CDI también ha comenzado a surgir en la comunidad y en individuos más jóvenes que carecen

de los factores de riesgo tradicionales, a menudo con mayor incidencia en las mujeres. Al mismo tiempo de esta expansión de CDI en humanos, también ha habido un aumento significativo de la enfermedad animal causada por *C. difficile*; siendo ahora la causa más común de enteritis en los lechones neonatales en los Estados Unidos, y una causa frecuente de diarrea en caballos adultos. Este aumento de la CDI en los animales para el consumo ha llevado a pensar que la infección adquirida en la comunidad podría ser una enfermedad transmitida por los alimentos, aunque esto aún no ha sido estudiado.⁶

En conjunto, los aumentos en la incidencia y la severidad de la enfermedad demuestran un cambio dramático desde el origen de *C. difficile* como un colonizador neonatal benigno a un patógeno generalizado.¹³

Patogénesis

La patogénesis de *C. difficile* puede dividirse en tres etapas después de la interrupción de la microbiota intestinal: 1) contaminación por esporas y su germinación en el tracto digestivo; 2) multiplicación de células vegetativas y colonización intestinal; 3) producción de las dos toxinas TcdA y TcdB, y para algunas cepas una toxina adicional, la toxina binaria, que son responsables de los signos clínicos. Las dos toxinas TcdA y TcdB son potentes enzimas dañinas para los tejidos que median el daño celular, una respuesta inflamatoria y diarrea.

C. difficile forma esporas que son resistentes al calor, oxígeno y desinfectantes comunes, tales como desinfectantes de manos a base de etanol, lo que facilita la propagación. El lumen del colon humano es anóxico, lo que permite que

bacterias anaerobias obligatorias como *C. difficile* sobrevivan y, si las condiciones son adecuadas, proliferen, produzcan toxinas y dañen el epitelio intestinal. Las sustancias que están presentes en el intestino, especialmente los ácidos biliares, inducen la germinación de la espora en una célula vegetativa de replicación activa.

Las esporas una vez ingeridas son capaces de atravesar el ácido gástrico presente en el estómago y germinar en el colon y el ciego (**Figura 1**). Una vez que se produce la germinación, las células vegetativas penetran en la capa de moco y colonizan adhiriéndose a las células epiteliales del colon.⁷ Las exotoxinas TcdA y TcdB alteran las células epiteliales del colon y estimulan la liberación de citoquinas y quemoquinas pro-inflamatorias. Este proceso conduce a una intensa respuesta inflamatoria que provoca una inflamación aguda del intestino grueso. El espectro de la enfermedad clínica va desde diarrea leve hasta megacolon tóxico (intestino groseramente dilatado), perforación colónica y muerte. Tanto las características de la cepa como la respuesta inmune del hospedador influyen en la severidad de la CDI, el riesgo de recurrencia y la mortalidad.⁹

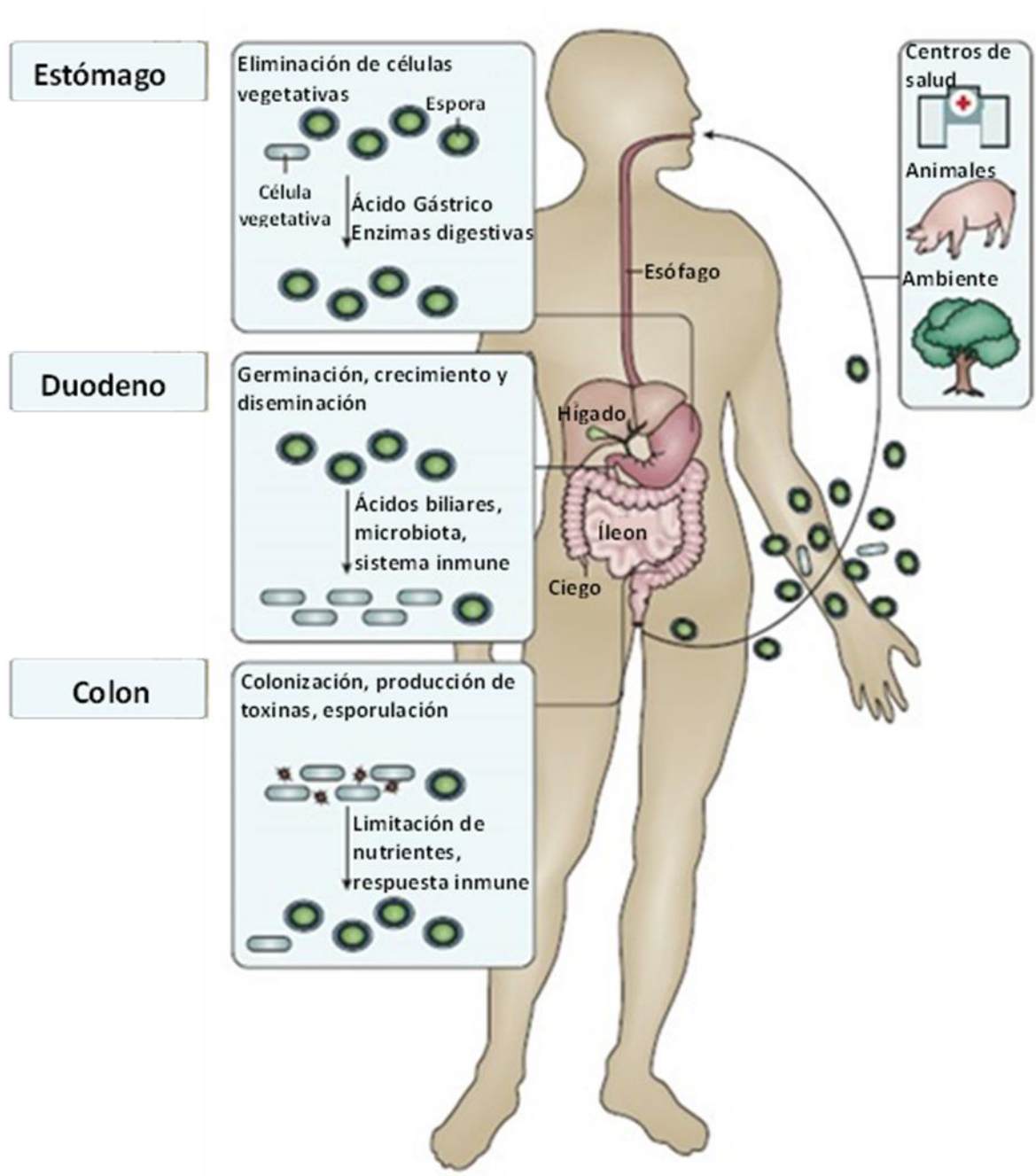


Figura 1. Etapas del ciclo de vida de *C. difficile* en el tracto gastrointestinal.

*Adaptado de Smits, W.K., Lyras, D., Lacy, D.B., Wilcox, M.H. & Kuijper, E.J. *Clostridium difficile* infection. *Nature reviews Disease, primers* 2, 16020, 2016.

Diagnóstico

C. difficile es una especie genéticamente diversa, que incluye cepas patogénicas (productoras de toxinas) y no patógenas. Por lo tanto, las pruebas

de diagnóstico para CDI idealmente debe detectar sólo cepas (o sus toxinas) que tienen el potencial de causar enfermedad.⁹

Las cepas de *C. difficile* pueden diferenciarse mediante una gran variedad de técnicas de tipificación. La falta de una estrategia de tipificación universalmente aceptada ha limitado la comparación de los patrones de cepas entre países que retrasan una comprensión global de la epidemiología de *C. difficile*. Así, la investigación de la CDI se ha complicado por la amplia gama de pruebas diagnósticas disponibles, el uso inconsistente de los estándares de referencia y la falta de acuerdo en los criterios clínicos utilizados para el muestreo.⁹

La CDI se diagnostica por la combinación de síntomas clínicos y una prueba de heces positiva para las toxinas de *C. difficile* o hallazgos endoscópicos o histológicos de colitis pseudomembranosa.¹²

La presentación clínica característica de la infección por *C. difficile* se extiende a través de un amplio espectro desde el estado portador asintomático al megacolon tóxico. Los signos y síntomas típicos de la infección aguda por *C. difficile* incluyen diarrea acuosa (≥ 3 heces no formadas/24 horas), anorexia, náuseas y leucocitosis con predominio neutrofílico.¹⁶

Existe una diversidad de pruebas de detección de *C. difficile* en muestras de materia fecal disponibles, incluyendo PCR para genes de toxina A y B, inmunoensayo enzimático (EIA) para la glutamato deshidrogenasa de *C. difficile* o las toxinas A y B, cultivo anaeróbico selectivo y ensayo de citotoxicidad de cultivos celulares (**Tabla 1**). Esta última prueba fue el modo inicial de detección y sigue siendo el estándar de oro, pero es más laboriosa y dura 2 días.^{6, 12} El cultivo anaeróbico selectivo de *C. difficile* no puede distinguir las cepas productoras de toxinas de las cepas no productoras de

toxinas, requiere de tiempo y mano de obra y quedó reservada para estudios epidemiológicos. El EIA para la glutamato deshidrogenasa (GDH) de *C. difficile*, una enzima producida en todas las cepas de *C. difficile* tiene una sensibilidad del 75% al 90%, pero no puede diferenciar entre las cepas positivas para la toxina de las negativas.¹⁴

La PCR es actualmente el pilar del diagnóstico de la CDI, ya que los resultados pueden obtenerse en una hora, con una sensibilidad mayor que el EIA utilizada anteriormente. Debe tenerse en cuenta que sólo se deben testear heces no formadas, y dentro de las 2 horas después de la recolección, ya que la toxina de *C. difficile* se degrada a temperatura ambiente y puede llegar a ser indetectable; para esto si se prevé el retraso de las pruebas los especímenes deben mantenerse a 4°C.^{12, 14}

Los hallazgos endoscópicos pueden variar desde eritema a colitis pseudomembranosa. La endoscopia rutinaria no se recomienda en pacientes con hallazgos clínicos clásicos y una prueba de heces positiva. Sin embargo, la endoscopia puede ser útil si hay una alta sospecha clínica de CDI con pruebas de heces negativas, si el diagnóstico inmediato de CDI es obligatorio, si no hay mejoría en el tratamiento de la CDI o frente a presentaciones atípicas de CDI.

Tabla 1. Comparación de los diversos métodos de diagnóstico de *C. difficile*.

Test	Sensibilidad	Especificidad	Utilización
Cultivo de <i>C. difficile</i>	Baja	Moderada	No es útil en el entorno clínico. No se puede diferenciar entre <i>C. difficile</i> toxigénico y no toxigénico.
Cultivo toxigénico	Alta	Alta	Estándar de oro en cuanto a sensibilidad y especificidad de otras modalidades de prueba. No es útil en el contexto clínico debido a la

			lentitud del tiempo para obtener resultados.
Ensayo de neutralización de cultivo celular	Alta	Alta	Utilidad diagnóstica limitada por la intensidad del trabajo y el tiempo requerido.
Ensayo de glutamato deshidrogenada (GDH)	Alta	Baja	Alta sensibilidad, pero no puede diferenciar entre cepas toxigénicas y no toxigénicas. Debe utilizarse secuencialmente con las pruebas de confirmación de toxina EIA para la cepa toxigénica.
Inmunoensayo enzimático (EIA)	Baja	Alta	Rápido y específico para cepas toxigénicas. Debe detectar las toxinas A+B. Limitado por la baja sensibilidad. Se utiliza en combinación con GDH.
Ensayo de amplificación de ácido nucleico	Alta	Alta	PCR basada en la prueba del gen de la toxina. Método rápido de diagnóstico preferido en Estados Unidos.

*Adaptado de *Clostridium difficile Infection: A Worldwide Disease*, Kristin E. Burke et al., *Gut and Liver*, Vol. 8, No. 1, January 2014.

Actualmente, el diagnóstico en nuestro país se realiza por EIA, como se mencionó anteriormente, este ensayo presenta baja sensibilidad. El diagnóstico rápido y preciso de la CDI es esencial para el control nosocomial de la CDI; la prevención es siempre menos costosa que el tratamiento y una parte significativa de los programas de prevención depende del diagnóstico rápido. Históricamente, el uso de ensayos de baja sensibilidad como el EIA para las toxinas A/B resulta en el pedido de múltiples tests para el mismo paciente por parte de los médicos lo cual retrasa el diagnóstico e incrementa los costos. Si bien un ensayo molecular podría incrementar los costos de laboratorio, los centros de salud pueden reducir significativamente otros costos mejorando el cuidado de los pacientes. A partir de esto, uno de los objetivos de la presente

tesina es poner a punto un método de diagnóstico molecular para el diagnóstico de infección por *C. difficile*. Se utilizará un ensayo de amplificación de la toxina B de *C. difficile* y se comparará con el método de diagnóstico utilizado actualmente y un kit comercial específico para la detección de ADN de *C. difficile*. A partir de esto, lo que se busca es incorporar un método de diagnóstico rápido y preciso de casos sospechosos de infección por *C. difficile* y prevenir brotes de la enfermedad por un diagnóstico erróneo.

Microbiota

La microbiota es la población de microbios que viven en nuestro cuerpo, superando en número a las células hospedador por un factor de 10. El sistema inmunológico y la microbiota se desarrollan y maduran juntos, comenzando al nacer o incluso en el útero. Esta coexistencia temprana es esencial en la formación de la respuesta del sistema inmune para evitar respuestas inmunes indeseadas a los componentes microbianos intestinales.^{17, 18} Además, tanto la microbiota intestinal como el sistema inmunológico están íntimamente relacionados con otros procesos fisiológicos como el metabolismo y el comportamiento, así como con los sistemas digestivo, respiratorio y nervioso. La interacción entre el sistema inmunológico intestinal, la barrera epitelial y las bacterias que residen dentro, es fundamental para mantener una homeostasis intestinal saludable y así determinar la resolución hacia salud o enfermedad.¹⁸

La microbiota puede promover la resistencia a la colonización por especies patógenas. Pero también, algunas microbiotas pueden conducir a una expansión o a una mayor virulencia patogénica. Un ejemplo claro es cómo las diferencias en la composición de microbiotas de los ratones determinan la susceptibilidad a la infección con *C. rodentium*: el trasplante de microbiotas de cepas de ratones susceptibles a la infección induce una susceptibilidad similar en animales que no susceptibles y el trasplante de microbiotas de animales resistentes llevan a una resistencia a la infección en animales previamente susceptibles.¹⁹ Otro ejemplo es la microbiota intestinal de los pacientes con IBD que presenta una composición diferente a la de los individuos sanos.²⁰ Estos cambios se observan en los microbios anaeróbicos "beneficiosos", como los Bacteroidetes y un subgrupo de los Firmicutes.²⁰ Por lo tanto, es evidente que

se necesitan ciertos microbios intestinales para la regulación de las respuestas inmunitarias y que las perturbaciones en la microbiota podrían dar lugar a una falta de inmunorregulación, a la proliferación de microbios más patógenos y a la promoción de la inflamación, particularmente en individuos genéticamente susceptibles.²⁰

La causa más común de susceptibilidad a la CDI son los antibióticos.¹⁹ Casi todos los antibióticos de amplio espectro han sido implicados en la interrupción del microbioma intestinal, condición que se conoce como disbiosis (**Figura 2**). La disbiosis se caracteriza por una reducida diversidad de microbios, una reducida abundancia de bacterias anaerobias obligatorias y una expansión de bacterias anaerobias facultativas del phylum Proteobacteria, en su mayoría miembros de la Familia Enterobacteriaceae. La disbiosis es el principal factor de riesgo para la infección por *C. difficile* ya que proporciona un ambiente ideal para la bacteria.^{8, 21, 22} Varios componentes de una microbiota saludable contribuyen a prevenir la susceptibilidad del hospedador a la infección y la diseminación de las bacterias patógenas, destacando la importancia de las bacterias comensales para combatir a *C. difficile* y a otros patógenos.^{8, 19}

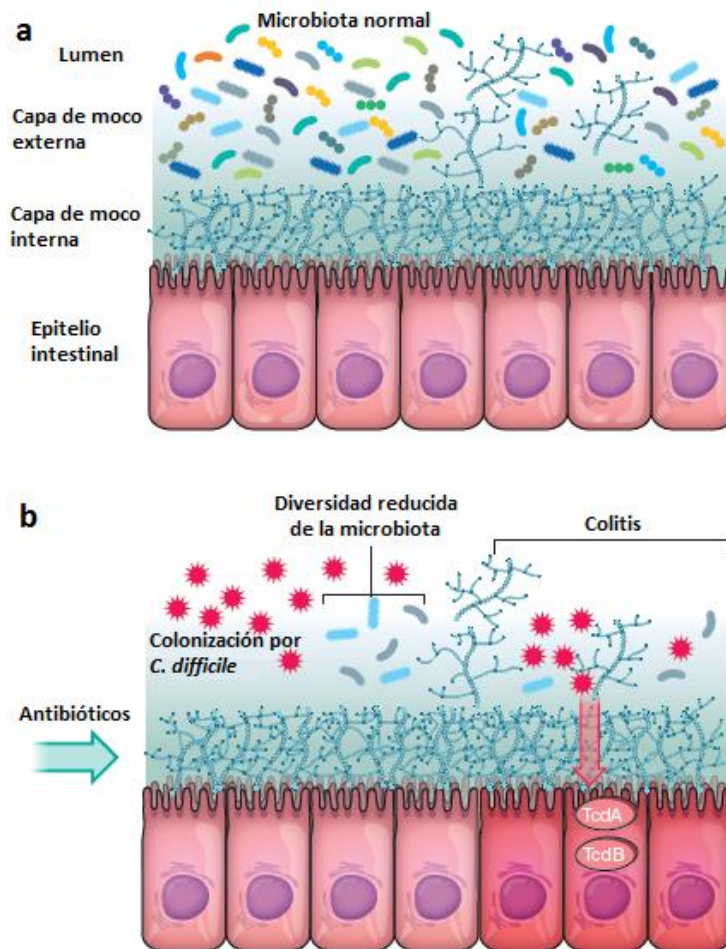


Figura 2. El impacto de los antibióticos en la microbiota y la expansión de *C. difficile*.

a. Una microbiota diversa confiere resistencia a la colonización por patógenos entéricos en el epitelio intestinal.

b. El tratamiento con antibióticos disminuye la diversidad de la microbiota y lleva a una expansión de la población de *C. difficile*. Las toxinas que se liberan a partir de la bacteria (TcdA y TcdB) entran y dañan las células del epitelio, lo cual provoca inflamación (colitis) y muerte celular.

*Adaptado de *Baumler, A.J. & Sperandio, V. Interactions*

between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. Nature 535, 85-93 (2016).

Factores de virulencia

La capacidad de *C. difficile* para causar colitis depende de una gama de factores de virulencia, incluyendo toxinas, y factores de adherencia y motilidad. En respuesta a la disponibilidad limitada de nutrientes, *C. difficile* produce toxinas que atacan principalmente a las células epiteliales intestinales. Después de la endocitosis de la toxina y la activación en el citosol, las células epiteliales experimentan necrosis, lo que conduce a la pérdida de integridad de la membrana intestinal, la exposición a microorganismos intestinales y la activación de la respuesta inflamatoria del hospedador.²³

Los principales factores de virulencia de *C. difficile* son dos toxinas, la toxina A (TcdA) y la toxina B (TcdB). Son codificados por los genes *tcdA* y *tcdB*, respectivamente, que se encuentran dentro de una región conocida como el locus de patogenicidad o PaLoc.⁴

Los principales factores de virulencia de *C. difficile*, las toxinas A y B (TcdA y TcdB), son proteínas de 308 y 270 kDa, respectivamente.⁴ TcdA se designa como una enterotoxina responsable de la acumulación de líquido en el íleon, mientras que TcdB se refiere a una citotoxina con una potencia citotóxica aproximadamente 100 a 1000 veces mayor que TcdA.²⁴ Pertenecen a la familia de grandes toxinas clostridiales y comparten una estructura de dominio ABCD similar.^{4, 24}

Los blancos de la actividad enzimática de TcdA y TcdB son las GTPasas de la familia Ras y Rho dentro de las células del hospedador, las cuales desempeñan papeles claves en procesos celulares vitales incluyendo la adhesión celular y el mantenimiento del citoesqueleto. Esto lleva al redondeo de las células, la interrupción de las uniones estrechas y el deterioro de la función de la barrera intestinal, así como la muerte celular por apoptosis o necrosis. Esta pérdida de función de la barrera del epitelio intestinal conduce a la acumulación de líquido y daño intestinal severo. Las toxinas también estimulan la liberación de citoquinas pro-inflamatorias (por ejemplo, IL-1 β , TNF- α , IL-8) a partir de células epiteliales y células inmunes residentes de las mucosas, lo que provoca un flujo de neutrófilos y conduce a una destrucción adicional del revestimiento intestinal.⁴

La toxina binaria o transferasa de *C. difficile* (CDT) presente en las cepas hipervirulentas BI/NAP1/027 no está codificada por el locus de patogenicidad

PaLoc que codifica a TcdA y TcdB.²³ Estas cepas, tienen además supresiones en un gen regulador del locus de patogenicidad y son resistentes a fluoroquinolonas.²⁵ El papel de la CDT en la virulencia sigue sin probarse, aunque existe una asociación entre su presencia y mayor mortalidad en los pacientes. Esta toxina interfiere con la polimerización de la malla de actina que subyace a la membrana celular, lo que da lugar a protrusiones celulares que se forman por microtúbulos y una liberación aumentada de fibronectina a la superficie celular, mejorando así la adhesión de *C. difficile* a las células diana.²³ Las proteínas de superficie llamadas proteínas de la pared celular (Cwps), que incluyen las proteínas de la capa S (SLP), la adhesina Cwp66 y la cisteína proteasa Cwp84; están implicadas en la adherencia y colonización intestinal. Las respuestas inmunes a los componentes superficiales de *C. difficile* sugieren que estas proteínas podrían tener un papel muy importante en la patogénesis.²⁶

La aparición mundial de cepas epidémicas de *C. difficile*, vinculado a una mayor gravedad y mortalidad de la enfermedad, dio lugar a mayores esfuerzos de investigación para determinar los factores de virulencia y los mecanismos patogénicos utilizados por este microorganismo para causar la enfermedad. Sin embargo, las investigaciones se centran, en su mayoría, en el papel de los dos principales factores de virulencia, TcdA y TcdB.²⁷ La modulación de la respuesta del hospedador podría ser un enfoque más efectivo para los pacientes que no resuelven la enfermedad. Para esto es fundamental identificar los mecanismos que llevan a la generación de una respuesta inmune protectora o inmunopatogénesis.

Respuesta inmune frente a la infección por *C. difficile*

Tres líneas de defensa contrarrestan a *C. difficile*. La primera línea es la barrera epitelial. Después de la colonización por *C. difficile*, esta barrera física es atravesada por las toxinas a través de su actividad de glucosilación de Rho que causa la interrupción de las uniones estrechas y permite que la infección se establezca y se disemine. Luego, sigue una rápida respuesta inmune innata, que constituye la segunda línea de defensa. Los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) son reconocidos por los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) del hospedador. Las interacciones entre PRRs y PAMPs proporcionan respuestas muy rápidas contra *C. difficile*, pero no son específicas y no confieren memoria. *C. difficile* desencadena la inmunidad adaptativa como la tercera línea de defensa necesaria para controlar el proceso infeccioso. La inmunidad adaptativa proporciona una respuesta inmune altamente específica contra *C. difficile* con memoria e inmunidad duradera.²⁶

Respuesta inmune innata

La patogénesis temprana de la CDI (0-12 h) se caracteriza predominantemente por inflamación intestinal aguda mediada por la respuesta inmune innata.²⁸

El primer paso para el hospedador en cuanto a la defensa contra la CDI es prevenir o retrasar la unión de la bacteria o de las toxinas secretadas a las células epiteliales intestinales donde pueden causar daño. Una capa de moco que cubre el epitelio crea una barrera de defensa dinámica contra las bacterias lumenales; sin embargo, muchos patógenos incluyendo *C. difficile* han desarrollado mecanismos para reducir la producción de mucina durante la

infección. Otra defensa en la superficie epitelial es la presencia de péptidos antimicrobianos, defensinas y catelicidinas, secretadas por células especializadas en la cripta intestinal llamadas células de Paneth y por leucocitos. Se ha demostrado que la catelicidina y las defensinas reducen significativamente el daño tisular y la inflamación causados por TcdA y TcdB y reducen la producción de citoquinas inflamatorias.²⁸

Las toxinas inducen la liberación de mediadores inflamatorios de células intestinales epiteliales, neuronales e inmunes a través de la activación de diferentes PRRs incluyendo la señalización a través de TLR4, TLR5 y NOD1 y la activación del inflamasoma.¹⁵ Los actores claves de la inmunidad innata son las células epiteliales intestinales (IECs) y las células inmunitarias intestinales tales como macrófagos, monocitos, mastocitos, células linfoides innatas (ILCs) y células dendríticas (CDs).²⁶

Después de la ruptura de la barrera epitelial intestinal, las células inmunitarias dentro de la mucosa son activadas por TcdA y TcdB, conduciendo finalmente a la liberación de mediadores inflamatorios, incluyendo IL-12, IL-18, IFN- γ , IL-1 β , TNF- α , proteína inflamatoria de macrófagos 1a (MIP-1a), MIP-2, IL-8 y leptina, y lleva, además, a una afluencia de neutrófilos establecida por quimioattractantes liberados por las células epiteliales e inmunes. Estos factores pueden exacerbar la inflamación y ser responsables del daño de las células del hospedador y de muchas de las características histopatológicas de las enfermedades asociadas a *C. difficile*.^{26, 29, 30}

Los mastocitos intestinales también juegan un papel importante en las respuestas inflamatorias mediadas por las toxinas. Ambas toxinas A y B conducen a la activación, degranulación y la liberación de mediadores

inflamatorios de los mastocitos.³⁰ Por ejemplo, TcdA induce la producción de IL-8 por los mastocitos, un quimioattractante de neutrófilos en las líneas celulares de colon humano.²⁶

El papel de otras células inmunitarias, incluyendo macrófagos, monocitos y CDs, se ha extrapolado generalmente a partir de estudios *in vitro* y *ex vivo* usando líneas celulares humanas y de ratón, monocitos humanos y CDs derivadas de monocitos. Estos estudios han demostrado que las toxinas de *C. difficile* pueden estimular la liberación de citoquinas y quemoquinas pro-inflamatorias de estas células de una manera dependiente de MAPK y p38, y la toxina A induce la producción de IL-8 mediada por NFκB a partir de monocitos humanos.¹⁵

A su vez, es importante mencionar que las CDs en la mucosa intestinal desempeñan varias funciones, como la fagocitosis y el procesamiento y presentación de antígenos generando la posterior respuesta inmune adaptativa.²⁶

Los fagocitos mononucleares son una de las poblaciones más abundantes de leucocitos en la mucosa intestinal sana, y los macrófagos son la mayor población de fagocitos. Los macrófagos intestinales contribuirán a la respuesta inmune a través de, no sólo la secreción de citoquinas y quemoquinas, sino también a través de su potencial fagocítico y microbicida y su capacidad de actuar como células presentadoras de antígenos.³¹

Recientemente, *Abt y colaboradores* demostraron que las ILCs de tipo 1 y tipo 3 coordinan las respuestas tempranas del hospedador para proporcionar resistencia inicial contra la CDI (**Figura 3**). Las ILCs son células presentes en

las mucosas que comparten características con células inductoras de tejidos linfoides (LTi) y células asesinas naturales (NK). La función primaria de las ILCs en la mucosa es la secreción de citoquinas importantes para la defensa del hospedador y la reparación de tejidos.²⁶ Dos subgrupos de las ILCs, ILC1 que expresan T-bet y producen IFN- γ , e ILC3 que expresan Ror γ t y producen IL-22, se activan durante la infección aguda por *C. difficile* y contribuyen a la defensa del hospedador. La IL-22 induce la producción de péptidos antimicrobianos en el intestino inmediatamente después de la infección. El IFN- γ producido por las ILC1 puede aumentar los mecanismos fagocíticos y la expresión de las enzimas productoras de ROS y RNS en la mucosa colónica **(Figura 3)**.²³

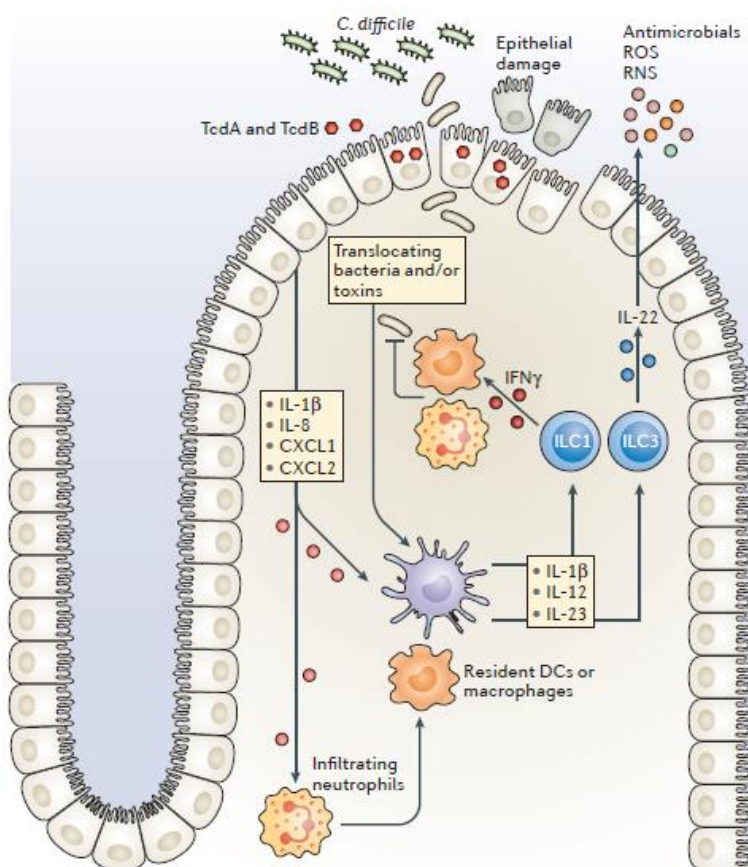


Figura 3. Respuesta inmune innata frente a *C. difficile*. La respuesta del hospedador a *C. difficile* se inicia por el daño mediado por las toxinas, la pérdida de integridad epitelial y la detección de bacterias translocantes. Las células epiteliales intestinales y las células inmunes innatas residentes segregan quemoquinas pro-inflamatorias (CXCL1, CXCL2 e IL-8) y citoquinas proinflamatorias (como IL-1 β , IL-12 e IL-23), que conducen al reclutamiento de neutrófilos y a la activación de células linfoides innatas (ILCs). La señalización de IL-12 impulsa la expresión de IFN- γ , mientras que la señalización de IL-1 β e IL-23 induce la producción de IL-22. Las citoquinas efectoras IFN- γ e IL-22 inducen mecanismos de defensa tales como el aumento de la actividad fagocítica de los macrófagos y neutrófilos, y la producción de péptidos y enzimas antimicrobianas que sintetizan especies reactivas del oxígeno (ROS) y especies reactivas del nitrógeno (RNS). Estos mecanismos de defensa limitan la diseminación bacteriana, atenúan la actividad de la toxina y reparan el daño epitelial.

*Adaptado de Abt, M.C., McKenney, P.T. & Pamer, E.G. *Clostridium difficile* colitis: pathogenesis and host defence. *Nature reviews. Microbiology* 14, 609-620 (2016).

Respuesta inmune adaptativa

Las células epiteliales, los macrófagos y las CD juegan un papel importante en la respuesta inicial a los patógenos de la mucosa. Sin embargo, una interacción

directa de patógenos con estas células no es suficiente para generar una respuesta eficaz de la mucosa.³²

Las CDs activadas promueven una respuesta Th2, que provoca una respuesta inmune adaptativa específica de la mucosa que imprime un programa de migración hacia la mucosa y un cambio del isotipo a IgA en los linfocitos B. La IgA es la inmunoglobulina dominante en las mucosas y juega un papel importante en el mantenimiento de la integridad de la barrera intestinal y en la protección del tejido hospedador de microorganismos patógenos y comensales.⁸

Aunque las células T y las células B no contribuyen a la resolución de la fase aguda de la infección por *C. difficile* en ratones, los datos clínicos indican que las respuestas inmunitarias adaptativas pueden tener efectos protectores. La severidad de la enfermedad está inversamente correlacionada con la presencia de IgA específica de toxina e IgG1.²³ Los anticuerpos contra las toxinas de *C. difficile* están naturalmente presentes en hasta el 60% de adultos sanos y niños mayores.²⁶ Más aún, Kyne y colaboradores encontraron que el riesgo de desarrollar una infección sintomática está, al menos en parte, determinado por la respuesta inmune humoral a las toxinas. Los autores demostraron que aunque entre el 15-31% de los pacientes hospitalizados de alto riesgo fueron colonizados con *C. difficile*, sólo una minoría desarrolló una infección sintomática. Los portadores asintomáticos tenían niveles de anticuerpos IgG contra TcdA en suero significativamente mayores dentro de los 3 días de la colonización que aquellos que desarrollaron diarrea. Por lo tanto, la exposición a *C. difficile* asociado con un aumento de anticuerpos IgG contra TcdA daría lugar a la colonización en lugar de a la infección. La importancia de los

anticuerpos para proteger al hospedador de la CDI también está respaldada por niveles bajos de anticuerpos séricos dirigidos contra las toxinas A y B observadas en pacientes con CDI recurrente en comparación con controles que no sufren recaídas.⁸

Por otra parte, las células T residentes representan un componente principal de la mucosa intestinal y están localizadas entre células epiteliales (linfocitos intraepiteliales) y en la lámina propia. Los linfocitos intraepiteliales son los que probablemente contribuyen a la función barrera y a la integridad del epitelio intestinal.^{31, 32}

Cuadro 1- Respuesta inmune adaptativa- Linajes Th. Las células colaboradoras T CD4 efectoras (Th) se caracterizan por un grado de heterogeneidad funcional, asociado a un perfil diferente de producción de citoquinas, de acuerdo con la naturaleza del microorganismo atacante. Las citoquinas que promueven la polarización de las células Th son en su mayoría derivadas de células inmunes innatas que reconocen PAMPs.³ La diferenciación de los linfocitos T CD4 en células Th1 o Th2 es crítica en el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa. Una respuesta inflamatoria Th1 se caracteriza por la producción de IFN- γ , lo que conduce a la activación de los fagocitos; son reconocidas como las células prominentes en la defensa contra la invasión de patógenos intracelulares. En cambio, una respuesta Th2 da como resultado inmunidad humoral e inflamación alérgica y estimula la resistencia del hospedador a infecciones o agentes extracelulares. Las células Th17 son un linaje de células T CD4 distintas de las células Th1 y Th2, y tienen la capacidad de secretar citoquinas proinflamatorias tales como IL-17A, IL-17F, GM-CSF e IL-22 y juegan un papel importante en la eliminación de patógenos extracelulares y hongos en el intestino. Las células Treg, que también se encuentran en el intestino, son capaces de suprimir las funciones de las células Th1 y Th17, por lo tanto regulan las respuestas inmunes excesivas y establecen la tolerancia. Secretan citoquinas inhibitorias como IL-10, IL-35 y TGF- α .

La desregulación de subpoblaciones de células T (**Ver Cuadro 1**) está relacionada con la patogénesis del intestino en las enfermedades inflamatorias y en el cáncer; y parecen ser las principales responsables de la iniciación y desarrollo de la inflamación en la lámina propia del intestino. Estas respuestas celulares adaptativas desreguladas implican la activación de linfocitos Th1, Th2, Th17 y la supresión de la actividad de las células Treg.^{3,33,34} Por lo tanto, un balance entre la respuesta inmune adaptativa inflamatoria y la respuesta protectora es necesaria para generar un desenlace óptimo de la enfermedad (**Figura 4**).

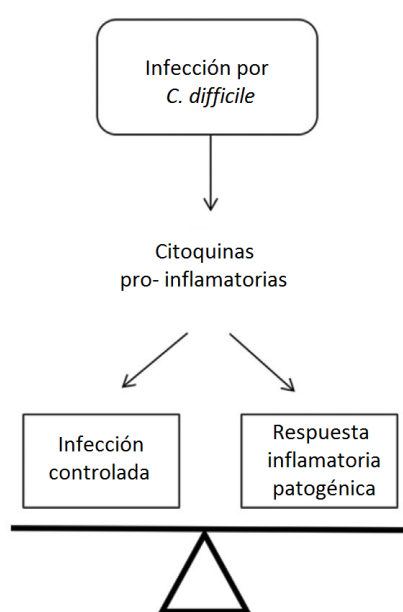


Figura 4. Balance entre una respuesta inmune patogénica frente a una respuesta protectora. Existe un rol patogénico y un rol protector de la respuesta inmune durante la CDI. Una respuesta inmune beneficiosa es aquella que permita controlar la infección limitando el daño que conduce a la patología tisular.

*Adaptado de Buonomo, E.L. & Petri, W.A., Jr. *The microbiota and immune response during Clostridium difficile infection*. *Anaerobe* 41, 79-84 (2016).

Se conoce poco sobre el rol de las células T frente a la infección por *C. difficile*. Darkoh y colaboradores demostraron que durante la infección por *C. difficile*, las CDs estimuladas con antígeno y los macrófagos producen IL-23, que promueve el desarrollo de células Th17, lo que estimula a un aumento de las células T de memoria.³³ Esto da lugar a la inducción y producción de una variedad de mediadores inflamatorios. A su vez, observaron que las

concentraciones de TNF- α e IL-13 en las heces de los pacientes CDI positivos fueron significativamente mayores que en las heces de los pacientes CDI negativos y los pacientes hospitalizados sin diarrea. Los autores proponen que la respuesta observada durante la CDI es compleja y podría involucrar una respuesta mixta Th1/Th2; y que la fuerte respuesta pro-inflamatoria observada en los pacientes abarcaría tanto la rama de la respuesta inmune innata como la adaptativa.³³ Más aún, sugieren una probable respuesta intracelular a las toxinas y una respuesta extracelular a la bacteria.³³

Más aún, *Kim y colaboradores* demostraron en ratones que la expresión de IFN- γ media la mayor severidad de la enfermedad en aquellos ratones deficientes para IL-10 y que el IFN- γ podría ser un importante blanco molecular para el control de la CDI.³⁵ Asimismo, en un estudio reciente se caracterizó el fenotipo de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de individuos con un primer episodio o recurrencia de la CDI; los autores observaron un mayor nivel de IFN- γ en aquellos pacientes que experimentaron recurrencias de la enfermedad, como también de IL-17, indicando una respuesta hacia los linajes Th1 y Th17.³⁶ Sin embargo, poco se ha estudiado hasta el momento sobre la respuesta T frente a CDI en CMSP, ya que los estudios se centran mayoritariamente en modelos murinos.

Ha sido descripto que las células Th17 poseen una alta plasticidad funcional. En un estudio realizado en pacientes con enfermedad de Crohn, se demostró que algunas células Th17 eran capaces de producir IL-17 e IFN- γ . Este proceso parece ser responsable de las diferentes funciones biológicas atribuidas a esta subpoblación de células Th, especialmente en diferentes

condiciones inflamatorias, incluyendo las que afectan al sistema gastrointestinal **(Figura 5).**³⁷

Además del balance entre los distintos perfiles celulares, existen señales estimulatorias e inhibitorias que contribuyen a la regulación de las respuestas inmunes. **(Ver Cuadro 2)** La coestimulación positiva es fundamental para el desarrollo de respuestas de células T inmunes a patógenos, mientras que la regulación negativa es fundamental para la terminación de las respuestas inmunitarias, para la tolerancia periférica, y para evitar la inflamación exacerbada y el daño de los tejidos.

Cuadro 2- Moléculas coestimulatorias. La activación de las células T se determina por la presencia de tres señales distintas: 1) interacción entre el receptor de las células T (TCR)-y el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) de clase I y II de las células presentadoras de antígenos, 2) interacción de moléculas coestimulatorias/coinhibitorias y 3) señalización de citoquinas.¹. El coestimulador inducible (ICOS, CD278), un miembro de la familia CD28, ejerce su función por la interacción entre ICOS y su ligando (ICOSL), el cual se expresa generalmente en diversas células presentadoras de antígeno.

La molécula de muerte programada-1 (PD-1, CD279) es otro receptor de la superficie celular perteneciente a la familia CD28 expresada en una amplia gama de células inmunes. Otra molécula coestimulatoria es la molécula linfocitaria activadora de señales (SLAM, CD150). SLAM es un auto-ligando presente en la superficie de linfocitos T y B activados, macrófagos y CDs.²

La señal relacionada con el coestimulador inducible (ICOS) juega un papel importante en muchos modelos de enfermedad mediada por células T, como la inflamación, las respuestas inmunitarias antivirales, las respuestas inmunitarias antitumorales, y por lo tanto representan un potencial blanco terapéutico.³⁸ Esta vía puede promover la producción de varias citoquinas de las células T incluyendo IL-10, IL-4, IL-5, IFN- γ e IL-17.³⁹ Se ha demostrado que ICOS

regula las funciones efectoras de varias subpoblaciones de células Th en diferentes contextos de infección, en gran medida promoviendo o inhibiendo las respuestas inmunes Th1 y Th2.⁴⁰

ICOS ha sido implicado en la inflamación del colon. Se observa una sobreexpresión de ICOS en pacientes con IBD. En los modelos de transferencia adoptiva de la colitis, el tratamiento de ratones ICOS^{+/+} con anticuerpos anti-ICOS previene el desarrollo de colitis.⁴¹ Más aún, aunque la producción de IL-17 puede proceder en ausencia de la expresión de ICOS, y la IL-17 puede ser producido en ratones ICOS^{-/-}, ha sido demostrado que la patología del colon aumenta como el porcentaje de ICOS y que existe una fuerte correlación positiva entre las células productoras de IL-17 y la expresión de ICOS. A su vez el control de la inflamación por las Treg requiere de la señalización a través de CD28, pero no de la señalización a través de ICOS.⁴¹ Por otro lado, la coestimulación a través de ICOS aumenta la producción IL-5 (una citoquina del perfil Th2) en la colitis ulcerosa, mientras que aumenta la producción IFN- γ (una citoquina del perfil Th1) en la enfermedad de Crohn. Esto sugiere que ICOS desempeña un papel importante en la inflamación intestinal crónica.⁴²

Otra molécula coestimuladora es el receptor de muerte programada-1 (PD-1). La unión de PD-1 a cualquiera de sus dos ligandos, PD-L1 (B7-H1 o CD274) o PD-L2 (B7-DC o CD273), inhibe la activación de células T.

La tolerancia inmune periférica se mantiene por múltiples mecanismos. La activación de las células T, por ejemplo, está regulada por la muerte celular inducida por la activación, la anergia clonal, la coestimulación negativa y la supresión regulada por las células Treg, entre otras.⁴³

En el intestino, PD-1 es un componente esencial del programa que regula la selección de IgA requerida para el mantenimiento de la microbiota. Los defectos en la regulación de IgA por la composición microbiana perturbada y el microambiente intestinal tienen el potencial de aumentar la susceptibilidad autoinmune. La deficiencia de IgA se asocia con una alta incidencia de enfermedades autoinmunes, infecciones gastrointestinales y respiratorias. En varios modelos murinos de enfermedades autoinmunes, el desarrollo de la enfermedad requirió bacterias intestinales y la expansión de subpoblaciones específicas de células Th. Estos hallazgos sugieren que el mantenimiento de la composición y densidad apropiadas de la microbiota por la producción dinámica de IgA en el intestino confiere resistencia contra la autoinmunidad.⁴⁴

La vía de PD-1 tiene un papel central en la regulación de la interacción entre las defensas del hospedador destinadas a erradicar los patógenos microbianos y los tumores, así como en las estrategias microbianas y tumorales que evolucionaron para resistir las respuestas inmunes. En ese sentido, esta vía contribuye directamente al agotamiento de las células T y a la ausencia de control viral durante las infecciones crónicas, así como en el microambiente supresor del tumor.⁴⁵

Sin embargo no existen estudios acerca del rol de PD-1 en la regulación de la respuesta inmune frente a *C. difficile*.

La familia de receptores de la molécula linfocitaria activadora de señales (SLAM) es un grupo de receptores transmembrana de tipo I que incluye SLAM (CD150; SLAMF1), 2B4 (CD244; SLAMF4), Ly-9 (CD229; SLAMF3), antígeno de células T, B y el antígeno de las células NK-T y B (NTB-A) o Ly108 (en el

ratón) (SLAMF6), CD84 (SLAMF5) y el receptor tipo CD2 activador de células citotóxicas (CRACC, CD319 o SLAMF7).⁴⁶

La coestimulación a través de SLAM induce la producción de IFN- γ en clones Th1, y también en poblaciones de células Th2 polarizadas aisladas de pacientes con artritis reumatoidea.² Más importante aún, se detectaron numerosos monocitos, macrófagos y otras células SLAM+ a través del intestino inflamado de pacientes con la enfermedad de Crohn.⁴⁷

Por otro lado, existen evidencias de que los receptores de la familia SLAM actúan como receptores para la entrada de patógenos. Se observó que SLAMF1 y SLAMF6 pueden unirse y permitir la internalización de bacterias Gram-negativas como *Escherichia coli* y *Citrobacter rodentium* en las células de mamíferos, incluidos los macrófagos.⁴⁸ Así, SLAM podría tener un rol tanto en la activación de monocitos y macrófagos; como en la activación de las respuestas adaptativas T.

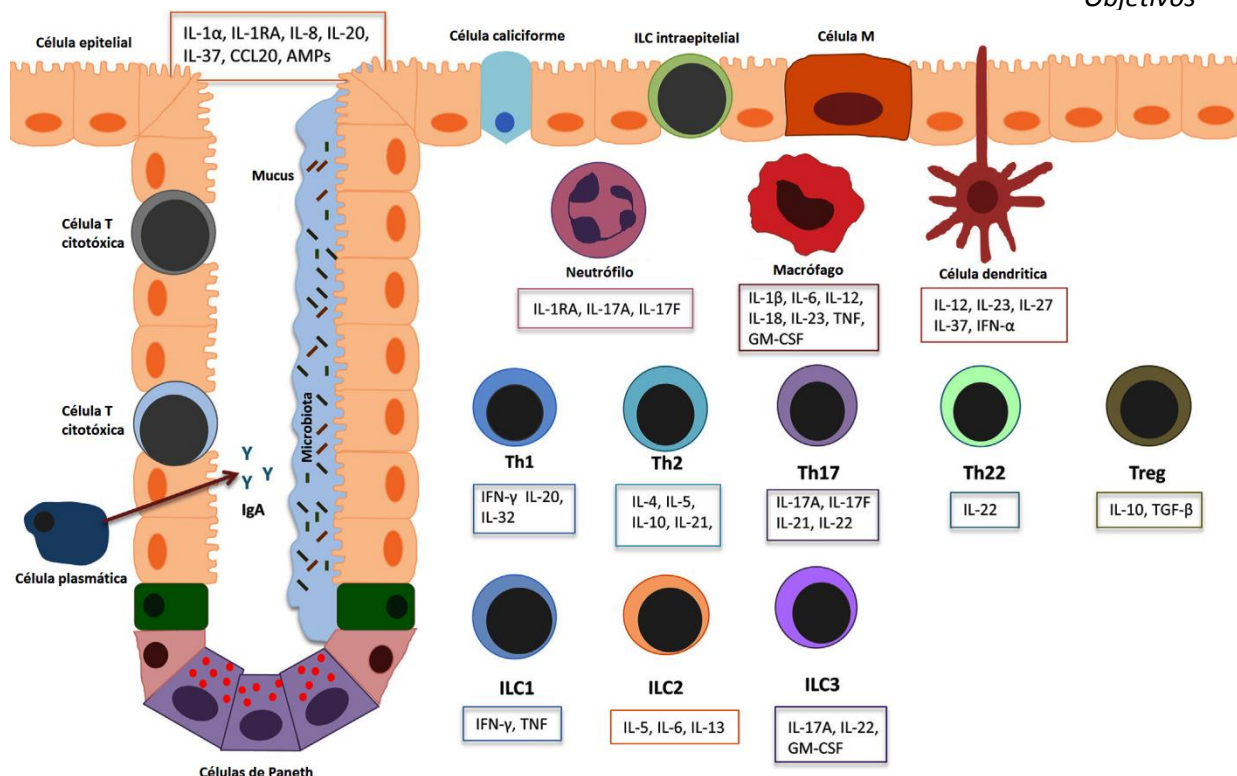


Figura 5. Células de la respuesta inmune innata y adaptativa.

*Adaptado de Kmiec, Z., Cyman, M. & Slebiada, T.J. *Cells of the innate and adaptive immunity and their interactions in inflammatory bowel disease. Advances in medical sciences* 62, 1-16 (2017).

Las interacciones entre la respuesta inmune innata y adaptativa, ILCs, macrófagos intestinales, células T, CDs y células del epitelio intestinal, parecen jugar un papel importante en la regulación de la homeostasis inmune en el intestino sano e inflamado.³ A su vez, la respuesta generada por el hospedador después de la adquisición de esporas parece estar relacionada con la microbiota del hospedador, la función inmune del hospedador y la virulencia de la cepa.⁹

Los conocimientos sobre la respuesta inmune frente a la infección por *C. difficile* son rudimentarios. Comprender y caracterizar los mecanismos que llevan a la inmunopatogénesis es fundamental. Por otro lado, la implementación de un tratamiento para el episodio inicial de CDI que reduzca la

tasa de recurrencia es prioritaria como también la búsqueda de un tratamiento alternativo eficaz.

Más aún teniendo en cuenta todos estos antecedentes, es probable que la exposición comunitaria y hospitalaria a *C. difficile* en nuestro país sea mayor de lo que se conoce hasta el momento. Conocer más sobre la respuesta inmune como también establecer un método de diagnóstico óptimo frente a la infección por *C. difficile* es necesario para prevenir brotes de la enfermedad, alcanzar un tratamiento eficaz y evitar recurrencias de la infección por *C. difficile*.

OBJETIVOS

Objetivos

Teniendo en cuenta que un diagnóstico rápido y sensible es esencial para el control de la CDI y que por otro lado la modulación de la respuesta del hospedador podría ser un enfoque más efectivo para los pacientes que no resuelven la enfermedad, constituyendo una nueva estrategia conjunta de tratamiento para combatir la CDI; el objetivo general del presente trabajo final de grado fue establecer un método de diagnóstico molecular y evaluar los mecanismos que median la generación de una respuesta inmune protectora y aquellos que por el contrario podrían llevar a inmunopatogénesis.

Objetivos específicos

1- Diagnóstico molecular de la infección por *C. difficile* (CDI) utilizando un método comercial y puesta a punto de diagnóstico molecular por PCR.

1.1- Puesta a punto de una PCR directa para detectar la toxina B de *C. difficile*, de manera de estudiar la posibilidad de desarrollar un test de diagnóstico propio.

1.2- Diagnóstico molecular a partir de muestras de materia fecal utilizando el kit Quidel AmpliVue.

1.3- Comparación de los resultados obtenidos con los métodos de diagnóstico molecular con los resultados solicitados de rutina.

2- Caracterización de la respuesta inmune frente a *C. difficile*.

2.1- Determinación de la producción de citoquinas pro-inflamatorias (IFN- γ , IL-17, TNF- α) en respuesta a la estimulación *in vitro* con *C. difficile*.

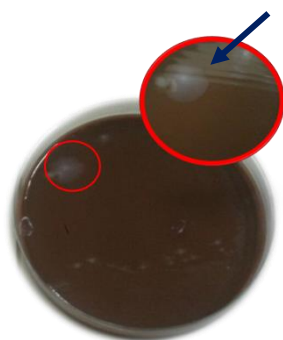
2.2- Determinación de la expresión de moléculas coestimuladoras (SLAM, PD-1, ICOS) en CMSP luego de la estimulación en presencia de *C. difficile*.

2.3- Evaluación del rol de las moléculas coestimuladoras en la inducción de los perfiles pro-inflamatorios en células estimuladas con *C. difficile*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Individuos participantes. Para estudiar la respuesta inmune frente a *C. difficile* se obtuvieron muestras de sangre periférica de Dadores Sanos (DS) de la comunidad y muestras de materia fecal, luego de recibir el consentimiento informado.

Cultivo de *C. difficile*. Se realizó el crecimiento de la cepa “hipervirulenta” NAP1/BI/027 de *C. difficile* en placas de agar chocolate y en caldo de cultivo tioglicolato a 37°C en condiciones de anaerobiosis. Para esto, se utilizaron bolsas de anaerobiosis (*Mitsubishi*), donde se colocó la placa junto con un parche generador de atmósfera anaeróbica (*AnaeroPack, Mitsubishi*). Luego de 3 días, se realizaron los extractos bacterianos (a partir d los caldos de cultivo) y la purificación de ADN de *C. difficile* (de las colonias aliadas en agar chocolate).



Colonias aisladas de *C. difficile* en placa de Agar chocolate cultivadas en anaerobiosis

Antígenos bacterianos. La estimulación *in vitro* de las células a lo largo del estudio fue realizada con un extracto de la cepa “hipervirulenta” NAP1/BI/027 de *C. difficile* inactivada por calor (CD Calor) o con formol (CD Formol). Brevemente, para la preparación de los extractos de *C. difficile*, se tomó una alícuota del caldo de cultivo de *C. difficile* y se centrifugó a 15000 por 10 minutos a 4°C. En el caso del extracto de *C. difficile* inactivado por calor, se lavó el pellet de bacterias con PBS 1X centrifugando a 15000 por 10 minutos a 4°C y se resuspendió en PBS 1X una vez descartado el sobrenadante.

Posteriormente, se inactivó por calor a 95°C por 30 minutos. Para el extracto de *C. difficile* inactivado con formol, el pellet se resuspendió en formol 3% (*Biopack*) y se incubó a 4°C durante toda la noche. Se centrifugó a 15000 rpm por 10 minutos, se lavó 3 veces con PBS 1X para remover el formol y se resuspendió en PBS 1X. Ambos extractos se almacenaron a -20°C.

Antes del inicio de la preparación de los extractos, se monitoreó el crecimiento bacteriano del cultivo midiendo la DO a 600nm. Inicialmente se partió de una DO de 0,1 y se detuvo el crecimiento a una DO de 0,6. Una vez realizados los extractos, se cuantificó el contenido antigénico a 600 nm y se ajustó a una DO de 1 para una mayor paridad entre los extractos.

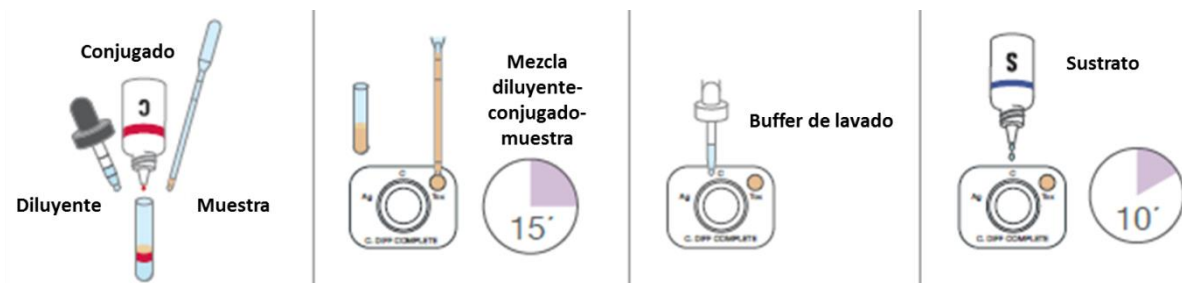
Purificación de ADN de *C. difficile*. Para la extracción y purificación de ADN de *C. difficile*, se utilizó el kit ADN PuriPrep-S (*Highway*). Brevemente, a partir del cultivo de *C. difficile* en placas de Petri se tomó una colonia y se colocó en un tubo con H₂Od. Se calentó a 100°C por 10 minutos en termobloque y se adicionó PBS 1X y proteinasa K. Se vortexeó y se incubó 30 minutos a 56°C. Posteriormente, se agregó el buffer de lisis (BL), incluido en el kit, se realizó un pulso de 5 segundos en la microcentrífuga y se incubó 15 minutos a 56°C. Se adicionó etanol y se repitió un pulso de 5 segundos en la microcentrífuga. Seguidamente el ADN fue obtenido por centrifugación (12000g por 2 minutos) utilizando una minicolumna de purificación de ADN. El ADN retenido en la columna fue lavado dos veces (siguiendo las instrucciones del fabricante) y luego eluido con H₂Od. Para esto, se incubó 5-10 minutos a T° ambiente y finalmente se centrifugó 2 min a 12000g. El ADN obtenido fue cuantificado

mediante un espectrofotómetro UV/visible (Mapada, Shanghai Mapada Instruments Co.)

Diagnóstico.

Enzimoinmunoensayo (EIA) TECHLAB C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE.

Se realizó la determinación de las toxinas de *C. difficile* por EIA a cada una de las muestras de pacientes del Hospital Interzonal de Agudos “Abraham Piñeyro” de la ciudad de Junín con sospecha de infección por *C. difficile*, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Ver Figura). Brevemente, en un tubo de ensayo se añadió un buffer diluyente y el conjugado de anticuerpos monoclonal para el antígeno de la enzima glutamato deshidrogenasa y policlonales para la toxina A (TcdA) y la toxina B (TcdB), provistos por el kit. Posteriormente, se diluyó la muestra de materia fecal en cada tubo y se transfirió la mezcla muestra-conjugado diluída al *pocillo de muestra* de un dispositivo de membrana. Se incubó a T° ambiente durante 15 minutos. Luego, se añadió la solución de tampón a la *ventana de reacción* del dispositivo hasta que penetró en la membrana y posteriormente el sustrato, ambos provistos por el kit, también en la ventana de reacción. Se leyó el resultado a los 10 min.



Interpretación de los resultados:



Resultado positivo de antígeno: Presencia de una cepa de *C. difficile* no toxigénica.

Resultado positivo de antígeno y toxina: Presencia de una cepa de *C. difficile* productora de toxinas.

Resultado negativo: No hay presencia de *C. difficile*.

PCR de punto final para detectar TcdB. Se realizó una PCR para la detección de la presencia de la toxina B (TcdB) en muestras de materia fecal de dadores sanos (DS) de la comunidad y pacientes del Hospital Interzonal de Agudos “Abraham Piñeyro” de Junín con sospecha de infección por *C. difficile*. Previo a esto, se realizó la puesta a punto de la PCR para la TcdB utilizando muestras de materia fecal, a las cuales se añadió cantidades crecientes de bacteria viva crecida en caldo tioglicolato.

Brevemente, las muestras de materia fecal se homogeneizaron, se calentaron a 70°C por 15 minutos y se realizó un pulso de centrifuga por 3 minutos. Se colectó el sobrenadante para la reacción de PCR. La enzima utilizada en nuestro ensayo (VersaTaq) permite la amplificación directa del ADN sin necesidad de purificación previa. La mezcla de PCR consistió en: Buffer Versa Taq 10X (1X), dNTPs (0,2 mM), cebadores específicos para TcdB (0,2 µM cada uno, *Integrated DNA Technologies*), muestra del sobrenadante de materia fecal

(<50ng/<5µl), enzima polimerasa Versa Taq (*VersaTaq™ Direct PCR Polymerase, BioVision*) y H₂O para alcanzar el volumen final de 15 µl.

Las condiciones de ciclado fueron: 1) 10 min. 94°C, 2) 94°C 20 seg, 3) 62°C 60 seg; 4) 68°C 40 seg, 5) 68°C 10 min; siendo 30 ciclos desde el paso 2 al 4. Posteriormente, los amplicones se corrieron en un gel de agarosa 2%, 45 min. a 90V. Los controles de amplificación que se utilizaron fueron:

Control positivo: ADN purificado de la cepa “hipervirulenta” NAP1/BI/027 de *C. difficile* como molde de la reacción.

Control negativo: muestra de materia fecal de DS sin presencia ni portación de *C. difficile*.

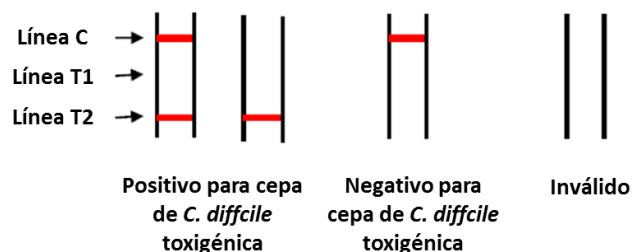
Secuencias de los cebadores:

Fw TcdB GTGTAGCAATGAAAGTCCAAGTTTACGC

Rv TcdB CACTTAGCTCTTTGATTGCTGCACCT

Ensayo *C. difficile* AmpliVue (Quidel). Se realizó el test de amplificación isotérmica AmpliVue a cada una de las muestras de pacientes del Hospital Interzonal de Agudos “Abraham Piñeyro” de Junín con sospecha de infección por *C. difficile*, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, primero se realizó una lisis térmica de la muestra de materia fecal tomada con un hisopo, provisto por el kit. Se colocó el hisopo en un tubo con buffer de dilución, y luego se transfirió la muestra diluída a un tubo con buffer de lisis. Se calentó a 95°C por 10 min. Para la reacción de amplificación, se transfirió la muestra lisada a un tubo de reacción con la mezcla de reacción liofilizada, y se incubó a 64°C durante 60 min en termociclador. Para la detección, se colocó el

tubo de reacción en un cartucho gris para el amplicón y este mismo se colocó en el cartucho de detección. Luego de 10 min, se leyeron los resultados:



Cultivos celulares.

Células Mononucleares de Sangre Periférica. Células mononucleares de sangre periférica (CMSP) fueron aisladas a partir de sangre heparinizada mediante centrifugación en gradiente de densidad por Ficoll-Hypaque (G.E Healthcare). Las CMSP fueron cultivadas en placas de 48 pocillos o 96 pocillos a 1×10^6 células/ml en RPMI 1640 (Gibco, Carlsbad, CA) suplementado con penicilina-estreptomicina, glutamina (2mM, Sigma-Aldrich) y suero bovino fetal al 10%. Las células fueron estimuladas en presencia o ausencia de los extractos (CD Calor y CD Formol) de la cepa “hipervirulenta” NAP1/BI/027 de *C. difficile* por 24 hs, 48 hs y 5 días en estufa a 37°C y con 5% de CO₂. Para evaluar la fagocitosis, en algunos casos el extracto de la bacteria fue teñido con Rodamina.

Línea celular THP-1. La línea monocítica humana THP-1 (American Type Culture Collection, ATCC TIB202) fue mantenida en cultivo a 2×10^5 células/ml en medio RPMI 1640 (Natocor) suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF, Natocor), penicilina y estreptomicina, glutamina (2mM, Sigma-Aldrich), glucosa (0,25 mg/ml), piruvato de sodio (0,011 mg/ml) y β-mercaptoetanol (0,05

mM) a 37°C y con 5% de CO². Para inducir su diferenciación a macrófagos, las células fueron cultivadas en placas de 24 pocillos a 0,5x10⁶ células/ml en medio completo en presencia de PMA 25ng/ml por 24 hs. Luego las células fueron lavadas y estimuladas durante 1h en presencia o ausencia de los extractos de la cepa “hipervirulenta” NAP1/BI/027 de *C. difficile*. Para evaluar la fagocitosis, los extractos de la bacteria fueron teñidos previamente con Rodamina.

Citometría de flujo.

Determinación de la expresión de ICOS, SLAM y PD-1. La expresión de las moléculas coestimuladoras ICOS, SLAM y PD-1 en superficie fue determinada por citometría de flujo. Brevemente, luego de la incubación de las CMSP con los extractos bacterianos, las células fueron lavadas en buffer FACS (PBS 1X 2% de SBF) y luego incubadas con un anticuerpo monoclonal específicos conjugados a fluoróforos durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. Luego, las células fueron lavadas con buffer FACS y centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y las células fueron fijadas en paraformaldehído (PFA) al 1% (*Sigma-Aldrich*). Se utilizaron los siguientes anticuerpos: anti-CD3 PerCP-Cy 5.5 (*OKT3, Biolegend*) o anti-CD3 PE (*Immunotools*), anti CD4 FITC (*Immunotools*) o anti-CD4 APC (*Immunotools*), anti-CD14 FITC (*Immunotools*) en diferentes combinaciones con los anticuerpos para moléculas coestimuladoras anti-ICOS Alexa Flúor 488 (*C398.4A, Biolegend*), anti-SLAM Alexa Flúor 488 (*A12, Biolegend*) o anti-SLAM PE (*BD Biosciences*) y anti-PD-1 Alexa Flúor 647 (*EH12.2H7, Biolegend*)

Las muestras fueron incubadas en paralelo en todos los casos en presencia de anticuerpos irrelevantes (controles de isotipo).

Determinación de la producción de TNF- α , IFN- γ e IL-17. La expresión de las citoquinas IFN- γ e IL-17 fue determinada por citometría de flujo intracelular. Las CMSP fueron incubadas con los extractos de *C. difficile* inactivado por calor (CD calor) o con Formol (CD Formol) por 24h o 5 días, en las últimas 5 horas de cultivo se adicionó un inhibidor de transporte del aparato de Golgi (Golgi Stop, BD); para inducir la acumulación intracelular de las citoquinas. Las células fueron lavadas en buffer FACS (PBS 1X 2% de SBF) y luego incubadas con anticuerpos monoclonales específicos para las moléculas de superficie a determinar durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. Luego, las células fueron lavadas con buffer FACS y centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y las células fueron fijadas en paraformaldehído (PFA) al 4% (*Sigma-Aldrich*) por 20 minutos. Posteriormente, las células fueron lavadas dos veces con buffer de Permeabilización (BP; PBS 1X, SBF 10%, Saponina 0,5%) e incubadas con BP durante 15 minutos. Luego, se incubaron por 40 minutos con los anticuerpos monoclonales específicos para las citoquinas: anti-IFN- γ Alexa Flúor 488 (4S.3B, *Biolegend*) o anti-IFN- γ Alexa Flúor 647 (4S.3B, *Biolegend*), anti-IL-17 PE (*eBio64DEC17*, *eBiosciences*), anti-TNF- α PE (*Immunotools*). Las células fueron lavadas dos veces con BP y resuspendidas en FACS.

Las muestras fueron incubadas en paralelo en todos los casos en presencia de anticuerpos irrelevantes (controles de isotipo)

Determinación de la fagocitosis. Para determinar la fagocitosis, el porcentaje de células THP-1 positivas para Rodamina fue determinado por citometría de flujo luego de la incubación con el extracto de *C. difficile* previamente marcado con el colorante. Para esto los extractos bacterianos fueron incubados con Rodamina en agitación a temperatura ambiente por 30 minutos y luego lavado con PBS para eliminar el exceso de Rodamina. Luego de incubar las células con los extractos marcados, las células THP-1 fueron cosechadas y lavadas en FACS. En algunos casos, se determinó la expresión de SLAM utilizando el anticuerpo anti-SLAM conjugado a Alexa Fluó r 488 como se describió previamente.

Determinación de la viabilidad celular. La apoptosis fue determinada por citometría de flujo. Brevemente, luego de la incubación de las CMSP con los extractos de *C. difficile* (CD calor o CD Formol), las células fueron lavadas en buffer FACS (PBS 1X 2% de SBF) y luego incubadas con un anticuerpo específico anti-Anexina V (*Immunotools*) por 10 minutos. Luego, fueron teñidas con Ioduro de Propidio (IP) y analizadas en el citómetro de flujo.

En todas las determinaciones por citometría descriptas, las muestras fueron analizadas en un Citómetro de Flujo FACSCanto II (BD) y el análisis de los datos se realizó utilizando el software FlowJo (v 5.7.2).

ELISA. La producción de IFN- γ fue determinada por ELISA de captura en los sobrenadantes de cultivo de CMSP estimuladas con *C. difficile* (CD Formol o CD Calor). El ELISA de captura fue realizado siguiendo las instrucciones del

fabricante (*Biolegend*). Brevemente, el anticuerpo de captura anti-IFN- γ (200X) se incubó por 16-18hs a 4°C, luego las placas fueron lavadas (PBS-Tween 0,05%) y bloqueadas con PBS-BSA 1% por 1 hora. Seguidamente la placas fueron lavadas e incubadas con las muestras y la curva patrón por 2 horas a temperatura ambiente. Luego de los lavados se incubó en presencia del anticuerpo de detección biotinilado (200X) por una hora a temperatura ambiente. Se realizaron los lavados y se incubó con estreptavidina peroxidasa por 30 min. Las muestras fueron reveladas utilizando Buffer Citrato con TMB (3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina) como sustrato y peróxido de hidrógeno. La reacción fue detenida con H₂SO₄ y se detectó la absorbancia a 450 nm en un lector de microplacas (*BioRad*).

PCR en Tiempo Real. La cuantificación de la expresión del ARNm de IFN- γ se realizó en un termociclador en tiempo real (*LineGene 9640, Bioer*) y se relativizó a la expresión del ARNm de Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Brevemente, las CMSP estimuladas con *C. difficile* (CD Calor o CD Formol) fueron lavadas con PBS 1X y resuspendidas en Trizol para realizar la extracción de ARN (*TRI Reagent, Genbiotech*). Para esto, se adicionó cloroformo y se centrifugó 15 minutos a 12000 g a 4°C. Se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo y se incubó 10 min a -20°C. Se centrifugó 8 minutos a 12000 g, se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con etanol 75% aplicando vórtex. Se centrifugó 5 minutos a 7500 g, se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet a temperatura ambiente. Posteriormente, se cuantificó el ARN en un espectrofotómetro (*Picodrop*) y se prosiguió con la

amplificación del ADN complementario (ADNc) mediante la enzima MM-LV RT (*Promega*).

Una vez obtenido el ADNc, se prosiguió con la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en Tiempo Real. Brevemente, se preparó la mezcla de reacción adicionando: FastStart SYBR Green Master (2X), cebadores específicos para el IFN- γ o GAPDH (*Integrated DNA Technologies*) y se completó con agua estéril hasta llegar a un volumen de 15 ml por reacción de PCR. Las condiciones de ciclado fueron:

GAPDH 1) 94°C 5 min, 2) 94° 20 seg, 3) 62°C 20 seg, 4) 72°C 20 seg, 5) 83°C 5 seg, 6) 72°C 5 min. 40 ciclos de 2 a 4.

IFN- γ 1) 95°C 5 min, 2) 95°C 30 seg, 3) 58°C 20 seg, 4) 72°C 30 seg, 5) 72°C 5 min. 45 ciclos de 2 a 4.

Los resultados se analizaron con el programa LineGene 9640.

Los valores fueron calculados utilizando el método de cuantificación de expresión comparativo, luego de la normalización con respecto a la expresión de GAPDH: Tasa de incremento = $2^{-\Delta\Delta Ct}$, donde $\Delta Ct = [Ct_{(IFN-\gamma)} - Ct_{(GAPDH)}]$ y $\Delta\Delta Ct = [\Delta Ct_{\text{estímulo}} - \Delta Ct_{\text{no estímulo}}]$.

Análisis estadístico. Se utilizó el test de Mann-Whitney y el test de Wilcoxon para muestras no pareadas o pareadas respectivamente. Se utiliza el test de Kruskal-Wallis (ANOVA no paramétrico de muestras no pareadas) y el test de Friedman (ANOVA no paramétrico de muestras pareadas) y el post test de Dunns. Los valores de $p < 0,05$ fueron considerados significativos.

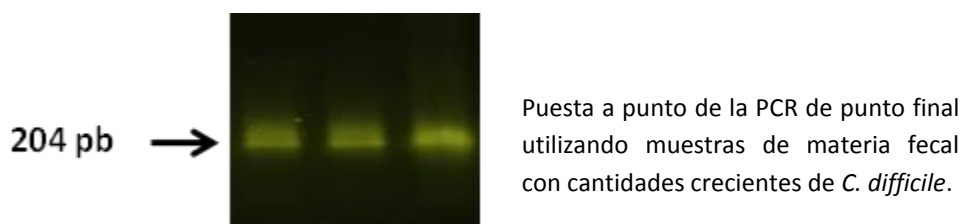
RESULTADOS

Diagnóstico molecular de la infección por *C. difficile*

Puesta a punto de PCR para TcdB para el diagnóstico molecular de la CDI

Existen muy pocos datos en nuestro país acerca de la incidencia de esta infección y no existen estudios que analicen la portación asintomática de *C. difficile*. Los portadores asintomáticos de *C. difficile* constituyen un importante reservorio de la enfermedad y se conoce muy poco acerca de la relevancia clínica de la portación asintomática en la progresión a la infección sintomática. El diagnóstico en la mayoría de los centros de salud se realiza por EIA una técnica de baja sensibilidad. Teniendo en cuenta esto, uno de los objetivos de este trabajo fue establecer un método de diagnóstico molecular que pueda ser utilizado en los centros de salud de nuestra región. Para esto se realizó la puesta a punto de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) directa para la toxina B de *C. difficile* que no requiere pasos previos de purificación del ADN. Para ello, trabajamos junto con personal del Hospital Interzonal General de Agudos “Abraham Piñeyro” de Junín.

En primer lugar *C. difficile* fue cultivada en agar chocolate en anaerobiosis. A partir de colonias aisladas se realizó la extracción del ADN de la bacteria, de manera de obtener un control positivo. Luego de obtener resultados positivos se realizó una puesta a punto utilizando muestras de materia fecal, a la cual se añadió diferentes cantidades de bacteria viva crecida en caldo tioglicolato (**Ver Figura**).



Posteriormente, se realizó el diagnóstico por PCR en muestras de material fecal provenientes de Dadores Sanos (DS) de la comunidad y muestras de pacientes hospitalizados. La especificidad de los resultados obtenidos por PCR directa se corroboró por comparación con muestras positivas cuyo diagnóstico había sido realizado por EIA, el método de diagnóstico actualmente utilizado por el Hospital. Como puede observarse en la **Figura 1**, el ensayo de EIA arrojó un resultado positivo para las toxinas, es decir para una cepa toxigénica de *C. difficile* (**Figura 1A**). En concordancia con el resultado obtenido por EIA, la PCR directa de la toxina TcdB también arrojó un resultado positivo, confirmando así la especificidad de nuestro ensayo (**Figura 1B**, calle 4). Asimismo, se realizó la PCR a muestras de materia fecal de DS para estudiar una posible portación asintomática de *C. difficile*. No se detectó amplificación del ARNm de la toxina B en ninguno de los DS estudiados (**Figura 1B**).

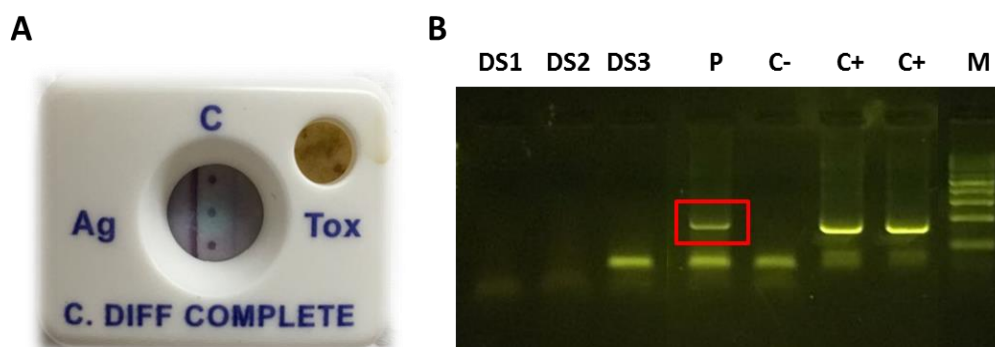


Figura 1. Puesta a punto de PCR y comparación con el diagnóstico por EIA. **A)** EIA C.DIFF QUIK CHEK COMPLETE de una muestra de materia fecal de un paciente con sospecha clínica de CDI. Las líneas muestran el resultados positivo para la detección de la enzima GDH de *C. difficile* (Ag, línea a la izquierda) y para las toxinas A y B (Tox, línea a la derecha). La línea de puntos en el centro corresponde al control de calidad del ensayo. **B)** La presencia de TcdB fue determinada por PCR directa en muestras de materia fecal de Dadores Sanos de la comunidad y un paciente con sospecha clínica de CDI y diagnóstico positivo por EIA. Los productos de PCR fueron corridos en un gel de Agarosa al 2% y visualizados utilizando Sybr Green. **DS**=Dador Sano; **P**=paciente; **C-**= Control Negativo; **C+**=Control Positivo; **M**=Marcador de Peso Molecular.

Comparación de la PCR para TcdB con el kit AmpliVue *C. difficile* Assay

El ensayo AmpliVue *C. difficile* de Quidel es un test de diagnóstico *in vitro* para la detección directa y cualitativa del gen de la TcdA en muestras de heces no formadas de pacientes que se sospecha que padecen CDI. El gen diana del ensayo es un fragmento conservado del ADN de *C. difficile*, que está intacto en todas las cepas toxigénicas A⁺B⁺ y A⁻B⁺ conocidas de *C. difficile*. El ensayo utiliza la amplificación dependiente de helicasa (HDA) para la amplificación del fragmento conservado de la secuencia del gen de la TcdA y un dispositivo autónomo de detección de amplificación desechable que permite la evaluación visual de los resultados del ensayo.

Siguiendo las instrucciones del fabricante, se realizó el ensayo AmpliVue *C. difficile* con la muestra de materia fecal del paciente con diagnóstico positivo

por EAI. Como se puede observar en la Figura 2, la línea T2 es visible, confirmando nuevamente la sospecha de CDI para el paciente.



Figura 2. Ensayo AmpliVue de Quidel. Se realizó el test con la muestra de materia fecal del paciente siguiendo las instrucciones del fabricante. La línea T2 detecta el ADN toxigénico de *C. difficile*. La línea C detecta el ADN control del proceso en ausencia del ADN toxigénico de la *C. difficile*. En presencia del ADN diana de *C. difficile* toxigénico, la línea C detecta los productos amplificados tanto del ADN toxigénico de *C. difficile* como del ADN de control del proceso.

En conclusión, los resultados obtenidos hasta el momento nos han permitido realizar la puesta a punto de la PCR directa de la toxina B de *C. difficile* a partir de muestras de materia fecal y corroborar su especificidad. Para lograr la validación de este método los resultados deberán repetirse en un mayor número de muestras y compararse con otro método de diagnóstico molecular validado como el AmpliVue, el cual demostró una muy alta sensibilidad y alta especificidad en el meta-análisis realizado por *Crobach y col.*⁴⁹ Teniendo en cuenta que los test de diagnóstico moleculares son altamente más sensibles que el EIA nos proponemos validar nuestro método en un mayor número de muestras para luego implementarlo en los centros de salud de la región como método de screening de CDI. Estos resultados pueden tener un fuerte impacto en la salud pública, ya que la implementación del método de

diagnóstico mejoraría la sensibilidad y agilizaría el diagnóstico y por lo tanto el tratamiento.

Respuesta inmune innata en respuesta a *C. difficile*

Evaluación de la viabilidad celular luego del estímulo con extractos de *C. difficile*

Para evaluar la respuesta inmune frente a *C. difficile*, se prepararon extractos totales de la bacteria por calentamiento o tratamiento con formol (como se describe en Materiales y Métodos). Previo a la caracterización de la respuesta inmune frente a *C. difficile*, se evaluó en primer lugar la viabilidad de las CMSP de dadores sanos luego de 48h y 5d de estimulación *in vitro* con *C. difficile*. La viabilidad o muerte celular fue evaluada por citometría de flujo utilizando Anexina V e Ioduro de Propidio (IP). Como se puede observar en la **Figura 3**, tanto a las 48h como a los 5d el porcentaje de muerte celular es similar tanto en las células sin estimular como luego del estímulo con *C. difficile* ya sea inactivado por calor o con formol.

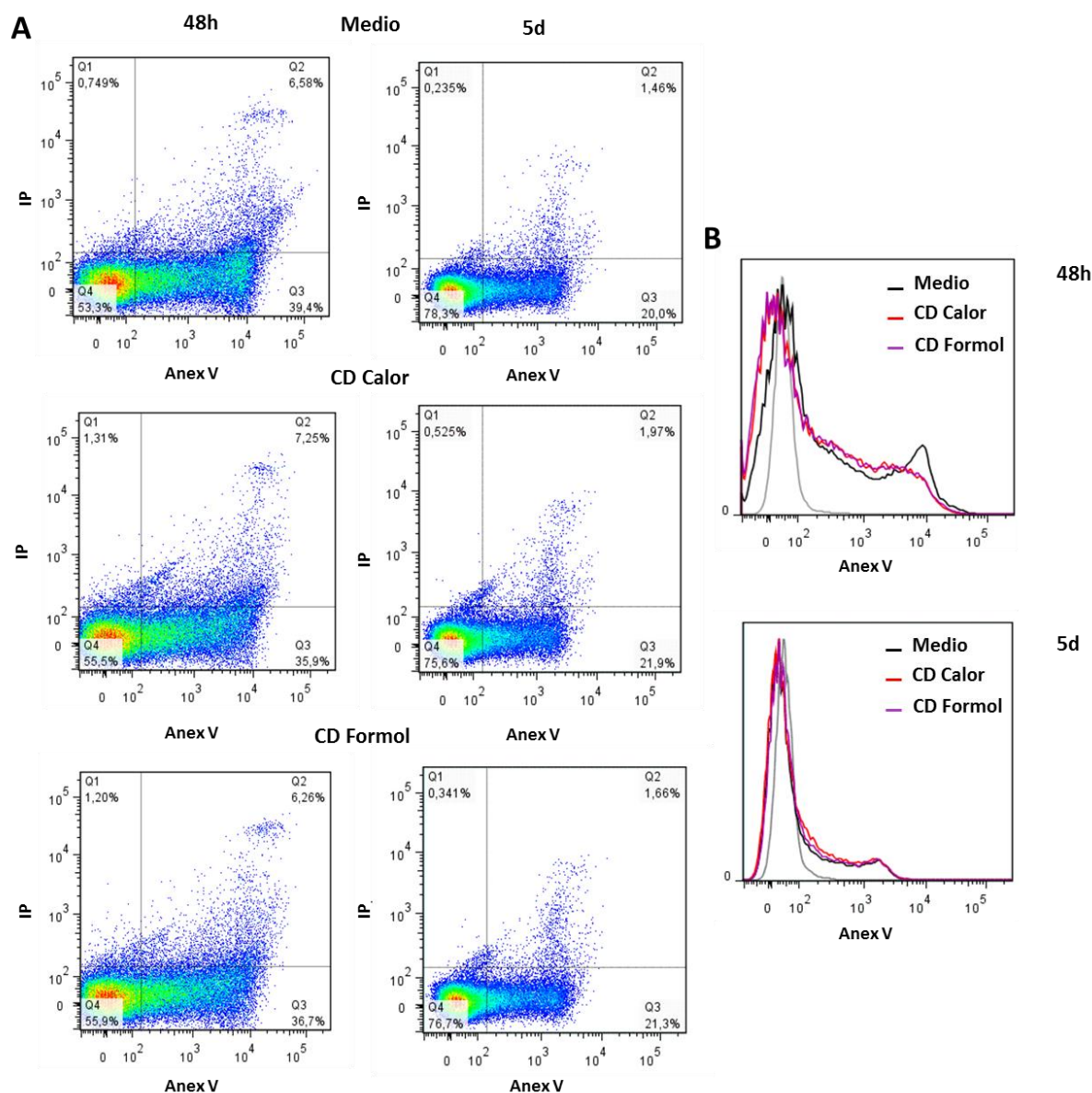


Figura 3. Evaluación de la viabilidad celular luego del estímulo con *C. difficile* mediante citometría de flujo. CMSP de Dadores Sanos (DS) fueron estimuladas por 48h (panel izquierdo) o 5d (panel derecho) en presencia/ausencia de *C. difficile* inactivado por calor (CD calor) o Formol (CD Formol). La viabilidad celular fue determinada mediante citometría de flujo por tinción con Anexina V-FITC (Anex V) e Ioduro de Propidio (IP). **A)** Se muestra un dot plot representativo. **B)** Histograma representativo de las células Anexina V positivas totales.

En la **Figura 4** se puede apreciar el porcentaje de células en cada una de las fases: células viables, células en apoptosis temprana (Anexina V⁺ IP⁻), células en apoptosis tardía (Anexina V⁺ IP⁺) y células necróticas (Anexina V⁻ IP⁺). Tanto a las 48 hs como a los 5 días, el porcentaje de células necróticas y apoptóticas tardías fue del 2-8% y 3-1%, respectivamente. Así como tampoco se observaron diferencias en la apoptosis temprana, luego de la estimulación con *C. difficile*.

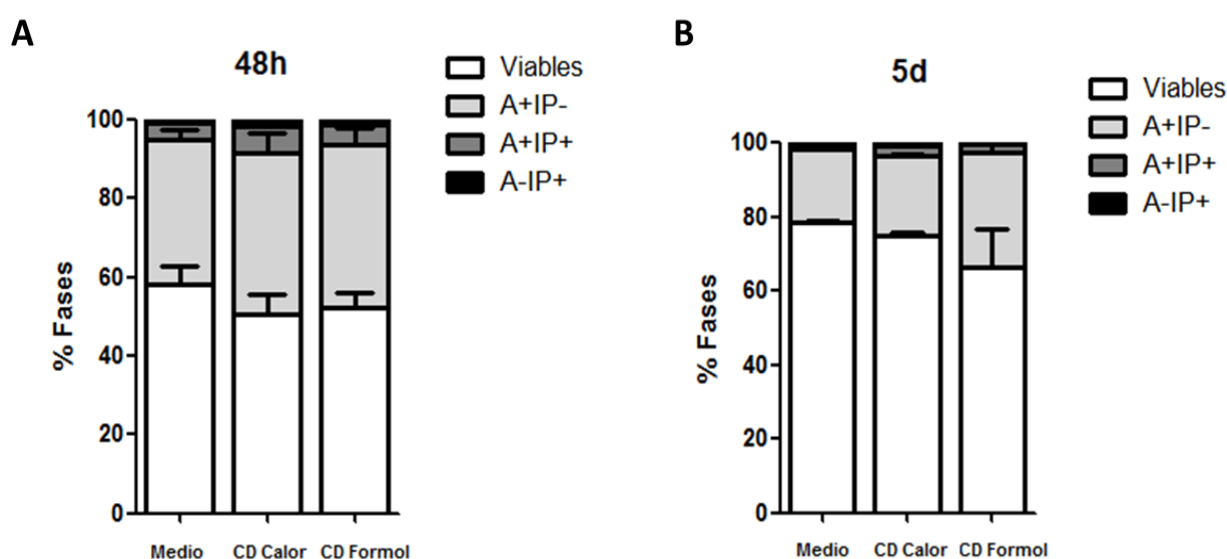


Figura 4. Evaluación de la viabilidad celular por fases luego del estímulo con *C. difficile* mediante citometría de flujo. CMSP de Dadores Sanos (DS) fueron estimuladas por 48h (A) o 5d (B) con *C. difficile* inactivado por calor (CD Calor) o con formol (CD Formol). La viabilidad celular fue determinada mediante citometría de flujo por tinción con Anexina V-FITC (A) e Ioduro de Propidio (IP). Se muestra el porcentaje de células viables, células en apoptosis temprana (A⁺IP⁻), células en apoptosis tardía (A⁺IP⁺) y células necróticas (A⁻IP⁺). Las barras respetan la Media $\pm$ SEM del % de células en cada fase.

Así, estos resultados demuestran que ambos extractos de la bacteria, tienen una escasa presencia/actividad de las toxinas. Si bien las toxinas son el principal factor de virulencia, algunos estudios recientes sugieren que moléculas no tóxicas de *C. difficile*, poseen roles inmuno-regulatorios.¹⁵ Sin embargo, nuestro actual conocimiento acerca de la respuesta inmune del hospedador frente *C. difficile* permanece rudimentario y las mayoría de los

estudios apuntan al rol de la inflamación en respuesta a las toxinas de *C. difficile*. Muchos estudios que utilizan el modelo de intoxicación han reportado el efecto deletéreo de la inflamación.⁷ Sin embargo, los modelos de infección han demostrado que ciertas vías inflamatorias son necesarias para la sobrevida.⁷

Expresión de SLAM y TNF- α en monocitos frente a *C. difficile*

La eliminación de patógenos durante una infección involucra células inmunes como macrófagos y neutrófilos que migran al sitio de infección y donde son capaces de ejercer importantes funciones efectoras, como la fagocitosis. Los macrófagos arriban de manera temprana al sitio de infección y comienzan a producir citoquinas y quemoquinas inflamatorias. Las quemoquinas secretadas reclutan otros tipos celulares al sitio de infección, en algunos casos iniciando una respuesta inmune adaptativa. Se ha observado que la exposición de SLPs de *C. difficile* a una línea celular macrofágica murina induce la producción de citoquinas pro-inflamatorias y quemoquinas por los macrófagos, e incrementa la expresión de PRRs y otros receptores de la superficie celular, así como también la fagocitosis y la actividad migratoria de los mismos. Más aún, las SLPs de *C. difficile* regulan la producción de un importante mediador inflamatorio, el TNF- α . Esta citoquina pro-inflamatoria puede actuar sobre los vasos sanguíneos, aumentando su permeabilidad y adherencia a los leucocitos. Esto permite la afluencia de células inmunitarias fluidas al sitio de infección y, por lo tanto, aumenta la permeabilidad y la acumulación de líquido que contribuye a la diarrea severa observada en pacientes infectados con *C.*

difficile. El TNF- α también actúa sobre CDs, promoviendo la migración a los ganglios linfáticos donde se puede iniciar una respuesta inmune adaptativa. Por otro lado, SLAM se expresa en la superficie de los macrófagos y está involucrado en la regulación de la secreción de citoquinas por macrófagos tanto humanos como murinos. A su vez, está reportado que SLAM regula positivamente la eliminación de bacterias Gram-negativas por macrófagos.⁵⁰

Teniendo en cuenta estos antecedentes, evaluamos el rol de la molécula coestimuladora SLAM y la producción de la citoquina TNF- α por citometría de flujo en monocitos luego de estimulación con *C. difficile* inactivado por calor o formol por 24 hs. La estimulación sólo con *C. difficile* inactivado por calor indujo un aumento significativo de la producción de TNF- α , mientras que ambos extractos de la bacteria (CD calor y formol) indujeron un aumento significativo de la expresión de SLAM (**Figura 5**). Se observó además que la producción de TNF- α fue significativamente mayor luego de la estimulación con CD Calor comparado con el estímulo con CD Formol (**Figura 5**).

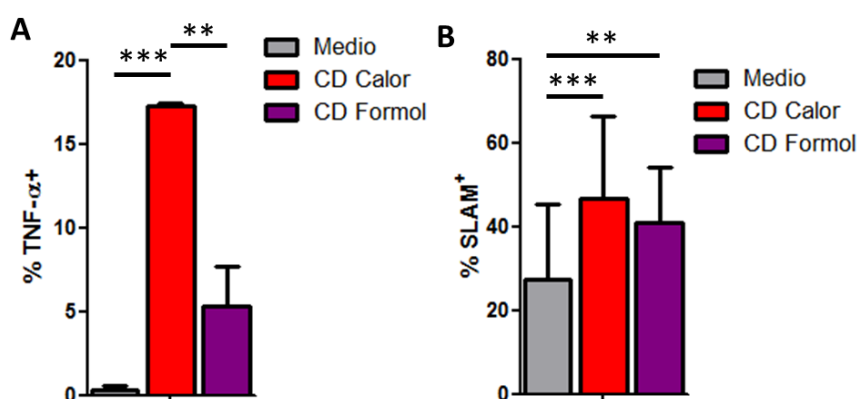


Figura 5. Análisis de la expresión de SLAM y de TNF- α en monocitos. CMSP de DS fueron estimuladas en presencia/ausencia del extracto de *C. difficile* inactivado con calor (CD Calor) o Formol (CD Formol) por 24h. La expresión de SLAM y de TNF- α en los monolitos fue determinada por citometría de flujo. Para esto las células fueron seleccionadas de acuerdo a tamaño y granularidad (FSC vs SSC) y luego se seleccionaron las células CD14⁺; para finalmente evaluar el % de células positivas para TNF- α (A) o SLAM (B). ** p<0,01; ***p<0,01.

Más aún, cuando se evaluó la co-expresión SLAM-TNF- α se observó que luego de la estimación con CD Calor la mayoría de las células TNF- α positivas expresan en su superficie SLAM (**Figura 6**).

Así, podemos concluir que *C. difficile* regula positivamente la expresión de SLAM y la producción de TNF- α en monocitos humanos, lo que podría indicar la inducción de un perfil pro-inflamatorio.

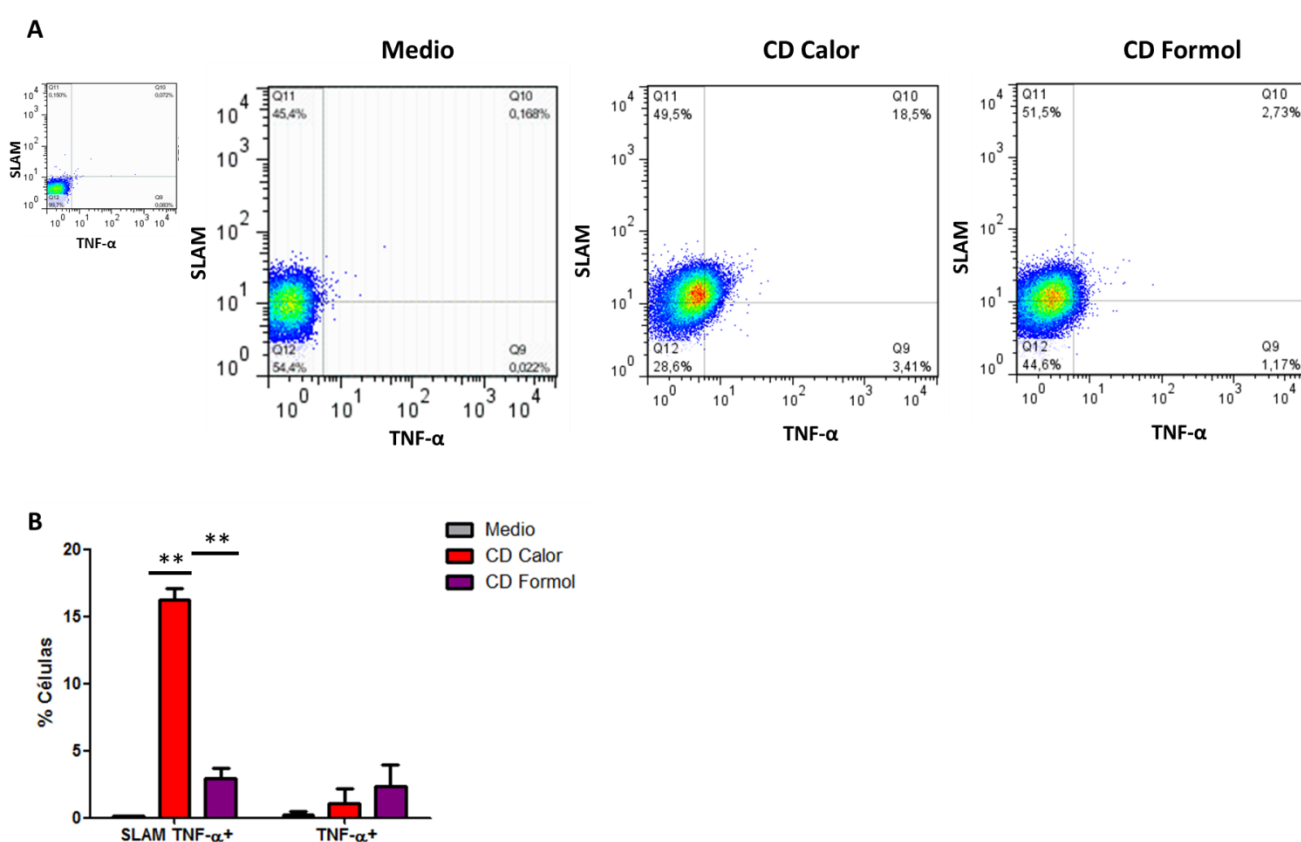


Figura 6. Análisis de la co-expresión de SLAM-TNF- α en monocitos mediante citometría de flujo. Las CMSP fueron incubadas en presencia/ausencia del extracto de *C. difficile* inactivado con calor (CD Calor) o formol (CD Formol) por 24h. La co-expresión de SLAM y de TNF- α fue determinada por citometría de flujo en las células CD14⁺. **A)** Dot plot representativo de la co-expresión de SLAM-TNF- α **B)** Las barras representan la media $\pm$ SEM del porcentaje de células CD14 doble positivas (SLAM⁺TNF- α ⁺) y positivas sólo para TNF- α (SLAM⁻TNF- α ⁺). (**, P<0,01).

Evaluación de la fagocitosis de *C. difficile* por células THP-1

Para determinar la fagocitosis se utilizó la línea celular THP-1, una línea celular aislada de sangre periférica de un paciente con leucemia monocítica aguda que ha sido utilizada ampliamente para estudiar la respuesta inmune. Esta línea celular crece en suspensión y adquiere la capacidad de diferenciarse y por lo tanto adherirse cuando son estimuladas con el éster de forbol (Forbol 12-miristato 14-acetato, PMA). Así las células THP-1 diferenciadas por 24h en presencia de PMA, fueron luego incubadas por 1h con *C. difficile* inactivado por calor o formol, previamente marcados con rodamina; y la fagocitosis fue determinada por citometría de flujo.

Observamos una mayor fagocitosis con Rodamina-CD Calor comparado con Rodamina-CD Formol (**Figura 7**).

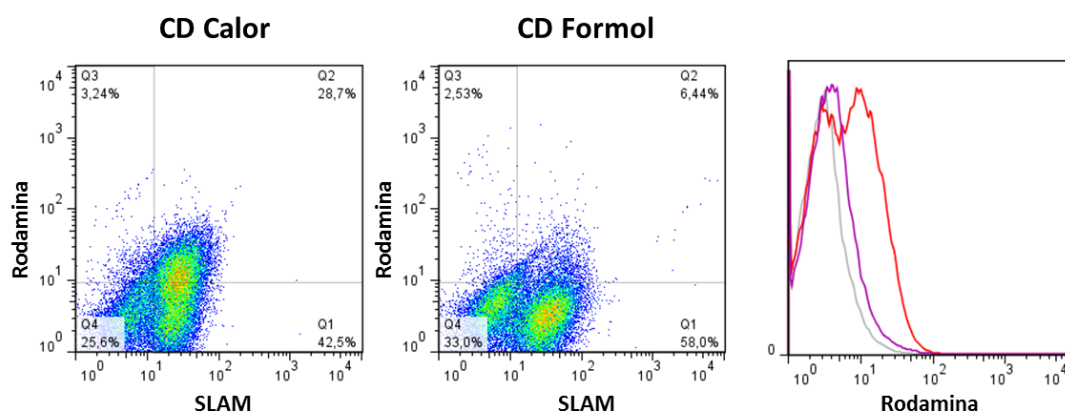


Figura 7. Análisis de la fagocitosis mediada por células THP-1. Las células THP-1 fueron diferenciadas con PMA por 24h, luego lavadas y estimuladas con el extracto de *C. difficile* inactivado por calor (CD Calor) o con formol (CD Formol) teñido con Rodamina por 1h. Se evaluó además la expresión de SLAM. Se muestran un dot plot de Rodamina vs SLAM y un histograma para Rodamina representativos.

Para estudiar un posible rol de SLAM en la fagocitosis, se evaluó la co-expresión SLAM-Rodamina. Como se observa en la **Figura 7**, en respuesta a

la estimulación con CD Calor la mayoría de las células fagocíticas (Rodamina⁺) co-expresan SLAM.. Lo mismo ocurre frente a CD Formol, sin embargo como se describió previamente frente a este estímulo se observaron muy bajos porcentajes de fagocitosis. Los resultados demuestran que las células THP-1 son capaces de fagocitar a la bacteria inactiva por calor. Sin embargo, se necesitan más estudios para determinar la causa de la menor fagocitosis en el extracto inactivado con formol y cuál es el rol de SLAM en este proceso.

Caracterización de la respuesta T: regulación de citoquinas y moléculas coestimuladoras

Regulación de IFN- γ por *C. difficile*

La respuesta inmune adaptativa determina la resolución de la CDI, por lo que las inmunoterapias podrían tener un rol clave para frenar esta epidemia.⁵¹ Sin embargo, existen pocos estudios que evalúen la respuesta de individuos infectados y el rol de poblaciones T pro-inflamatorias como las células Th1 y Th17. Estudios previos indican que la respuesta inmune de pacientes con CDI recurrente falla en la eliminación de la bacteria y existe un desbalance hacia una respuesta inflamatoria. Recientemente se demostraron diferencias fenotípicas en las subpoblaciones CD3⁺ entre individuos CDI positivos y negativos y una mayor plasticidad de las poblaciones Th en los individuos CDI⁺.³⁶ Sin embargo, en estos estudios no se realizó una estimulación antígeno específica, así como tampoco estudiaron cómo estas poblaciones son reguladas. Por otro lado, ha sido demostrado que la neutralización de IFN- γ

protege frente a la enteritis inducida por TcdA en el modelo de ratón.⁵² Sin embargo, existen muy pocos estudios que evalúen el rol del IFN- γ en la respuesta inmune frente a *C. difficile* en humanos. Teniendo en cuenta estos antecedentes, evaluamos la producción de IFN- γ en respuesta a *C. difficile*. Para esto CMSP de dadores sanos (DS) fueron estimuladas en presencia/ausencia de diferentes concentraciones de *C. difficile* inactivado por calor o formol (CD Calor y CD Formol) por distintos tiempos. La producción de IFN- γ fue evaluada por ELISA en los sobrenadantes de cultivo.

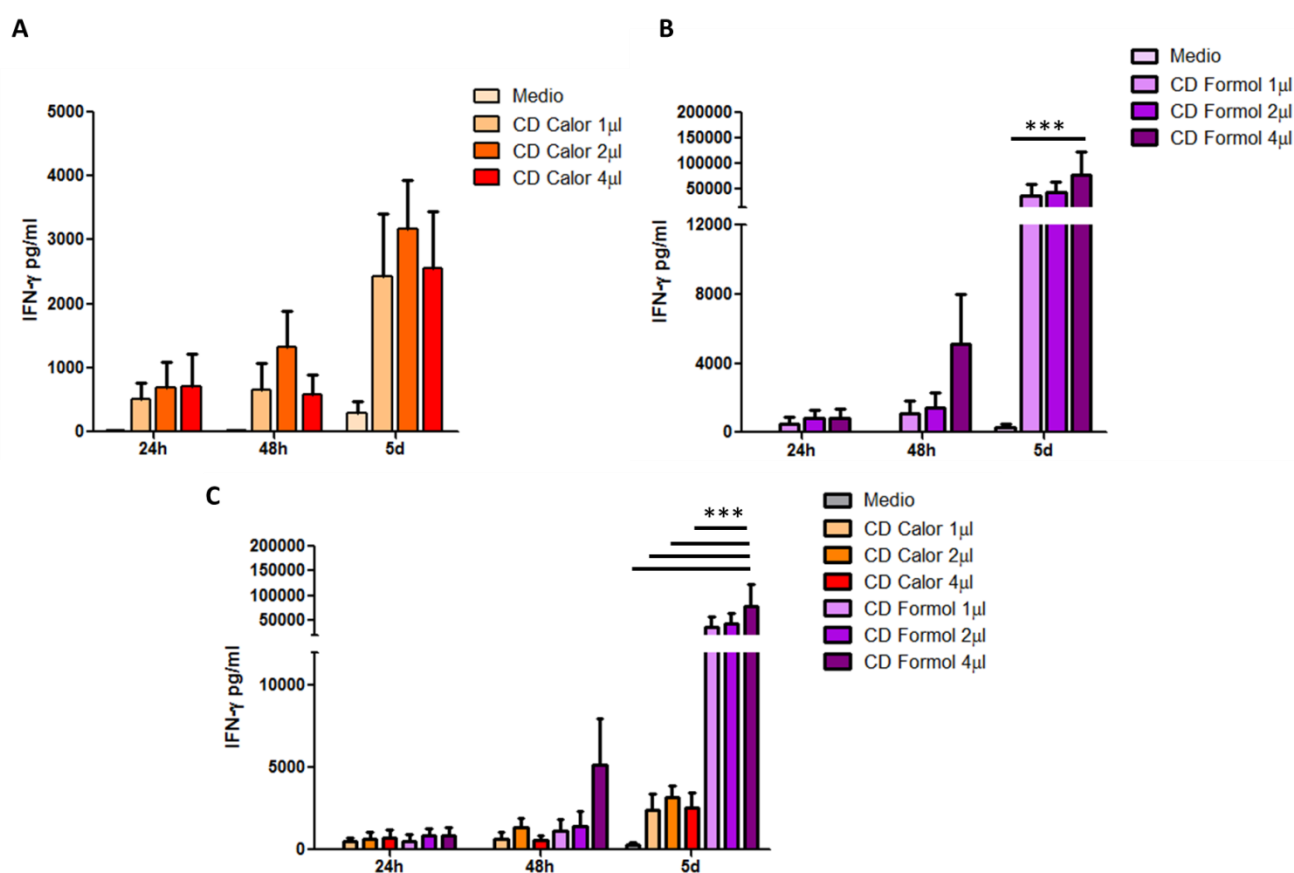


Figura 8. Producción de IFN- γ en respuesta a *C. difficile*. CMSP de DS fueron estimuladas con diferentes concentraciones de *C. Difficile* inactivado por calor (CD Calor) o con formol (CD Formol) por 24h, 48h y 5d. La producción de IFN- γ fue determinada en los sobrenadantes de cultivo por ELISA. **A, B)** Cinética de la producción de IFN- γ para CD Calor (**A**) o CD Formol (**B**). **C)** Cinética completa de la producción de IFN- γ para ambos extractos, CD Calor y CD Formol. Las barras representan la Media $\pm$ SEM de la producción de IFN- γ (pg/ml). (***, $P < 0,001$)

Se observó una clara tendencia de aumento de IFN- γ desde las 24h hasta los 5 días de estímulo con CD Calor o CD Formol, siendo los 5 días el tiempo de mayor producción de IFN- γ (**Figura 8 y 8C**).

Cuando se estimuló con CD Calor, se evidenció una mayor producción de IFN- γ con 2 μ l del extracto de CD comparado con 1 μ l o 4 μ l, tanto a las 48 hs como a los 5 días (**Figura 8A**). Mientras que el estímulo con CD Formol mostró un efecto dosis dependiente, con los mayores niveles de producción de IFN- γ con 4 μ l del extracto de la bacteria tanto a las 48h como a los 5 días (**Figura 8B y 8C**). Asimismo, la estimulación con CD Formol produjo un aumento significativo de la producción de IFN- γ a los 5 días en las tres concentraciones estudiadas (**Figura 8C**).

Así, los resultados demuestran que en DS las diferentes preparaciones de *C. difficile* son capaces de inducir la producción de IFN- γ . Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, el resto de los experimentos fueron realizados con 2 μ l de los extractos de la bacteria.

Del mismo modo, a partir de CMSP de diferentes DS, se cuantificó la expresión del ARNm de IFN- γ y se normalizó a la expresión del gen constitutivo GAPDH. En concordancia con lo visto anteriormente, la estimulación con *C. difficile* indujo la expresión del ARNm de IFN- γ (**Figura 9**). El pico de expresión del ARNm de IFN- γ cuando se realizó el estímulo con CD Formol se produjo a los 5 días, mientras que cuando se estimuló con CD Calor la mayor expresión se observó luego de 48 hs de estímulo (**Figura 9**). En conjunto los resultados obtenidos demuestran que *C. difficile* lleva a una regulación positiva del IFN- γ , citoquina pro-inflamatoria característica de la respuesta Th1.

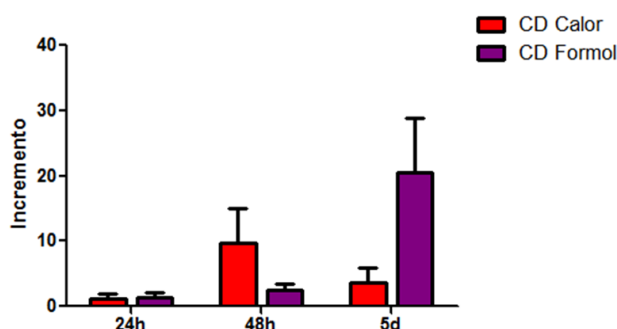


Figura 9. Expresión de ARNm de IFN- γ en respuesta a *C. difficile*. CMSP de DS fueron estimuladas con el extracto de *C. difficile* inactivado por calor (CD Calor) o con formol (CD Formol) por 24h, 48h y 5d. La expresión de ARNm de IFN- γ fue determinada por PCR en tiempo real. Las barras representan la Media $\pm$ SEM de la Tasa de Incremento de IFN- γ . Los valores fueron calculados mediante el método de cuantificación de expresión comparativo, luego de la normalización con respecto a la expresión de GAPDH: Tasa de incremento = $2^{-\Delta\Delta Ct}$, donde $\Delta Ct = [Ct_{(IFN-\gamma)} - Ct_{(GAPDH)}]$ y $\Delta\Delta Ct = [\Delta Ct_{\text{estímulo}} - \Delta Ct_{\text{no estímulo}}]$.

Finalmente, para evaluar si el IFN- γ era producido por las células T, se determinó el porcentaje de células productoras de IFN- γ a los 5 días por citometría de flujo intracelular. Para esto las CMSP de DS fueron estimuladas por 5 días en presencia/ausencia de los extractos de *C. difficile* (CD Calor y CD Formol), en las últimas 5 horas de cultivo se adicionó un inhibidor del transporte del Golgi para permitir la acumulación de la citoquina. La producción de IFN- γ fue evaluada por citometría de flujo en las células T, utilizando para esto anticuerpos específicos para CD3 y CD4. Observamos que el IFN- γ aumenta en células T, específicamente en las células T CD4 positivas frente al estímulo con CD Formol (**Figura 10**), sin embargo no parece haber aumento de esta citoquina cuando se estimula con CD Calor comparado con el medio. Como se observa en la **Figura 10C**, la estimulación con *C. difficile* no induce la producción de IFN- γ por las células T CD8⁺.

Así, en conjunto nuestros resultados demuestran que CD calor y CD Formol son capaces de inducir la producción de IFN- γ por las CMSP de DS. Sin embargo, la cinética observada es diferente con los dos extractos y sólo CD Formol parecería inducir la producción de IFN- γ en las células T.

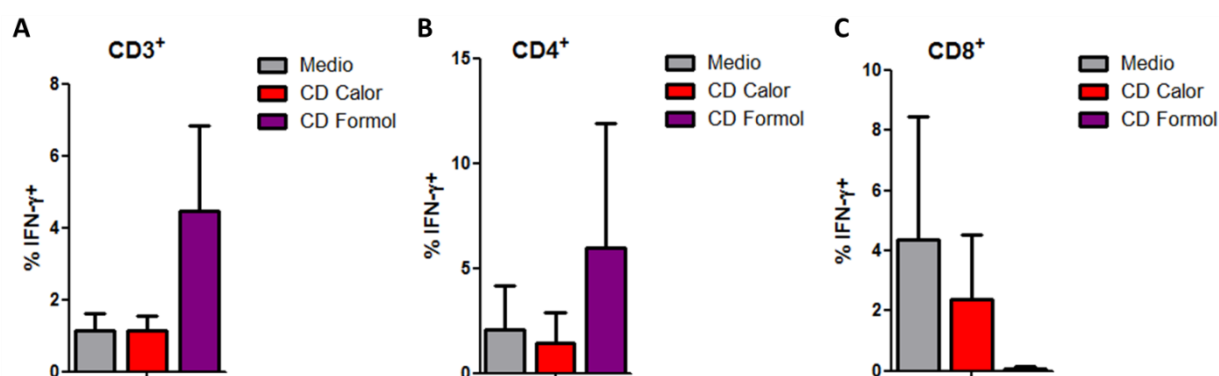


Figura 10. Análisis de la producción de IFN- γ por las células T en respuesta a *C. difficile*. CMSP de DS fueron incubadas con el extracto de *C. difficile* inactivado por calor (CD Calor) o con formol (CD Formol) durante 5d. La producción de IFN- γ en las células T fue determinada por citometría de flujo. Para esto se realizó el análisis, primero seleccionando los linfocitos de acuerdo a los parámetros de tamaño y granularidad (FSC vs SSC), luego se seleccionaron las células CD3 (A), CD4 (B) o CD8 (C) positivas, dentro de las cuales se analizó la expresión de IFN- γ . La figura muestra la Media $\pm$ SEM del porcentaje de células CD3⁺IFN- γ ⁺ (A), CD3⁺CD4⁺IFN- γ ⁺ (B), CD3⁺CD4⁻IFN- γ ⁺ (C).

Co-expresión de IFN- γ e IL-17 en respuesta a *C. difficile*

Dado el carácter pro-inflamatorio de la infección por *C. difficile*, además de estudiar el IFN- γ , decidimos caracterizar la producción de IL-17 y su producción junto con IFN- γ . Las células Th17, que producen selectivamente IL-17A son cruciales en la defensa del hospedador frente a patógenos extracelulares. Ha sido demostrado que la IL-17 promueve el reclutamiento de los neutrófilos y el daño del epitelio durante las respuestas inflamatorias tanto en el pulmón como en el intestino.⁵³ La IL-23, una citoquina que mantiene la supervivencia de las

células Th17, se destaca como una citoquina capaz de inducir inflamación patogénica durante la infección por *C. difficile* en ratón⁵⁴, pero estos trabajos no evalúan la respuesta inmune en la infección crónica, ni su impacto sobre las respuesta Th17. Más aún, en contraste a los resultados de Buonomo y col, ha sido propuesto que una respuesta Th17 deficiente podría de hecho mediar la severidad de la enfermedad.³³ En los últimos años, ha sido descripta una plasticidad funcional entre los linajes Th1 y Th17, un proceso que parecería tener un rol central en diferentes condiciones inflamatorias, incluidas aquellas que afectan el sistema gastrointestinal.³⁷ Sin embargo, no existen estudios que evalúen el rol de las respuesta Th1/Th17 en la CDI. En este trabajo evaluamos la producción de IFN- γ e IL-17 en células T de DS estimuladas con *C. difficile*.

Si bien, no se observaron diferencias en cuanto al porcentaje de células productoras de IL-17 frente al estímulo con CD Calor comparado con el medio sin estímulo, sí se observó un aumento de la producción de esta citoquina cuando se estimuló con CD Formol. Por otra parte, lo mismo se observó con el porcentaje de células T CD4⁺ IFN- γ ⁺ IL-17⁺. El estímulo con CD Formol lleva a un mayor número de células T CD4⁺ IFN- γ ⁺ IL-17⁺ con respecto al medio.

En conjunto los resultados obtenidos demuestran que *C. difficile* induce la activación de las células T, y que más del 70% de las células productoras de citoquinas son en realidad doble positivas (productoras de IFN- γ e IL17). Esto podría sugerir una respuesta T Th1 y Th17 frente a la infección por *C. difficile* y una posible plasticidad Th1/Th17.

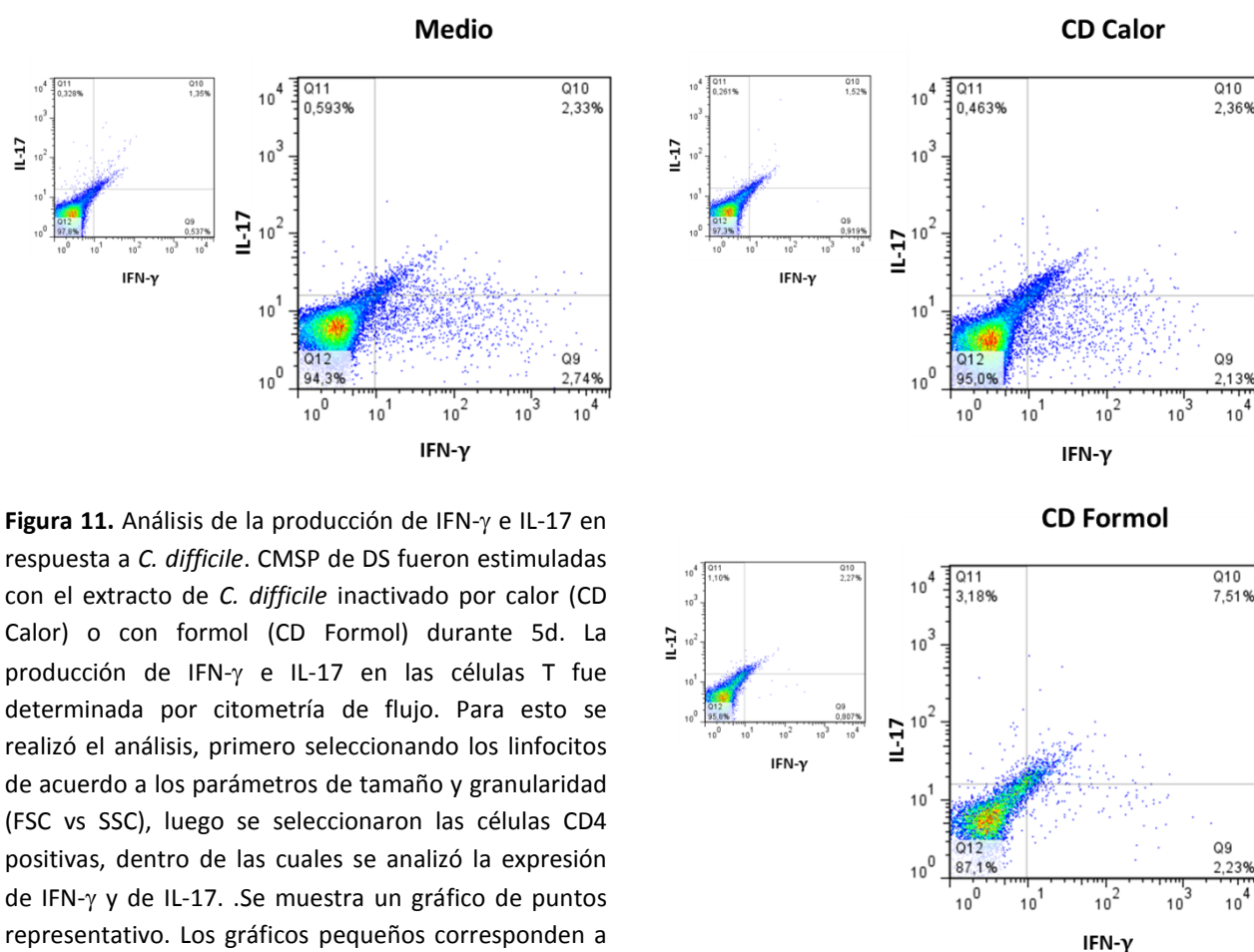


Figura 11. Análisis de la producción de IFN- γ e IL-17 en respuesta a *C. difficile*. CMSP de DS fueron estimuladas con el extracto de *C. difficile* inactivado por calor (CD Calor) o con formol (CD Formol) durante 5d. La producción de IFN- γ e IL-17 en las células T fue determinada por citometría de flujo. Para esto se realizó el análisis, primero seleccionando los linfocitos de acuerdo a los parámetros de tamaño y granularidad (FSC vs SSC), luego se seleccionaron las células CD4 positivas, dentro de las cuales se analizó la expresión de IFN- γ y de IL-17. Se muestra un gráfico de puntos representativo. Los gráficos pequeños corresponden a los controles de isotipo correspondientes.

Regulación de la expresión de ICOS, SLAM y PD-1

Las moléculas coestimuladoras son esenciales en la activación T, para continuar la caracterización de las respuesta T frente a *C. difficile*, se decidió estudiar la regulación de las moléculas coestimuladoras ICOS, SLAM y PD-1.

Las CMSP de los DS fueron estimuladas por 5 días en presencia/ausencia de CD Calor o CD Formol y la expresión de las moléculas coestimuladoras fue determinada en las células T por citometría de flujo. La estimulación con CD Calor o CD Formol no indujo la expresión de ICOS (**Figura 12**). Esto se observó ya sea para las células T CD3 totales, como para las células T CD4 y

T CD8 (**Figuras 12A, B y C**). Se detectaron altos niveles basales de expresión de ICOS, alrededor de un 50% de las células T fueron positivas para esta molécula coestimuladora; la expresión de ICOS se encontró mayormente en las células T CD4 (**Figura 12D**).

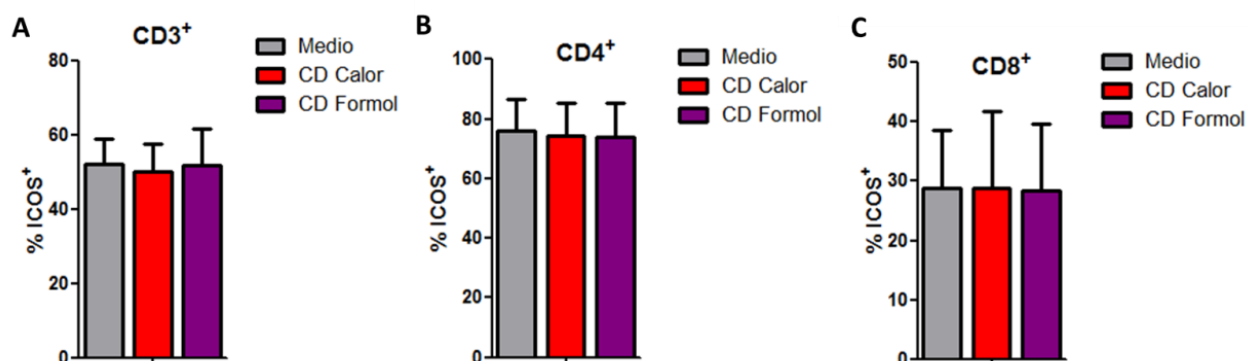


Figura 12. Análisis de la expresión de ICOS en respuesta a *C. difficile*. Las CMSP de DS fueron estimuladas con el extracto de *C. difficile* inactivado por calor (CD Calor) o con formol (CD Formol) durante 5d. La expresión de ICOS fue analizada en las células T por citometría de flujo. Para esto se realizó el análisis, primero seleccionando los linfocitos de acuerdo a los parámetros de tamaño y granularidad (FSC vs SSC), luego se seleccionaron las células CD3 (**A**), CD4 (**B**) o CD8 (**C**) positivas, dentro de las cuales se analizó la expresión de ICOS. La figura muestra la Media $\pm$ SEM del porcentaje de células CD3⁺ICOS⁺ (**A**), CD3⁺CD4⁺ICOS⁺ (**B**), CD3⁺CD8⁺ICOS⁺ (**C**).

En cuanto a la expresión de SLAM, se observó un ligero aumento de las células SLAM positivas luego del estímulo con CD Formol cuando se analizan las células T CD4 positivas y CD3 totales (**Figura 13A y B**). En las células T CD8 no se observan diferencias con respecto a la expresión de SLAM frente a CD Calor o CD Formol en relación al medio.

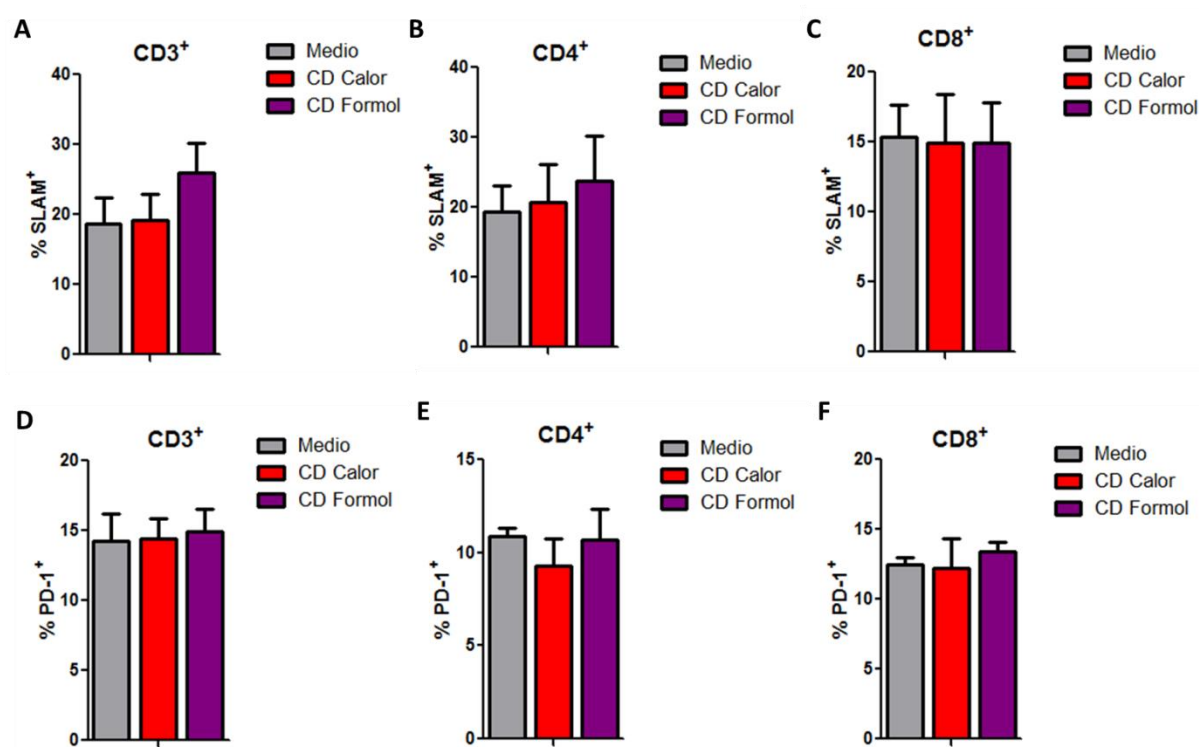


Figura 13. Análisis de la expresión de SLAM y de PD-1 en respuesta a *C. difficile*. Las CMSP de DS fueron estimuladas con el extracto de *C. difficile* inactivado por calor (CD Calor) o con formol (CD Formol) durante 5d. . La expresión de SLAM (A-C) o de PD-1 (D-F) fue analizada en las células T por citometría de flujo. Para esto se realizó el análisis, primero seleccionando los linfocitos de acuerdo a los parámetros de tamaño y granularidad (FSC vs SSC), luego se seleccionaron las células CD3, CD4 o CD8 positivas, dentro de las cuales se analizó la expresión de las moléculas coestimuladoras. **A, B, C)** Porcentaje de células CD3⁺SLAM⁺, CD3⁺CD4⁺SLAM⁺ y CD3⁺CD8⁺ SLAM⁺, respectivamente. **D, E, F)** Porcentaje de células CD3⁺PD-1⁺, CD3⁺CD4⁺PD-1⁺ y CD3⁺CD8⁺PD-1⁺, respectivamente.

Con respecto a PD-1, se observa una leve disminución de la expresión de PD-1 en las células CD4 positivas en respuesta a la estimulación con CD Calor; mientras que no hay diferencia con CD Formol comparado con el medio sin estimular. En las células T CD8 no se observaron diferencias entre CD Calor y CD Formol en relación al medio, como tampoco se observaron cambios en las células T totales (**Figuras 13D, E, F**).

Cuando se analizó la co-expresión de SLAM-PD-1 se observó un ligero aumento de las células tanto CD4 como CD8 positivas y en las CD3 totales que co-expresan SLAM-PD-1 cuando se estimuló con CD Formol. Sin embargo, con

CD Calor como estímulo no se observó modulación de la co-expresión SLAM-PD-1 (**Figuras 14A, B, C**).

De la misma manera se analizó la co-expresión ICOS-SLAM en células T totales (**Figura 14D**). Como se pudo observar en el análisis previo de SLAM-PD-1, el tratamiento con CD Formol provoca un ligero aumento de las células que son $CD3^+ICOS^+SLAM^+$. Más aún, alrededor del 50% de las células que expresan SLAM expresan además ICOS.

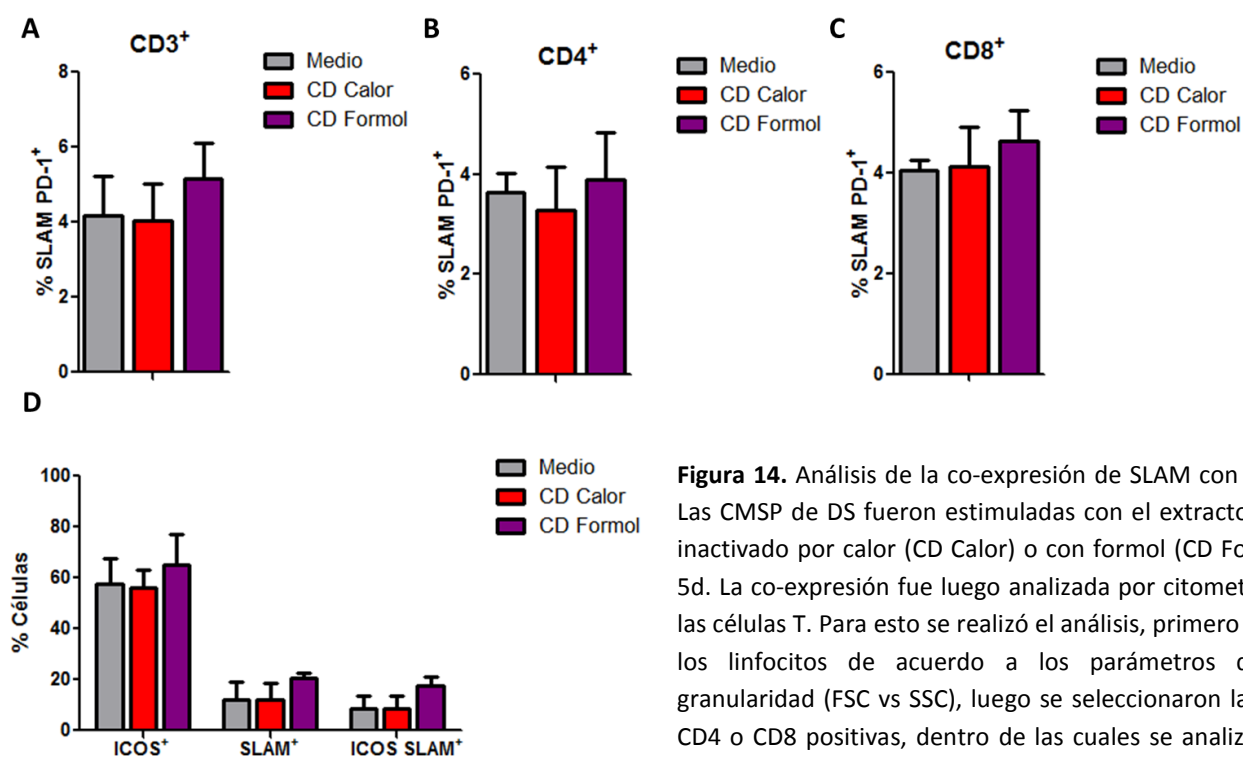


Figura 14. Análisis de la co-expresión de SLAM con PD-1 o ICOS. . Las CMSP de DS fueron estimuladas con el extracto de *C. difficile* inactivado por calor (CD Calor) o con formol (CD Formol) durante 5d. La co-expresión fue luego analizada por citometría de flujo en las células T. Para esto se realizó el análisis, primero seleccionando los linfocitos de acuerdo a los parámetros de tamaño y granularidad (FSC vs SSC), luego se seleccionaron las células CD3, CD4 o CD8 positivas, dentro de las cuales se analizó la expresión de SLAM y de PD-1 (**A-C**). La co-expresión SLAM-ICOS fue analizada en las células T CD3⁺ (**D**). El gráficos muestra la Media $\pm$ SEM del porcentaje de células (**A**) CD3⁺SLAM⁺PD-1⁺, (**B**) CD3⁺CD4⁺SLAM⁺PD-1⁺ y (**C**) CD3⁺CD8⁺SLAM⁺PD-1⁺ **D**) Porcentaje de células CD3⁺ICOS⁺SLAM⁺, CD3⁺ICOS⁺SLAM⁺ y CD3⁺ICOS⁺SLAM⁺, respectivamente.

En conjunto los resultados muestran una modesta regulación de la expresión de SLAM y de PD-1 sólo en las células T estimuladas con *C. difficile* inactivado por tratamiento con Formol.

Regulación de la expresión de ICOS, SLAM y PD-1 en células T productoras de IFN- γ

Finalmente, se estudió la expresión de cada molécula coestimuladora ICOS, SLAM y PD-1 junto con la producción de IFN- γ en respuesta a *C. difficile*. En la **Figura 15A** se observan las células CD3 positivas que expresan SLAM y producen IFN- γ . La estimulación con CD Formol indujo un aumento de las células CD3⁺SLAM⁺IFN- γ ⁺, mientras que no se observaron diferencias con CD Calor. También se observó un aumento significativo del número de células CD3⁺SLAM⁺ en comparación con CD Calor y con el medio sin estímulo (en concordancia con los resultados obtenidos previamente, **Figura 13A**).

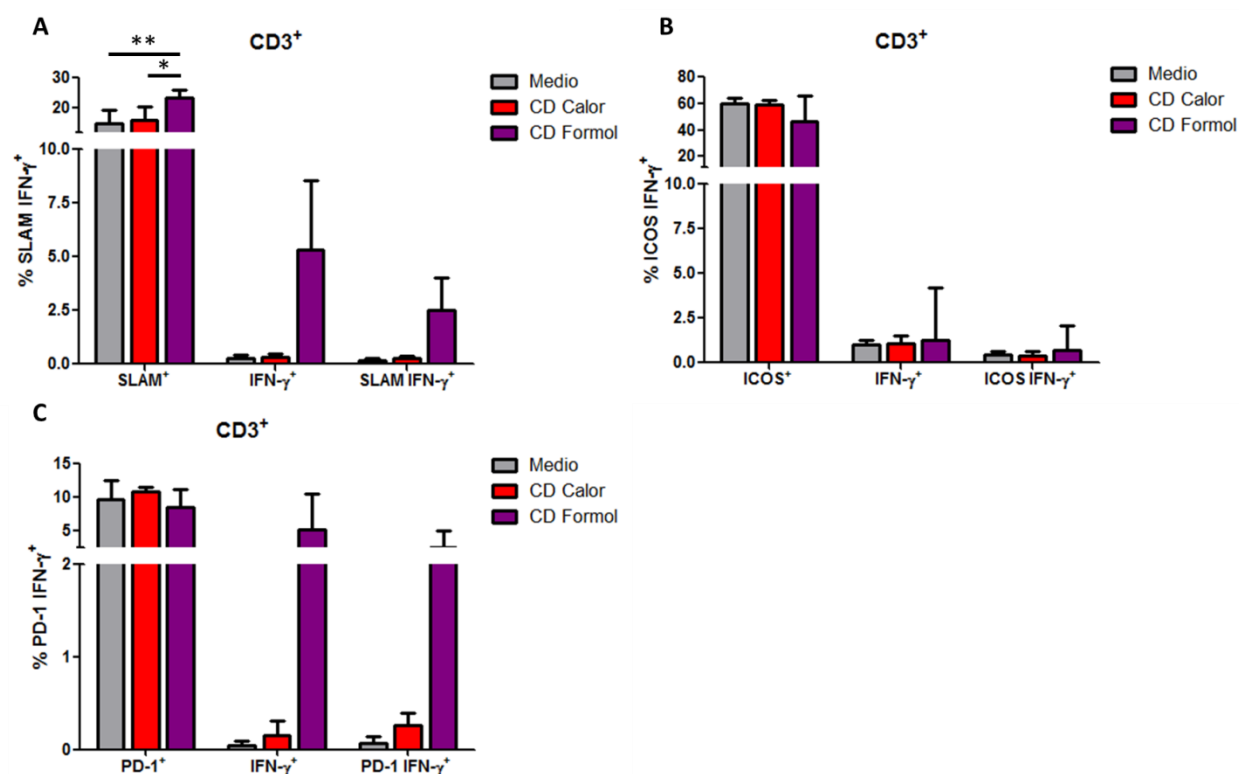


Figura 15. Análisis de expresión de SLAM, ICOS y PD-1 en células productoras de IFN- γ en respuesta a la estimulación con *C. difficile*. Las CMSP de DS fueron incubadas con el extracto de *C. difficile* inactivado por calor (CD Calor) o con formol (CD Formol) durante 5d. La co-expresión de las moléculas coestimuladoras en las células productoras de IFN- γ fue analizada por citometría de flujo. Para esto se realizó el análisis, primero seleccionando los linfocitos de acuerdo a los parámetros de tamaño y granularidad (FSC vs SSC), luego se seleccionaron las células CD3 positivas, dentro de las cuales se analizó la expresión de las moléculas coestimuladoras y de FN- γ . El gráfico muestra la Media $\pm$ SEM del porcentaje de células (A) CD3⁺SLAM⁺IFN- γ ⁻, CD3⁺SLAM⁺IFN- γ ⁺ y CD3⁺SLAM⁺IFN- γ ⁺, (B) CD3⁺ICOS⁺IFN- γ ⁻, CD3⁺ICOS⁺IFN- γ ⁺ y CD3⁺ICOS⁺IFN- γ ⁺ y (C) CD3⁺PD-1⁺IFN- γ ⁻, CD3⁺PD-1⁺IFN- γ ⁻, CD3⁺PD-1⁺IFN- γ ⁺. (*, P<0,05; **, P<0,01)

El porcentaje de células CD3⁺ICOS⁺IFN- γ ⁺ no varía frente al tratamiento con CD Calor o CD Formol en relación al medio (**Figura 15B**).

La expresión de PD-1 en aquellas células tratadas y sin tratar luego de 5 días no presenta variación. Sin embargo, las células PD-1 positivas productoras de IFN- γ aumentaron cuando se estimularon con CD Formol comparado con el medio, no así con CD Calor (**Figura 15C**).

Los resultados demuestran que sólo la estimulación con CD Formol induce un aumento de las células SLAM⁺IFN- γ ⁺ y de las células PD-1⁺IFN- γ ⁺, lo cual

podrían indicar que la bacteria es capaz de activar a las células T y que estas moléculas coestimuladoras podrían estar implicadas en la regulación del IFN- γ en la respuesta inmune frente a *C. difficile*.

DISCUSIÓN

La infección causada por *Clostridium difficile* es una de las principales causas de infecciones nosocomiales. Actualmente, el diagnóstico de la CDI se realiza por la combinación de síntomas clínicos y un test positivo para las toxinas de *C. difficile* en materia fecal o hallazgos histológicos o endoscópicos de colitis pseudomembranosa.¹² El uso de ensayos de baja sensibilidad como el EIA para las toxinas A/B resulta en un alto número de falsos negativos y en el pedido de múltiples tests para el mismo paciente por parte de los médicos lo cual retrasa el diagnóstico e incrementa los costos. El diagnóstico rápido y preciso de la CDI es esencial para el control nosocomial de la CDI. Más aún en los últimos años se ha destacado la importancia de la portación asintomática de *C. difficile*.

La implementación de la PCR no sólo mejorará y acelerará el diagnóstico sino que nos permitirá lograr un mayor conocimiento de la epidemiología de *C. difficile* en nuestra región, lo cual podría proveer herramientas para lograr un mejor control de la infección. Existen muy pocos reportes acerca de la incidencia de CDI en nuestro país y ninguno en nuestra región. La amplificación de ácidos nucleicos es actualmente el pilar fundamental en el diagnóstico de la CDI dado que los resultados pueden obtenerse en 1h, con una mayor sensibilidad que el EIA.¹⁴

La manera más sencilla de diagnosticar la CDI sería a través del uso de un único test rápido capaz de predecir el estatus de la enfermedad. Sin embargo, como ha sido reportado por *Crobach y col.* en un meta-análisis publicado recientemente, donde se evaluó la especificidad y sensibilidad de varios ensayos comerciales para el diagnóstico de la CDI comparado con los métodos de referencia; esto no es posible en el caso de la CDI.⁴⁹ En el caso de

los test específicos los valores predictivos positivos (PPVs) son inadecuados cuando la prevalencia de la enfermedad es baja.⁴⁹ Si los EIAs fueran utilizados en situaciones endémicas (prevalencia de CDI del 5% en la población testeada), se observaría un alto porcentaje (19%) de pacientes con un test falso positivo.⁴⁹ Más aún, tanto la determinación de la GDH por EIAs como los ensayos de amplificación del ADN no detectan toxina libre, por lo que la utilización de este único test en conjunto con los síntomas clínicos para discernir pacientes CDI de portadores asintomáticos no es una aproximación óptima: los pacientes colonizados por cepas de *C. difficile* toxigénicas podrían desarrollar diarrea por otras causas, y no existen síntomas clínicos específicos que permitan diferenciar la CDI de otras causas de diarrea.⁴⁹ Así, ha sido propuesto que la mejor alternativa es combinar dos test en un algoritmo de manera de optimizar el diagnóstico de la CDI.⁴⁹ La ventaja de esto es que los test pueden combinarse de manera de disminuir el porcentaje de falsos positivos. Para esto deben analizarse todas las muestras con un primer test que posea una alta sensibilidad como el diagnóstico por amplificación del ADN. De esta manera el test permitiría clasificar con un resultado negativo confiable los no-CDI y las muestras con resultados negativo no deben ser analizadas nuevamente. Teniendo en cuenta estos antecedentes, nos propusimos realizar la puesta a punto de la PCR de la TcdB de *C. difficile*. Para validar este ensayo, los resultados obtenidos fueron comparados con los obtenidos por un test de diagnóstico molecular comercial previamente validado: Amplivue (Quidel), el cual demostró una muy alta sensibilidad y alta especificidad en el meta-análisis realizado por Crobach y col.⁴⁹ Siguiendo las recomendaciones de la Sociedad Europea de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas el

segundo test a utilizar debería ser un test con alta especificidad como los EIA para las Toxinas A/B, dado que este ensayo no sólo es específico sino que permite la detección de la toxina libre.⁴⁹ Así, el EIA se utiliza como test confirmatorio sólo para las muestras positivas.⁴⁹ Los resultados mostrados previamente muestran concordancia en los distintos métodos: EIA Techlab C. diff Quik Chek Complete, PCR de punto final para TcdB y kit AmplieVue (Quidel). Más pruebas son necesarias para validar definitivamente el método de diagnóstico basado en una PCR de punto final sencilla que no requiere un paso previo de purificación del ADN molecular, mucho más económica que los tests comerciales y más económica incluso que el EIA para las toxinas, y de esta manera poder aplicar el algoritmo de diagnóstico mencionado anteriormente. En este trabajo hemos podido realizar la puesta a punto de la PCR e incluso comparar los resultados obtenidos con otro método de diagnóstico molecular. Teniendo en cuenta estos resultados, nuestro objetivo a futuro es realizar la PCR en todas las muestras de materia fecal no formada admitidas al Hospital tengan o no sospecha clínica de CDI; ya que ha sido demostrado que el ensayo empírico de todas las muestras de materia fecal no formadas admitidas al laboratorio incrementa la eficiencia del diagnóstico. En una primera etapa realizaremos la validación por comparación con el método AmplieVue, para corroborar la sensibilidad de nuestra PCR. Como se describió previamente, las muestras positivas serán confirmadas por EIA. La introducción de este método diagnóstico en los centros de salud; no sólo permitirá mejorar y agilizar el diagnóstico de la CDI sino también establecer la incidencia de la infección sintomática y asintomática por *C. difficile* en diferentes centros de salud de la región.

Por otro lado, teniendo en cuenta la importancia de la CDI como una urgencia para la Salud Pública; y que mientras que la incidencia ha incrementado en la última década la eficacia del tratamiento ha disminuido; es fundamental conocer la respuesta inmune frente a la CDI con el objetivo de establecer nuevos blancos terapéuticos. Para estudiar la respuesta inmune y poder realizar los ensayos *in vitro* se prepararon en primer lugar extractos de la bacteria por inactivación de la bacteria viva con calor o formol. Como el objetivo, era evaluar el rol de los diferentes componentes de la bacteria en la modulación de la respuesta inmune; lo cual podría ser enmascarado por la acción de las toxinas de *C. difficile*, evaluamos la citotoxicidad celular de los extractos. Para esto, las CMSP de Dadores Sanos (DS) fueron estimuladas por diferentes tiempos y la apoptosis fue evaluada utilizando Anexina V e Ioduro de Propidio. Los resultados mostraron porcentaje de apoptosis similares a los observados en las células sin estímulo, lo cual podría indicar una escasa presencia/actividad de las toxinas. Sin embargo, un ensayo de citotoxicidad *in vitro* es necesario para descartar completamente la presencia de toxinas en los extractos.

La CDI en ratones da como resultado una inflamación innata del intestino grueso, caracterizada por un aumento en la expresión de citoquinas inflamatorias, histopatología marcada y reclutamiento rápido y robusto de células inmunes innatas incluyendo monocitos al intestino grueso. Los monocitos son mediadores claves de las respuestas inflamatorias en el tracto gastrointestinal. El reclutamiento de monocitos suele asociarse con el desarrollo de daño inflamatorio y epitelial en los sitios de la mucosa.⁵⁵ Además de las células epiteliales intestinales, los monocitos y macrófagos, los

mastocitos intestinales y las sustancias liberadas por el sistema entérico nervioso podrían también ser claves en la inducción de la respuesta inmune innata frente a *C. difficile*.⁵⁶ Sin embargo, la mayoría de los estudios utilizan modelos murinos de intoxicación. En este trabajo evaluamos en primer la respuesta de monocitos de dadores sanos estimulados con *C. difficile*. Observamos que la estimulación con *C. difficile* induce la expresión de SLAM y la producción de TNF- α en los monocitos. Más aún, la mayoría de los monocitos productores de TNF- α expresan SLAM; lo que concuerda con el carácter inflamatorio de la infección. Por otro lado, los resultados obtenidos con las células THP-1, demuestran que los macrófagos son capaces de fagocitar a la bacteria, y que un porcentaje de dichas células fagocíticas expresan SLAM en su superficie, destacando un posible rol de SLAM en el mecanismo de fagocitosis. Sin embargo, estudios adicionales con un inhibidor del transporte de las vesículas endocíticas, como la citocalasina D, son necesarios para confirmar la fagocitosis de *C. difficile*.

Del mismo modo, más estudios se requieren para evaluar las diferencias obtenidas en la fagocitosis entre el extracto de la bacteria inactivada por calor o con formol. *Barrionuevo y col.* observaron que la modulación de la fagocitosis y de CD64, receptor de IgG involucrado en la fagocitosis, por *B. abortus* no dependía de la viabilidad de la bacteria, sino de un componente bacteriano estructural, ya que también se indujo por *B. abortus* muerta por calor.⁵⁷ Las diferencias observadas en la activación de los monocitos y en la fagocitosis entre los extractos de *C. difficile* podrían deberse a diferente disponibilidad o conformación de ciertos componentes entre el extracto de la bacteria inactivado por formol y el inactivado por calor. Se necesitan más estudios para

caracterizar el/los mecanismos y los componentes de la bacteria involucrados en la activación de los monocitos/macrófagos.

Por otro lado, *Berger y col.* demostraron que SLAM no sólo funciona como una molécula coestimuladora en los macrófagos, sino también como un sensor microbiológico controlando la actividad del complejo NADPH-oxidasa NOX2 y la maduración fagolisosomal después de la interacción con las proteínas de la membrana externa OmpC y OmpF de las bacterias Gram-negativas. En otras palabras, SLAM regularía la muerte de bacterias Gram-negativas por los macrófagos.⁵⁰ Si bien *C. difficile* es una bacteria Gram-positiva, las células THP-1 diferenciadas a macrófagos fagocitarían a *C. difficile*, y la expresión de SLAM en dicho proceso propone nuevos objetivos para seguir investigando el rol de SLAM no sólo como molécula coestimuladora, sino también como un sensor microbiológico.

Por otra parte, *van Driel y col.* concluyeron que SLAM contribuye al desarrollo de colitis en ratones.⁵⁸ Observaron que SLAM regula indirectamente la migración de monocitos y macrófagos en los tejidos intestinales inflamados y que los anticuerpos que inhiben SLAM reducen la colitis en ratones⁵⁸ De esta manera, SLAM podría tener un rol negativo en la inflamación producida por *C. difficile* y más estudios son necesarios para determinar su rol en esta infección.

El IFN- γ es un potente mediador de la inflamación innata en los sitios de la mucosa, incluso en el tracto gastrointestinal.⁵⁵ *McDermot y col.* observaron un aumento de la expresión de IFN- γ en la mucosa del colon de ratones en respuesta a la infección por *C. difficile*.⁵⁵ Además, un estudio reciente de *Abt y col.* sugirió un rol crítico de células linfoides innatas de tipo I (ILC1) productoras de IFN- γ en la mediación de la supervivencia del hospedador durante la CDI.⁵⁹

Más importante aún, demostraron que los ratones Rag^{-/-} IFN- γ ^{-/-} experimentaban un aumento en la mortalidad después de la infección por *C. difficile*, lo que sugiere que la señalización innata del IFN- γ es crítica para la supervivencia del hospedador en respuesta a la infección por *C. difficile*.⁵⁹ Estos datos podrían sugerir que el IFN- γ es protector durante la colitis inducida por *C. difficile* a través de mecanismos independientes de expresión de citoquinas inflamatorias y el reclutamiento de granulocitos.⁵⁵

Por otra parte, el IFN- γ es característico de la respuesta T, principalmente del perfil Th1. A diferencia de lo citado previamente, *Ishida y col.* estudiaron la respuesta T generada por *C. difficile* y demostraron el rol esencial del IFN- γ en la patogénesis de la enteritis inducida por la TcdA de *C. difficile* en un modelo *in vivo*.⁶⁰ Observaron que los ratones KO para el IFN- γ exhiben una enteritis atenuada y más aún, la administración de un anticuerpo neutralizante anti-IFN- γ impidió el desarrollo de la enteritis inducida por la TcdA. Los autores proponen al IFN- γ como un target molecular para prevenir y/o tratar la colitis asociada a *C. difficile*.⁶⁰

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran un aumento de la producción de IFN- γ frente al estímulo con *C. difficile*. Se observó una cinética de producción de esta citoquina diferente entre CD Calor y CD Formol. Más aún, la estimulación con CD Formol indujo la producción de IFN- γ por las células T; sin embargo para confirmar que las células Th1 efectivamente son las productoras de IFN- γ se requiere realizar ensayos de citometría con anticuerpos específicos de los factores de transcripción del perfil Th1 como T-bet. Por otro lado, se debe descartar que las células productoras de IFN- γ no sean células NK, sobre todo en respuesta a la estimulación con *C. difficile*

inactivado por calor, donde el aumento de la producción de IFN- γ se observó a las 48h y no se observó producción en las células T por citometría de flujo.

La respuesta inmune observada luego del estímulo con *C. difficile* en DS podría ser producto de una respuesta de memoria producto de una infección previa por *C. difficile*. Si bien en todos los DS utilizados en este estudio se descartó el estado de portación de la bacteria; es importante tener en cuenta que las tasas de portación de *C. difficile* para los niños son del 37% de 0 a 1 mes de edad y del 30% entre 1 y 6 meses de edad. Entre los 6 y 12 meses de edad, aproximadamente el 14% de los niños están colonizados con *C. difficile* y, a los 3 años de edad la tasa es similar a la de los adultos no hospitalizados (0% a 3%).⁶¹ Más aún, el porcentaje de individuos colonizados asintóticamente en nuestro país no se conoce.

La inmunidad adaptativa contra patógenos se origina con una expansión clonal de linfocitos T específicos de antígenos que reconocen sus antígenos afines en la superficie de las CDs en órganos linfoides secundarios.⁶² Una vez que el antígeno se elimina, las células T de memoria central (TCM) y de memoria efectora (TEM) persisten para proporcionar una vigilancia inmunológica sistémica en los órganos linfoides y en los tejidos no linfoides periféricos para reaccionar rápidamente en caso de re-ataque. Para esto, las células T no sólo mantienen la "memoria" de las citoquinas que producen, sino también del sitio donde la función efectora es necesaria como el caso de las células T de memoria que migran a la piel o el intestino.⁶² La migración de las células T depende de la expresión de un conjunto particular de selectinas, receptores de quemoquinas e integrinas que determinan las etapas de extravasación y posicionamiento en diferentes microambientes tisulares. Recientemente se ha

demostrado que las células T de memoria específicas para *Candida albicans* están presentes casi exclusivamente en el subgrupo de células T CCR6⁺CCR4⁺ que producen IL-17, mientras que las células T de memoria específicas de derivados de proteínas purificadas de *Mycobacterium tuberculosis* están presentes dentro de un subconjunto de células T CCR6⁺ CXCR3⁺ que producen principalmente IFN- γ .⁶² El estudio de la presencia de marcadores de memoria nos podría dar un indicio de si la respuesta generada ante *C. difficile* puede deberse a una portación previa de la bacteria que haya generado una respuesta de memoria.

Otro citoquina involucrada en diversas acciones inflamatorias, y estudiada en el presente trabajo, es la IL-17. Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran un aumento de la producción de esta citoquina en respuesta a la estimulación con *C. difficile* inactivado con Formol. Más aún, la mayoría de las células eran productoras de IL-17 e IFN- γ .

Nakagawa y col. estudiaron el rol de esta citoquina en la CDI en un modelo de ratones KO para IL-17A e IL-17F.⁶³ Demostraron que ratones KO para IL-17 eran más resistentes a la CDI que los ratones WT. Observaron que aunque la carga bacteriana de *C. difficile* en las heces de los ratones KO y WT no fueron diferentes, los niveles de mediadores inflamatorios en el intestino grueso al día 3 después de la infección se atenuaron en los ratones KO para IL-17. Estos datos demuestran que la IL-17 endógena puede ser un factor determinante de la gravedad de la CDI en ratones.⁶³

Uno de los pocos estudios realizados en pacientes con CDI, demostró que los pacientes recurrentes presentan un aumento de fenotipos celulares IL-17/IFN- γ o IL17/Foxp3 en el análisis de CMSP.³⁶ Nuestros resultados mostraron un

fenotipo celular productor de IL-17 e IFN- γ , sin embargo, más estudios realizados con CMSP de DS y pacientes son necesarios para determinar una plasticidad Th1/Th17 y cuál sería el rol de estas poblaciones en la resolución de la enfermedad.

La señalización a través de moléculas coestimuladoras es una de las maneras críticas en las que el sistema inmune regula la activación y diferenciación de las células T, así como la generación de la memoria. Más aún, una estrategia terapéutica emergente es utilizar como blanco moléculas involucradas en el proceso de activación T utilizando agentes biológicos. Los receptores coestimulatorios y sus ligandos son blancos atractivos y pueden ser utilizados para prevenir el rechazo de los trasplantes, mantener la inmunosupresión, realizar inmunoterapias en enfermedades autoinmunes e inflamatorias, cáncer, etc. Muchos de estos agentes terapéuticos han hecho la progresión de la mesada a la clínica. La inmuno-patología en la CDI es esencialmente mediada por la respuesta inflamatoria, pero son muy pocos los estudios que exploran el rol de las poblaciones Th1 y Th17 en este contexto y menos aun los que evalúan el rol de las moléculas coestimuladoras en la CDI.

No se observó regulación de la expresión de la molécula coestimuladora ICOS en CMSP de DS frente al estímulo con *C. difficile*. Ha sido sugerido que la amplificación de la producción de citoquinas por células T efectoras es proporcional a su nivel de expresión de ICOS, y este nivel varía de acuerdo al microambiente de citoquinas; dependiendo del patógeno y del órgano afectado, la expresión de ICOS puede correlacionarse positivamente con las respuestas de tipo Th1 y Th2.⁶⁴ Wassink y col. proponen la existencia de un nuevo mecanismo de control periférico del potencial de producción de citoquinas de

las células efectoras infiltrantes de tejidos en el sitio de infección.⁶⁴ Si bien no se obtuvieron diferencias en los DS, no se debería descartar un rol de esta molécula coestimuladora en la CDI, dado que es probable encontrar un microambiente totalmente diferente en los pacientes con infección activa.

Si bien ICOS está asociado a un perfil de citoquinas Th1 o Th2, *Löhning y col.* observaron una asociación fuerte entre ICOS e IL-10 en un estudio realizado en ratones.⁶⁵ Alrededor del 50% de todas las células T capaces de generar IL-10 *in vivo* expresaron ICOS, y la IL-10 fue la citoquina dominante producida por las células T con alta expresión de ICOS.⁶⁵ Por lo tanto, ICOS podría relacionarse a una respuesta más del tipo inmunoregulador frente a la infección por *C. difficile*. A su vez los resultados muestran que mayoritariamente las células que expresan ICOS no producen IFN- γ como mediador pro-inflamatorio.

Por otra parte, los resultados muestran que luego del estímulo con CD Formol hay un aumento de células que expresan PD-1 y de células PD-1 positivas que además producen IFN- γ . Se sabe que el IFN- γ regula positivamente la expresión de PD-L1 en células tumorales. En modelos de melanoma de ratón, el IFN- γ secretado a partir de células T CD8-positivas regula positivamente PD-L1. De forma similar, en modelos de diseminación peritoneal de cáncer de ovario de ratón, se ha demostrado que el IFN- γ secretado a partir de linfocitos induce PD-L1 en células tumorales. Más aún, el IFN- γ de células estromales del ovario induce PD-L1 y promueve la progresión tumoral en el microambiente de cáncer de ovario.⁶⁶ Previamente hemos demostrado que *M. tuberculosis* induce la expresión de PD-1 en las células T y que esta molécula inhibe las producción de IFN- γ por las células Th1.⁶⁷ Los resultados obtenidos en este

trabajo podrían indicar que la *C. difficile* es capaz de activar a las células T y que estas moléculas coestimuladoras podrían estar implicadas en la regulación del IFN- γ en la respuesta inmune frente a *C. difficile*, o bien que el IFN- γ medie la expresión de las moléculas coestimuladoras. Más estudios en muestras de pacientes con CDI, portadores asintomáticos y ensayos funcionales utilizando anticuerpos bloqueantes son necesarios para dilucidar el rol de PD-1 en la infección por *C. difficile*.

También evaluamos la expresión de SLAM en las células T en respuesta a la estimulación con *C. difficile*. Como con PD-1, se observó un aumento de las células T positivas para SLAM y productoras de IFN- γ cuando se estimuló con CD Formol. Dada la característica inflamatoria de la infección por *C. difficile*, y que está reportado que SLAM aumenta la producción de IFN- γ en células Th1⁶⁸ en respuesta a *M. tuberculosis*⁶⁹⁻⁷¹, SLAM podría jugar algún rol en la expansión de las células T y la producción de IFN- γ luego de la infección por *C. difficile*. Más estudios son necesarios para determinar el rol de SLAM y su asociación con la inflamación excesiva, no sólo en monocitos/macrófagos si no también su rol en las células T durante la infección por *C. difficile*.

Los estudios realizados hasta el momento nos han permitido realizar una primera caracterización de la respuesta inmune frente a *C. difficile*. El estudio de la respuesta inmune, tanto innata como adaptativa, en pacientes con CDI y portador asintomáticos es fundamental para lograr una mejor comprensión del rol de las moléculas estudiadas en la resolución de la enfermedad.

En cuanto a la diferencias observadas entre los extractos de *C. difficile*, se observa una respuesta del tipo innata más fuerte cuando se estimula con CD Calor mientras que el estímulo con CD Formol lleva a una modulación de la

respuesta T. Esto puede deberse a que el extracto de *C. difficile* inactivado con formol presente algún antígeno capaz de inducir la modulación de la respuesta T, que se encuentra ausente en el extracto inactivado por calor.

Por otro lado, como se mencionó previamente estudiar la respuesta inmune en portadores asintomáticos y compararla con la respuesta inmune desarrollada por individuos sintomáticos de la infección por *C. difficile* es fundamental para entender cuáles de los mecanismos estudiados podrían estar involucrados en la generación de una respuesta inmune protectora o por el contrario mediando inmunopatogénesis. Más aún, dado la alta tasa de recurrencia de la CDI una de nuestras hipótesis es que estos individuos presentan una respuesta T de memoria deficiente. Yacyshin y col. observaron diferencias fenotípicas entre los pacientes CDI positivos y negativos, específicamente dentro de las poblaciones CD3⁺ y CD3⁻; así como también entre individuos que eliminaron la infección inicial y aquellos pacientes que se volvieron recurrentes.³⁶

Conocer y comprender aún más la respuesta inmune frente a *C. difficile* permitirá detectar nuevos blancos moleculares. . Así, el estudio de la regulación de los linajes Th a través de moléculas coestimuladoras y su relación con la inmunopatogénesis de la CDI podría ser crucial para el descubrimiento de nuevos biomarcadores o blanco terapéuticos.

CONCLUSIONES

La puesta a punto de la PCR directa de la toxina B de *C. difficile* demostró una alta especificidad comparada con el EIA y el kit de diagnóstico molecular Amplie Vue. Teniendo en cuenta que los tests de diagnóstico moleculares son considerablemente más sensibles que el EIA nos proponemos validar nuestro método en un mayor número de muestras para luego implementarlo en los centros de salud de salud de la región como método de screening de CDI. Estos resultados pueden tener un fuerte impacto en la salud pública, ya que la implementación del método de diagnóstico mejoraría la sensibilidad y agilizaría el diagnóstico y por lo tanto el tratamiento.

La caracterización de la respuesta inmune demostró que *C. difficile* regula positivamente la expresión de SLAM y la producción de TNF- α en monocitos, lo que podría indicar la inducción de un perfil pro-inflamatorio. Más aún, las células monocíticas/macrofágicas THP-1 fagocitan a *C. difficile*. La co-expresión de SLAM con TNF- α y en las células positivas para rodamina sugieren que SLAM podría tener una función moduladora en la activación de los monocitos/macrófagos.

Los diferentes extractos de *C. difficile* son capaces de inducir la producción de IFN- γ , citoquina pro-inflamatoria característica de la respuesta Th1; y más del 70% de las células productoras de citoquinas son doble positivas, productoras de IFN- γ e IL17. Por lo tanto, *C. difficile* induce la activación de las células T. Los resultados sugieren una respuesta T Th1 y Th17 frente a la infección por *C. difficile* y una posible plasticidad Th1/Th17.

C. difficile es capaz de activar a las células T y las moléculas coestimuladoras podrían estar implicadas en la regulación del IFN- γ en la respuesta inmune frente a *C. difficile*. Los resultados muestran una modesta regulación de la expresión de SLAM y de PD-1 sólo en las células T estimuladas con *C. difficile* inactivado por tratamiento con formol y no con calor. De la misma manera, *C. difficile* lleva a un aumento de las células SLAM⁺IFN- γ ⁺ y de las células PD-1⁺IFN- γ ⁺.

Si bien estos resultados indican que *C. difficile* es capaz de inducir una respuesta inmune en nuestro modelo de trabajo, más estudios son requeridos para determinar qué procesos específicos son disparados frente a la bacteria y qué tipos celulares se encuentran involucrados en estos mecanismos de defensa. Asimismo, interesante necesario evaluar la respuesta generada en portadores asintomáticos y pacientes sintomáticos con el fin de lograr una mayor comprensión de los mecanismos que median una respuesta inmune protectora o que por el contrario podrían estar asociados con una mayor severidad de la enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Vigano, S., Perreau, M., Pantaleo, G. & Harari, A. Positive and negative regulation of cellular immune responses in physiologic conditions and diseases. *Clinical & developmental immunology* **2012**, 485781 (2012).
2. Rethi, B. *et al.* SLAMF8/SLAMF8 interactions inhibit CD40-induced production of inflammatory cytokines in monocyte-derived dendritic cells. *Blood* **107**, 2821-2829 (2006).
3. Kmiec, Z., Cyman, M. & Slebiada, T.J. Cells of the innate and adaptive immunity and their interactions in inflammatory bowel disease. *Advances in medical sciences* **62**, 1-16 (2017).
4. Janoir, C. Virulence factors of *Clostridium difficile* and their role during infection. *Anaerobe* **37**, 13-24 (2016).
5. Smits, W.K., Lyras, D., Lacy, D.B., Wilcox, M.H. & Kuijper, E.J. *Clostridium difficile* infection. *Nature reviews. Disease primers* **2**, 16020 (2016).
6. Elliott, B., Androga, G.O., Knight, D.R. & Riley, T.V. *Clostridium difficile* infection: Evolution, phylogeny and molecular epidemiology. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* (2016).
7. Cowardin, C.A. & Petri, W.A., Jr. Host recognition of *Clostridium difficile* and the innate immune response. *Anaerobe* **30**, 205-209 (2014).
8. Buonomo, E.L. & Petri, W.A., Jr. The microbiota and immune response during *Clostridium difficile* infection. *Anaerobe* **41**, 79-84 (2016).
9. Martin, J.S., Monaghan, T.M. & Wilcox, M.H. *Clostridium difficile* infection: epidemiology, diagnosis and understanding transmission. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* **13**, 206-216 (2016).
10. Balassiano, I.T., Yates, E.A., Domingues, R.M. & Ferreira, E.O. *Clostridium difficile*: a problem of concern in developed countries and still a mystery in Latin America. *Journal of medical microbiology* **61**, 169-179 (2012).

11. Legaria, M.C., Lumelsky, G. & Rosetti, S. Clostridium difficile-associated diarrhea from a general hospital in Argentina. *Anaerobe* **9**, 113-116 (2003).
12. Postma, N., Kiers, D. & Pickkers, P. The challenge of Clostridium difficile infection: Overview of clinical manifestations, diagnostic tools and therapeutic options. *International journal of antimicrobial agents* **46 Suppl 1**, S47-50 (2015).
13. Drekonja, D.M. Clostridium difficile infection: current, forgotten and emerging treatment options. *Journal of comparative effectiveness research* **3**, 547-557 (2014).
14. Nitzan, O., Elias, M., Chazan, B., Raz, R. & Saliba, W. Clostridium difficile and inflammatory bowel disease: role in pathogenesis and implications in treatment. *World journal of gastroenterology* **19**, 7577-7585 (2013).
15. Madan, R. & Petri, W.A., Jr. Immune responses to Clostridium difficile infection. *Trends in molecular medicine* **18**, 658-666 (2012).
16. Burke, K.E. & Lamont, J.T. Clostridium difficile infection: a worldwide disease. *Gut and liver* **8**, 1-6 (2014).
17. Tomkovich, S. & Jobin, C. Microbiota and host immune responses: a love-hate relationship. *Immunology* **147**, 1-10 (2016).
18. Marino, E. The gut microbiota and immune-regulation: the fate of health and disease. *Clinical & translational immunology* **5**, e107 (2016).
19. Baumber, A.J. & Sperandio, V. Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. *Nature* **535**, 85-93 (2016).
20. Maslowski, K.M. & Mackay, C.R. Diet, gut microbiota and immune responses. *Nature immunology* **12**, 5-9 (2011).
21. Hryckowian, A.J., Pruss, K.M. & Sonnenburg, J.L. The emerging metabolic view of Clostridium difficile pathogenesis. *Current opinion in microbiology* **35**, 42-47 (2016).
22. Baumber, W. Tattoos and Their Potential Health Consequences. *Deutsches Arzteblatt international* **113**, 663-664 (2016).

23. Abt, M.C., McKenney, P.T. & Pamer, E.G. Clostridium difficile colitis: pathogenesis and host defence. *Nature reviews. Microbiology* **14**, 609-620 (2016).
24. Chen, S., Sun, C., Wang, H. & Wang, J. The Role of Rho GTPases in Toxicity of Clostridium difficile Toxins. *Toxins* **7**, 5254-5267 (2015).
25. Schwan, C. et al. Clostridium difficile toxin CDT hijacks microtubule organization and reroutes vesicle traffic to increase pathogen adherence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 2313-2318 (2014).
26. Pechine, S. & Collignon, A. Immune responses induced by Clostridium difficile. *Anaerobe* **41**, 68-78 (2016).
27. Awad, M.M., Johanesen, P.A., Carter, G.P., Rose, E. & Lyras, D. Clostridium difficile virulence factors: Insights into an anaerobic spore-forming pathogen. *Gut microbes* **5**, 579-593 (2014).
28. Solomon, K. The host immune response to Clostridium difficile infection. *Therapeutic advances in infectious disease* **1**, 19-35 (2013).
29. Usacheva, E.A., Jin, J.P. & Peterson, L.R. Host response to Clostridium difficile infection: Diagnostics and detection. *Journal of global antimicrobial resistance* **7**, 93-101 (2016).
30. Bibbo, S. et al. Role of microbiota and innate immunity in recurrent Clostridium difficile infection. *Journal of immunology research* **2014**, 462740 (2014).
31. Bain, C.C. & Mowat, A.M. Macrophages in intestinal homeostasis and inflammation. *Immunological reviews* **260**, 102-117 (2014).
32. Blaschitz, C. & Raffatellu, M. Th17 cytokines and the gut mucosal barrier. *Journal of clinical immunology* **30**, 196-203 (2010).
33. Darkoh, C. et al. Colonic immunopathogenesis of Clostridium difficile infections. *Clinical and vaccine immunology : CVI* **21**, 509-517 (2014).

34. Shen, X., Du, J., Guan, W. & Zhao, Y. The balance of intestinal Foxp3+ regulatory T cells and Th17 cells and its biological significance. *Expert review of clinical immunology* **10**, 353-362 (2014).
35. Kim, M.N. *et al.* Clostridium difficile infection aggravates colitis in interleukin 10-deficient mice. *World journal of gastroenterology : WJG* **20**, 17084-17091 (2014).
36. Yacyshyn, M.B. *et al.* Clostridium difficile recurrence is characterized by pro-inflammatory peripheral blood mononuclear cell (PBMC) phenotype. *Journal of medical microbiology* **63**, 1260-1273 (2014).
37. Garrido-Mesa, N., Algieri, F., Rodriguez Nogales, A. & Galvez, J. Functional plasticity of Th17 cells: implications in gastrointestinal tract function. *International reviews of immunology* **32**, 493-510 (2013).
38. Zheng, J. *et al.* ICOS regulates the generation and function of human CD4+ Treg in a CTLA-4 dependent manner. *PloS one* **8**, e82203 (2013).
39. Zhang, Y. *et al.* The clinical impact of ICOS signal in colorectal cancer patients. *Oncoimmunology* **5**, e1141857 (2016).
40. Wikenheiser, D.J. & Stumhofer, J.S. ICOS Co-Stimulation: Friend or Foe? *Frontiers in immunology* **7**, 304 (2016).
41. Schaefer, J.S., Montufar-Solis, D., Vigneswaran, N. & Klein, J.R. ICOS promotes IL-17 synthesis in colonic intraepithelial lymphocytes in IL-10-/- mice. *Journal of leukocyte biology* **87**, 301-308 (2010).
42. Sato, T. *et al.* Hyperexpression of inducible costimulator and its contribution on lamina propria T cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **126**, 829-839 (2004).
43. Zhang, B., Chikuma, S., Hori, S., Fagarasan, S. & Honjo, T. Nonoverlapping roles of PD-1 and FoxP3 in maintaining immune tolerance in a novel autoimmune pancreatitis mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **113**, 8490-8495 (2016).

44. Maruya, M., Kawamoto, S., Kato, L.M. & Fagarasan, S. Impaired selection of IgA and intestinal dysbiosis associated with PD-1-deficiency. *Gut microbes* **4**, 165-171 (2013).
45. Francisco, L.M., Sage, P.T. & Sharpe, A.H. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunological reviews* **236**, 219-242 (2010).
46. Veillette, A. SLAM-family receptors: immune regulators with or without SAP-family adaptors. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2**, a002469 (2010).
47. Theil, D., Farina, C. & Meinel, E. Differential expression of CD150 (SLAM) on monocytes and macrophages in chronic inflammatory contexts: abundant in Crohn's disease, but not in multiple sclerosis. *Journal of clinical pathology* **58**, 110-111 (2005).
48. Wu, N. & Veillette, A. SLAM family receptors in normal immunity and immune pathologies. *Current opinion in immunology* **38**, 45-51 (2016).
49. Crobach, M.J. *et al.* European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the diagnostic guidance document for *Clostridium difficile* infection. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **22 Suppl 4**, S63-81 (2016).
50. Berger, S.B. *et al.* SLAM is a microbial sensor that regulates bacterial phagosome functions in macrophages. *Nature immunology* **11**, 920-927 (2010).
51. Zhao, S., Ghose-Paul, C., Zhang, K., Tzipori, S. & Sun, X. Immune-based treatment and prevention of *Clostridium difficile* infection. *Human vaccines & immunotherapeutics* **10**, 3522-3530 (2014).
52. Ishida, Y., Kondo, T., Takayasu, T., Iwakura, Y. & Mukaida, N. The essential involvement of cross-talk between IFN-gamma and TGF-beta in the skin wound-healing process. *J Immunol* **172**, 1848-1855 (2004).

53. McDermott, A.J. *et al.* Interleukin-23 (IL-23), independent of IL-17 and IL-22, drives neutrophil recruitment and innate inflammation during *Clostridium difficile* colitis in mice. *Immunology* **147**, 114-124 (2016).
54. Buonomo, E.L. *et al.* Role of interleukin 23 signaling in *Clostridium difficile* colitis. *The Journal of infectious diseases* **208**, 917-920 (2013).
55. McDermott, A.J. *et al.* Role of interferon-gamma and inflammatory monocytes in driving colonic inflammation during acute *Clostridium difficile* infection in mice. *Immunology* (2016).
56. Crobach, M.J., Dekkers, O.M., Wilcox, M.H. & Kuijper, E.J. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): data review and recommendations for diagnosing *Clostridium difficile*-infection (CDI). *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **15**, 1053-1066 (2009).
57. Barrionuevo, P. *et al.* *Brucella abortus* inhibits IFN-gamma-induced FcgammaRI expression and FcgammaRI-restricted phagocytosis via toll-like receptor 2 on human monocytes/macrophages. *Microbes and infection* **13**, 239-250 (2011).
58. van Driel, B. *et al.* Signaling lymphocyte activation molecule regulates development of colitis in mice. *Gastroenterology* **143**, 1544-1554 e1547 (2012).
59. Abt, M.C. *et al.* Innate Immune Defenses Mediated by Two ILC Subsets Are Critical for Protection against Acute *Clostridium difficile* Infection. *Cell host & microbe* **18**, 27-37 (2015).
60. Ishida, Y. *et al.* Essential involvement of IFN-gamma in *Clostridium difficile* toxin A-induced enteritis. *J Immunol* **172**, 3018-3025 (2004).
61. Schutze, G.E. & Willoughby, R.E. *Clostridium difficile* infection in infants and children. *Pediatrics* **131**, 196-200 (2013).
62. Sallusto, F. & Lanzavecchia, A. Heterogeneity of CD4⁺ memory T cells: functional modules for tailored immunity. *European journal of immunology* **39**, 2076-2082 (2009).

63. Nakagawa, T. *et al.* Endogenous IL-17 as a factor determining the severity of *Clostridium difficile* infection in mice. *Journal of medical microbiology* **65**, 821-827 (2016).
64. Wassink, L. *et al.* ICOS expression by activated human Th cells is enhanced by IL-12 and IL-23: increased ICOS expression enhances the effector function of both Th1 and Th2 cells. *J Immunol* **173**, 1779-1786 (2004).
65. Lohning, M. *et al.* Expression of ICOS in vivo defines CD4⁺ effector T cells with high inflammatory potential and a strong bias for secretion of interleukin 10. *The Journal of experimental medicine* **197**, 181-193 (2003).
66. Abiko, K. *et al.* IFN-gamma from lymphocytes induces PD-L1 expression and promotes progression of ovarian cancer. *British journal of cancer* **112**, 1501-1509 (2015).
67. Jurado, J.O. *et al.* Programmed death (PD)-1:PD-ligand 1/PD-ligand 2 pathway inhibits T cell effector functions during human tuberculosis. *J Immunol* **181**, 116-125 (2008).
68. Castro, A.G. *et al.* Molecular and functional characterization of mouse signaling lymphocytic activation molecule (SLAM): differential expression and responsiveness in Th1 and Th2 cells. *J Immunol* **163**, 5860-5870 (1999).
69. Pasquinelli, V. *et al.* Expression of signaling lymphocytic activation molecule-associated protein interrupts IFN-gamma production in human tuberculosis. *J Immunol* **172**, 1177-1185 (2004).
70. Garcia, V.E. *et al.* Signaling lymphocytic activation molecule expression and regulation in human intracellular infection correlate with Th1 cytokine patterns. *J Immunol* **167**, 5719-5724 (2001).
71. Quiroga, M.F. *et al.* Activation of signaling lymphocytic activation molecule triggers a signaling cascade that enhances Th1 responses in human intracellular infection. *J Immunol* **173**, 4120-4129 (2004).