

EJE INTESTINO-PULMÓN: IMPACTO DE LA DISBIOSIS INTESTINAL Y DE LA INFECCIÓN POR *CLOSTRIDIODES DIFFICILE* SOBRE LA ENDOCITOSIS DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Trabajo Final de Grado
del alumno



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

Junín, 22 de Marzo de 2024

EJE INTESTINO-PULMÓN: IMPACTO DE LA DISBIOSIS INTESTINAL Y DE LA INFECCIÓN POR *CLOSTRIDIoidES DIFFICILE* SOBRE LA ENDOCITOSIS DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Trabajo Final de Grado

del alumno


NICOLÁS DIEGO MORICONI

Aprobada por el Tribunal Evaluador

Dra. Daiana Luján

Vitale

Evaluador




Dra. Virginia
Pasquinelli

Co-Directora

Dr. Andrés

Alloatti

Evaluador



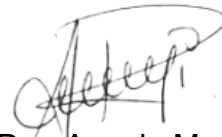
Dr. Rodrigo Emanuel
Hernández Del Pino

Co-Director

Dr. Luciano David

D'attilio

Evaluador



Dra. Angela María
Barbero

Directora

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

Junín, 22 de Marzo de 2024

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo final de grado representa, en lo personal, la culminación de una travesía que emprendí 6 años atrás, y terminó de afianzar en mí lo que en su momento fue una corazonada al iniciar la licenciatura: el amor por la ciencia. Quería tomarme unas breves líneas para compartir dos reflexiones que sintetizan perspectivas de como percibo al mundo que me rodea. La primera de ellas, le pertenece a Richard Feynman, brillante físico teórico y comunicador científico, que supo expresar la belleza del mundo invisible que se nos devela a los que estudiamos ciencias biológicas:

*“Tengo un amigo artista y él en ocasiones adopta una postura con la que yo no estoy muy de acuerdo. Él sostiene **una flor** y dice: -Mira qué bonita es-, y en eso coincidimos. Pero sigue diciendo: -Ves, yo como artista, puedo ver lo bello que es esto, pero tú como científico, lo desmontas todo y lo conviertes en algo insustancial- (o aburrido).*

Y entonces pienso que él está diciendo tonterías. Para empezar, la belleza que él ve también es accesible para mí y para otras personas, creo yo. Aunque quizá yo no tenga el refinamiento estético que él tiene, puedo apreciar la belleza de una flor.

*Al mismo tiempo, **yo veo mucho más en la flor** que lo que ve él. Yo puedo imaginar las células que hay en ella, las complicadas acciones que tienen lugar en su interior y que también tienen su belleza. Lo que quiero decir es que **no sólo hay belleza en la dimensión que capta la vista**, sino que se puede ir más allá, hacia la estructura interior, ¡también los procesos! El hecho de que los colores en las flores hayan evolucionado y atraigan a los insectos, significa que los insectos pueden apreciar el color.*

Eso añade preguntas: ¿el sentido de la estética también lo tienen las formas de vida menores de la naturaleza? ¿Por qué razón les resulta estético?

*Toda clase de interesantes cuestiones surgidas del **conocimiento científico** no hacen sino sumarle misterio e interés a la impresión que deja una simple flor, **no entiendo cómo podría restárselo.**”*

La segunda de ellas, le pertenece a Carl Sagan, el mayor divulgador de ciencia a criterio personal, y una fuente constante de inspiración. Este breve extracto pertenece a su último libro publicado en 1995, y sin embargo, dada la situación actual que atraviesa la ciencia argentina (de la cual no puedo abstraerme ni hacer caso omiso), no ha perdido vigencia alguna:

“En la investigación básica, los científicos son libres de colmar su curiosidad e interrogar a la naturaleza no con un fin práctico a corto plazo, sino en busca del conocimiento por sí mismo. Desde luego, los científicos tienen un interés personal en la investigación básica. Es lo que les gusta, en muchos casos la razón por la que se hacen científicos. Pero esta investigación es en interés de la sociedad. Así suelen hacerse los principales descubrimientos que benefician a la humanidad.

Raramente somos lo bastantes listos para hacer a propósito los descubrimientos que dirigirán nuestra economía y salvaguardarán nuestras vidas. A menudo nos falta la investigación básica. En cambio, nos dedicamos a una amplia serie de investigaciones de la naturaleza y surgen aplicaciones en las que nunca soñamos. No siempre, desde luego. Pero con bastante frecuencia.

Dar dinero a alguien como Maxwell podría haber parecido la más absurda promoción de la ciencia «guiada por la mera curiosidad» y una imprudencia para los legisladores prácticos. ¿Por qué conceder dinero ahora para que científicos que hablan en “difícil” se dediquen a sus hobbies, cuando todavía no se han abordado necesidades nacionales apremiantes? Desde este punto de vista, es fácil entender la opinión de que la ciencia no es más que otro grupo de presión ansioso por preservar la entrada de dinero a fin de que los científicos no tengan que trabajar todo el día o estar en nómina.

Maxwell no pensaba en la radio, el radar y la televisión cuando garabateó por primera vez las ecuaciones fundamentales del electromagnetismo; Newton no soñaba con el vuelo espacial o los satélites de comunicación cuando entendió por primera vez el movimiento de la Luna; Roentgen no pensaba en el diagnóstico médico cuando investigó una radiación penetrante tan misteriosa que la llamó «rayos X»; Curie no pensaba en la terapia para el cáncer cuando extrajo laboriosamente cantidades mínimas de radio de toneladas de pechblenda; Fleming no planeaba salvar la vida de millones de personas con los antibióticos cuando observó un círculo libre de bacterias alrededor de un brote de moho; ni Watson ni Crick ni Franklin imaginaban la curación de enfermedades genéticas cuando se devanaban los sesos sobre la difracción de rayos X del ADN; Rowland y Molina no planeaban implicar los CFC en la reducción del ozono cuando empezaron a estudiar el papel de los halógenos en la fotoquímica estratosférica.

Desde luego hay muchos problemas acuciantes para nuestra nación y para nuestra especie. Pero reducir la investigación científica básica no es la manera de resolverlos.

*Alejarse de la investigación fundamental constituye una falta de fuerza, de imaginación y de esa visión de futuro que todavía no parecemos dominar. Desde luego, necesitamos alfabetización, educación, trabajo, atención médica adecuada y defensa, protección del medio ambiente, seguridad en la vejez, un presupuesto equilibrado y un montón de cosas más. Pero somos una sociedad rica. **¿No podemos alimentar a los Maxwell de nuestra época?***

Expresar gratitud es uno de los rasgos que permitió la evolución de nuestra especie, y consolidó nuestras sociedades. Demostrar agradecimiento no solo “alimenta” nuestro cerebro, sino también nos hace un poquito más felices. Considero que somos momentos de lo que compartimos con otros, y por tanto, sostengo que este logro también les pertenece.

A Vir, por confiar en mi desde el primer momento, acompañarme y abrirme las puertas del laboratorio de Inmunogenética de las Infecciones, por seguir brindándome la confianza necesaria y la oportunidad de continuar con un doctorado en este lab. A Rodri, por compartirme tu experticia y mirada crítica en el día a día, y por qué no, por todas las charlas compartidas, en especial sobre videojuegos. A An, por estar presente en cada momento e introducirme en el verdadero mundo de la ciencia, enseñándome día a día con paciencia, criterio e integridad, por ser mi referente en el buen quehacer científico, por cada reflexión y desvelada discutiendo nuevas ideas, por los “falsos feriados” largando experimentos, por dejarme ser parte de cada proyecto que se te ocurriese, y en especial por siempre impulsarme a superar mis límites y valorar constantemente mi trabajo. A los tres, por cada diseño experimental, discusión de resultados y correcciones que hicieron posible este trabajo final de grado.

A todos los integrantes del lab VP, Sabi, Agos y Mar, por enseñarme día a día la importancia del trabajo en equipo e integrarme desde el primer momento. A todos los integrantes del CIBA, por cada momento compartido, en especial a Naty, por todas las siestas en el citómetro, y Gasti, por el mantenimiento de los bichines; pero principalmente a ambos por mantener operativamente el funcionamiento de la institución.

A la Universidad Nacional del Noroeste de la pcia. de Buenos Aires, por mantener en lo alto la calidad educativa que representan las universidades nacionales argentinas, que permitió mi formación académica, incluso con una pandemia de por medio. A cada uno de los profesores de la carrera, que supieron dejar su huella, especialmente aquellos que me mostraron el camino a seguir para ser un profesional de excelencia.

A cada docente que me acompañó en todo mi trayecto educativo. Por dejar su impronta, por su cariño diario y que actualmente siguen profesando por mí.

En especial, a los profes de mi querido I.P.E, que supieron mostrarme la genética por vez primera, a ser crítico e interpretar el mundo que nos rodea, y por el tiempo extra que se tomaron en prepararme para el cursillo de ingreso universitario.

A mis facuamigos, Maxi, Anto, Lula, Cande, Juan, Juani, Dean, Vicky, Iri y a tantos otros que conocí por el camino, con los que construí esta especie de familia universitaria, compartiendo tardes de informes con mates de por medio, interminables clases teóricas, recreos jugando al UNO, viajes a ECANA, nervios pre parcial y festejos post rendida. Se que pronto tendré el placer de llamarlos colegas, y si bien lo que el destino nos depara es incierto, no dudo que serán grandes profesionales. A Maxi y Anto en especial, por ayudarme a crecer, a ver distintas realidades y ser incondicionales.

A mi amigo Javier, por estar siempre escuchándome a la distancia, y tenderme una mano cada vez que lo necesité.

A cada una de las personas que conforman la nación argentina, que incluso sin saberlo, con su contribución hicieron posible mi formación académica. El título que se me confiere, no es solo una vanagloria a nivel personal, sino un compromiso y responsabilidad para con ustedes, porque sé que trabajando a través de la ciencia puedo aportar a la construcción de una sociedad más justa, con una mejor calidad de vida.

A cada uno de mis tíos, y madrina, por cada mensaje de aliento y acompañamiento en todo momento.

A mi tía Mirta, por inculcarme el valor de la lectura, el explorar el mundo, y por cada tarde que te pasaste enseñándome a dividir. A mi tío Pepe, por las charlas sinceras en el momento justo, por cada anécdota que devenía en reflexión.

A mi tía Livia y a mi nona Delma, que me vieron comenzar con ilusión esta etapa, y que por ley misma de la vida, no pudieron estar presentes para verme concluir. Por todo el cariño, por cada una de las comidas caseras que me reconfortaban el alma, por el orgullo que seguro deben estar sintiendo, como siempre me lo hicieron saber.

A mi hermanito Luchi, por cada abrazo sincero dado en el momento que más lo necesitaba, por haberme escuchado atentamente cuando preparaba cada final, por cada vez que me hiciste ver una perspectiva diferente de la vida, por cada *hobby* compartido y que espero seguir compartiendo con vos.

Por último, a los dos pilares que guían mi vida, y que me sostienen cuando las nubes grises me tapan el camino, mi mamá Gabriela y mi papá Diego, a quienes les dedico este trabajo final de grado. Por siempre brindarme el respaldo necesario para cada nuevo desafío que enfrento. Por cada uno de los valores que me inculcaron y que hoy me definen. Por todo el esfuerzo que pusieron, en cada salida a las 3 am de casa para estar temprano en el cursillo de ingreso, por cada mudanza. Por, a pesar de que seguro les estrujo el corazón el saber que me quería mudar a 500 km lejos de casa, se mantuvieron estoicos. Quizás sin saberlo, me dieron el regalo más grande que un hijo puede valorar, la posibilidad de elegir y el privilegio de estudiar lo que amo.

A todos ustedes, mi más sincero agradecimiento.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	6
Infección por <i>Clostridioides difficile</i> (CDI)	6
Epidemiología.....	6
<i>Clostridioides difficile</i>	9
Transmisión de la CDI.....	11
Tuberculosis (TB)	13
Epidemiología.....	13
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	14
Transmisión de la Tuberculosis (TB).....	16
Macrófagos	18
Eje intestino-pulmón	21
SLAMF1	25
Hipótesis	27
OBJETIVOS	28
Objetivo general.....	28
Objetivos específicos.....	28
MATERIALES Y MÉTODOS	30
Objetivo 1. Estudiar el perfil de pacientes con sospecha de infección por <i>C. difficile</i> del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.....	30
Objetivo 2. Analizar la capacidad endocítica de macrófagos provenientes de dadores sanos frente a <i>M. tuberculosis</i> pre-sensibilizados o no con <i>C. difficile</i>	39
Objetivo 3. Evaluar el impacto de la disbiosis intestinal y de la CDI a nivel tisular en un modelo murino.....	45
RESULTADOS	51
Epidemiología de la CDI en el NOBA.....	51
Factores de riesgo y parámetros sanguíneos en los pacientes del NOBA.....	53
Meta-análisis.....	57
Características morfológicas y capacidad endocítica de los macrófagos entrenados con <i>C. difficile</i> frente a <i>M. tuberculosis</i>	64
Expresión de SLAMF1 en macrófagos entrenados con <i>C. difficile</i> y enfrentados a <i>M. tuberculosis</i>	74
Impacto de la disbiosis y de la CDI sobre la estructura del intestino y el pulmón.....	80
DISCUSIÓN	88
CONCLUSIONES	111
BIBLIOGRAFÍA	114

ABREVIATURAS

AGCC: Ácidos grasos de cadena corta

AM: Macrófagos alveolares

AMP: Adenosín mono fosfato

BCG: Bacillus Calmette-Guérin

BHI: Infusión cerebro corazón (*Brain Heart Infusion*)

BI/NAP1/027: Cepa de *C. difficile*, del inglés *Type B1, North American pulse-field type 1, ribotype 027 strain*

BSA: Albumina de suero bovino (*Bovine serum albumin*)

CA CDI: Infección por *C. difficile* asociada a la comunidad

CABA: Ciudad Autónoma de Buenos Aires

CCL2: Quimiocina motivo C-C ligando 2

CD: Célula dendrítica

CD: *Cluster* de diferenciación

CDC: Centro de Control de Enfermedades (*Control Disease Centre*)

CDH: *C. difficile* inactivada por calor

CDI: Infección por *C. difficile* (*Clostridioides difficile infection*)

CDT: Toxina binaria de *C. difficile*

Cels: Células

CIBA: Centro de Investigaciones Básicas y Aplicadas

CITNOBA: Centro de Innovación y Transferencia del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires

CMH: Complejo mayor de histocompatibilidad

COENOBA: Comité de Ética en la Investigación y en uso de Animales de Experimentación de la Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires

COVID 19: Enfermedad por Coronavirus

CREB: Proteína de unión a elementos sensibles al AMP cíclico (factor de transcripción)

Cwps: Polisacárido general de la pared celular del neumococo

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DMSO: Dimetilsulfóxido	IBD: Enfermedad inflamatoria intestinal
DPX: Líquido de montaje (base tolueno)	IF: Inmunofluorescencia
EIA: Enzimoimmunoensayo	IL: Interleuquina
EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica	IM: Macrófagos intersticiales
ERK: Quinasa regulada por señales extracelulares	INF: Interferón
F4/80: Marcador de macrófagos murino	INH: Isoniazida
FACS: Clasificación de células activada por fluorescencia	ip: Inyección intraperitoneal
FITC: Isotiocianato de fluoresceína	LPS: Lipopolisacárido
FMT: Trasplante de materia fecal	MCP: Proteína quimioatrayente de monocitos
FX: Fidaxomicina	MIP: Proteína inflamatoria de macrófagos
GDH: Glutamato deshidrogenasa de <i>C. difficile</i>	MNZ: Metronidazol
GM CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos	Mtb: <i>M. tuberculosis</i>
H&E: Hematoxilina y Eosina	MΦ: Macrófagos
HA CDI: Infección por <i>C. difficile</i> asociada a ambientes intrahospitalarios	NOBA: Noroeste de la pcia. de Buenos Aires
HDM: Matriz de alta densidad	Omp: Proteínas de membrana externa
HGU: Unidad de crecimiento hifal	OR: Razón de momios (<i>Odds ratio</i>)
	PBS: <i>Buffer</i> fosfato salino
	PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PFA: Paraformaldehido

PYZ: Pirazinamida

rCDI: Infección por *C. difficile* recurrente

RIF: Rifampicina

RPMI: Medio de cultivo *Roswell Park Memorial Institute*

RT: Temperatura ambiente

SBF: Suero bovino fetal

SF: Solución fisiológica

Siglec-F: Lectinas similares a inmunoglobulinas que se unen al ácido siálico

SLAMF1: Molécula de señalización de activación linfocitaria 1 (*Signalling lymphocyte activation molecule family 1*)

SLPs: Proteínas de la capa superficial de *C. difficile*

SMD: Diferencia de Media Estandarizada

SPF: Libre de patógenos específicos

TB: Tuberculosis

TcdA: Toxina A de *C. difficile*

TcdB: Toxina B de *C. difficile*

TFG: Trabajo final de grado

Th: Linfocito T colaborador

Thf: Linfocito T folicular

TLR: Receptor del tipo Toll

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alpha

Tregs: Linfocito T regulador

UFCs: Unidad formadora de colonias

UNNOBA: Universidad Nacional del Noroeste de la pcia. de Buenos Aires

UTI: Unidad de terapia intensiva

UV: Ultravioleta

VAN: Vancomicina

WCMtb: Célula entera de *M. tuberculosis* (*Whole Cell M. tuberculosis*)

RESUMEN

En los últimos años, ha crecido el interés del eje intestino-pulmón en el mantenimiento de la homeostasis inmunitaria. Este eje implica una regulación cruzada entre la microbiota intestinal y la pulmonar, impactando a su vez sobre el sistema inmune. En este trabajo final de grado comenzamos a explorar el eje intestino-pulmón en el contexto de dos infecciones bacterianas de relevancia epidemiológica: la Tuberculosis y la infección por *Clostridioides difficile* (CDI).

La Tuberculosis se remonta a tiempos ancestrales, pero no constituye un problema del pasado ya que millones de personas contraen la infección y mueren de Tuberculosis cada año. Por su parte, la CDI es la causa más común de diarrea infecciosa nosocomial y generalmente se desarrolla luego del uso de antibióticos que provocan disbiosis de la microbiota intestinal. Teniendo en cuenta que la disbiosis intestinal ha sido implicada en numerosas infecciones respiratorias, que puede alterar la función del sistema inmune en sitios distales y favorecer el desarrollo de microorganismos patogénicos como *C. difficile*, consideramos que el estado del microbioma podría ser un factor importante en el desarrollo de la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. En este trabajo abordamos 3 objetivos principales que incluyeron el análisis de pacientes y el uso de modelos *in vitro* e *in vivo* con el fin de evaluar el impacto de la disbiosis intestinal y de la CDI en la estructura del pulmón y la función endocítica de los macrófagos frente a *M. tuberculosis*.

En primer lugar, hemos caracterizado clínica y demográficamente una población de 249 pacientes con sospecha de CDI provenientes de distintos centros de salud del Noroeste de la provincia de Buenos Aires. Los reportes epidemiológicos de la CDI en Argentina son escasos y heterogéneos. Con el desarrollo de este objetivo encontramos que el 21.29% de los pacientes con diarrea presentaban a *C. difficile* como agente causal y que más del 80% de los casos estaban infectados con cepas toxigénicas.

Además, determinamos factores de riesgo y los comparamos con los reportados en otras poblaciones alrededor del mundo mediante un meta-análisis. Tanto la edad avanzada (más de 67 años), como la utilización previa de antibióticos, la hospitalización previa y episodios previos de CDI pueden ser considerados como factores de riesgo en nuestra cohorte de estudio. Más aun, parámetros sanguíneos como un número elevado de leucocitos y plaquetas, un recuento disminuido de basófilos y una concentración incrementada de urea podrían ser implementados como nuevos indicadores de CDI. Como resultado del meta-análisis realizado con 40 estudios independientes, pudimos determinar parámetros que coinciden a nivel global con nuestro estudio, destacándose la edad avanzada, el consumo previo de antibióticos y la internación previa como predictores de riesgo y el recuento leucocitario como indicador de la CDI.

En segunda instancia, se realizaron ensayos *in vitro* en macrófagos derivados de monocitos obtenidos de dadores sanos, los cuales fueron pre - entrenados con *C. difficile*, y posteriormente desafiados con *M. tuberculosis*. Se evaluó la capacidad endocítica, así como la viabilidad y expresión de SLAMF1, un sensor microbiológico de *M. tuberculosis*. La finalidad de este objetivo fue realizar un primer acercamiento al entendimiento de cómo la infección intestinal por *C. difficile* puede impactar en la respuesta de los macrófagos durante la Tuberculosis. Logramos la puesta a punto del modelo de entrenamiento de los macrófagos con *C. difficile* y encontramos que la endocitosis de esta bacteria se mantiene estable a través del tiempo (niveles similares de internalización al día 1, 2, 5 y 7 de exposición a *C. difficile*). Sin embargo, luego del entrenamiento, la capacidad endocítica frente a *M. tuberculosis* cambia. Por un lado, la internalización exclusiva de *M. tuberculosis* (células que solo endocitan a *M. tuberculosis*) aumenta cuando los macrófagos se expusieron por tiempos prolongados a *C. difficile*, indicando una especialización de la función endocítica.

Por el otro, la internalización de *M. tuberculosis* se reduce cuando los macrófagos entrenados con *C. difficile* se enfrentan a *M. tuberculosis* por tiempos más prolongados. También encontramos que *C. difficile* es capaz de inhibir la expresión de SLAMF1 en la superficie de los macrófagos, lo cual podría estar implicado en los resultados anteriores. Por último, observamos que los macrófagos forman puentes citoplasmáticos y agrupaciones de células en presencia de *M. tuberculosis*, lo que se interrumpe con el entrenamiento con *C. difficile*.

Finalmente, se llevaron a cabo ensayos *in vivo* en un modelo murino de disbiosis y de infección primaria por *C. difficile*. Encontramos que la disbiosis intestinal promueve el daño en el ciego y el colon caracterizado por la infiltración mixta leucocitaria, la formación de nódulos linfáticos y edema de la submucosa. La CDI agravó la histopatología del colon durante la etapa aguda de la infección. Si bien los ratones se recuperaron y dejaron de presentar síntomas clínicos como diarrea luego de esta etapa, el daño a nivel intestinal se mantuvo y siempre fue mayor en el ciego. A nivel del pulmón, tanto la disbiosis intestinal como el establecimiento de la CDI inducen cambios estructurales. Observamos modificaciones en el área que ocupan los tabiques alveolares, la longitud de los tabiques, el número de ramificaciones, el tamaño de los alveolos y la complejidad del parénquima pulmonar.

En conclusión, nuestros resultados demuestran la relevancia epidemiológica de la CDI en nuestra región y aportan información relevante para el estudio de esta infección en nuestro país. Por otro lado, nuestros resultados indican que tanto la disbiosis intestinal como la infección por *C. difficile* localizada en el intestino producen cambios en sitios distales como el pulmón y en los macrófagos, células especializadas en el reconocimiento de *M. tuberculosis*. Estos hallazgos destacan el papel del eje intestino-pulmón en el desarrollo de la CDI y de la Tuberculosis.

Este trabajo nos permitió establecer un punto de partida a partir del cual podremos profundizar en las respuestas inmunes innatas, mecanismos celulares y mediadores implicados en el eje establecido por *C. difficile* y *M. tuberculosis*.

INTRODUCCIÓN

Infección por *Clostridioides difficile* (CDI)

Epidemiología

La infección causada por *Clostridioides difficile* (CDI), un bacilo anaeróbico Gram+ formador de esporas, es la causa más común de diarrea en pacientes hospitalizados asociada al uso de antibióticos y a la disrupción de la microbiota intestinal ¹. *C. difficile* puede ocasionar desde diarrea leve hasta manifestaciones graves como megacolon tóxico, perforación intestinal, sepsis y shock séptico, con una mortalidad global en pacientes hospitalizados estimada en 9% ².

El consumo de antibióticos de amplio espectro (penicilinas, cefalosporinas, fluoroquinolonas y clindamicinas) ³ es el principal factor de riesgo de la CDI ⁴, debido a la alteración en el microbioma comensal del intestino que da lugar al establecimiento de *C. difficile* como patógeno ⁵. La edad avanzada es otro factor de riesgo. La tasa de CDI en individuos mayores de 65 años es 20 veces superior que en individuos más jóvenes ⁶. La presencia de comorbilidades, como la diabetes *mellitus* ⁷, la lesión renal aguda y enfermedades crónicas cardiopulmonares ⁸, también se han asociado a la CDI, en parte por la necesidad de un mayor contacto con la atención sanitaria y de hospitalización ⁹. Por otro lado, la supresión de la acidez gástrica puede permitir la persistencia de esporas de *C. difficile* cuando se ingieren y podría contribuir a un mayor riesgo de CDI en pacientes que toman fármacos inhibidores de la bomba de protones ^{4,10}.

La práctica estándar para el tratamiento de esta enfermedad consiste en la administración de antibióticos como metronidazol (MNZ), vancomicina (VAN) y fidaxomicina (FX). Paradójicamente, estos antibióticos pueden generar una disrupción de la flora microbiana, creando un nicho para CDI adicionales ¹¹. Por lo tanto, generar nuevas estrategias terapéuticas resulta sumamente necesario.

Actualmente, como alternativas se proponen agentes capaces de inactivar la producción de toxinas, estrategias de desactivación génica, inmunización mediante vacunas, probióticos (incluido el trasplante de materia fecal, FMT) y fagoterapia ¹¹.

En cuanto a la epidemiología de la CDI, la cepa hipervirulenta de *C. difficile* NAP1/BI/027 ha sido la responsable de la expansión geográfica y de brotes intrahospitalarios tanto en EE.UU. como en Canadá y Europa, afectando notablemente las tasas de morbilidad y mortalidad en la última década ¹². Más aún, en la última década nuevas cepas que causan CDI con pronósticos graves han sido reportadas, tales como 014/010, 017, 056, 106 y 078/126 ^{13,14}. La **tabla 1** resume la incidencia y las cepas más frecuentes en diferentes regiones del mundo (Adaptada de Liu y col, 2023 ¹⁵).

La CDI adquirida en la comunidad también aumentó su frecuencia en los últimos años y emerge como una enfermedad que afecta a pacientes considerados de bajo riesgo ¹⁶⁻¹⁸. Asimismo, *C. difficile* ha sido designado por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) como una de las cinco amenazas urgentes para la salud ¹⁹.

Nación/Región	Incidencia de la CDI	Cepas prevalentes
Estados Unidos	Incidencia de 101.3 [(CA (51.2) y HA (50.1)] casos por 100000 personas en 2020	Ribotipos 027, 106, 014/020, 002, 001
Canadá	La prevalencia de la HA-CDI decreció desde 5,9 a 4,3 por cada 10000 pacientes al día desde 2009 a 2015	Ribotipos 027, 106, 014/020
Europa	Incidencia media de CDI en 3,48 casos por 10.000 pacientes por día en 2016-2017 (60,9% HA, 32,7% CA y 6,7 rCDI)	Ribotipos 014/020, 078, 027, 001
Australia	4,05 casos por 10000 pacientes por cama al día en 2018	Ribotipos 014/020, 126, 078/126
Asia	Prevalencia de 5,3 por cada 10000 pacientes al día	Ribotipos 017, 018, 014/020, 001, 002, 010, 046, 126, 084
Sudamérica	-	Ribotipos 027, 106, 012, 046, 014/020

Tabla 1. Incidencia de la CDI y principales ribotipos de *C. difficile* en las distintas regiones del mundo. Adaptado de Liu, C., Monaghan, T., Yadegar, A., Louie, T. & Kao, D. *Insights into the Evolving Epidemiology of Clostridioides difficile Infection and Treatment: A Global Perspective. Antibiotics* **12**, 1141 (2023). CA adquirida en la comunidad, HA adquirida en ambientes hospitalarios, rCDI CDI recurrente.

En Argentina, se dispone de escasos datos sobre la incidencia y prevalencia de *C. difficile* como agente causal de diarreas. En 2001, se identificaron un 6,5% de casos de CDI en muestras de materia fecal en un centro médico de Buenos Aires, del cual 81% pertenecían a pacientes hospitalizados. En este caso, la CDI se asoció con antibióticos betalactámicos, quinolonas y aminoglucósidos ²⁰. Dos años más tarde, se reportó una incidencia de la CDI del 36,8% en pacientes sintomáticos en el hospital general Tornú, con un 15% de pacientes que adquirieron la CDI en la comunidad, y que previamente habían consumido betalactámicos, quinolonas o clindamicina ²¹.

En 2004, se reportaron cepas resistentes a la ampicilina y clindamicina entre diez aislamientos recuperados de ocho hospitales en Buenos Aires ²². Por su parte, en 2009, se calculó la incidencia de la CDI entre 37 a 84 pacientes cada 10 000 admisiones. Según este mismo estudio, el ribotipo de circulación más frecuente fue el RT017, seguido de los RT001, RT012 y RT014 ²³. En un estudio multicéntrico realizado en un hospital terciario de Argentina y 3 de México, la incidencia general detectada fue de 1,1 por 1000 pacientes ²⁴. No fue hasta 2018 que se estudiaron 31 aislamientos de *C. difficile* en dos hospitales de Buenos Aires, encontrando que un 16% de los aislamientos eran resistentes a la moxifloxacina, gatifloxacina y levofloxacina (fluoroquinolonas) ²⁵. Más recientemente, en 2022, se reveló la circulación de tres toxinotipos diferentes en hospitales del centro de Buenos Aires, estando uno de estos relacionado con la introducción de bacterias desde diferentes orígenes geográficos ²⁶. Estos estudios demuestran que los datos sobre la frecuencia y la relevancia de la CDI en nuestro país no son solamente escasos, sino también heterogéneos, y pone de manifiesto la necesidad de conducir nuevos estudios con enfoques locales que permitan poner en evidencia la epidemiología tan dinámica de la CDI.

Clostridioides difficile

Clostridioides difficile, antes conocida como *Clostridium difficile*, es una bacteria anaeróbica con un rasgo característico que la distingue de otras especies de la clase Clostridia; la capacidad de descarboxilar ácido parahidroxifenilacético para producir p-cresol, lo que le confiere el olor característico a establo ²⁷.

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, 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 ²⁸.

Todas las cepas de *C. difficile* toxigénicas presentan un locus de patogenicidad (PaLoc) formado por 5 genes (*tcdA*, *tcdB*, *tcdC*, *tcdE* y *tcdR*) (**Fig. 1**). Los principales factores de virulencia de *C. difficile* son dos toxinas, la toxina A (TcdA) y la toxina B (TcdB), codificadas por los genes *tcdA* y *tcdB* y de peso molecular de 308 y 270 kDa respectivamente ²⁹. TcdA es una enterotoxina responsable de la acumulación de líquido en el íleon, mientras que TcdB es una citotoxina con una potencia citotóxica aproximadamente 100 a 1000 veces mayor que TcdA ³⁰.

El gen *tcdR* actúa como regulador positivo de la expresión de TcdA y TcdB, mientras que *tcdC* actúa como regulador negativo, evitando la expresión de todo el PaLoc. Finalmente, *tcdE* codifica una holina que se encarga de hacer poros en la membrana citoplasmática permitiendo la liberación de las toxinas ³¹. Las cepas no toxígenas carecen del locus PaLoc.

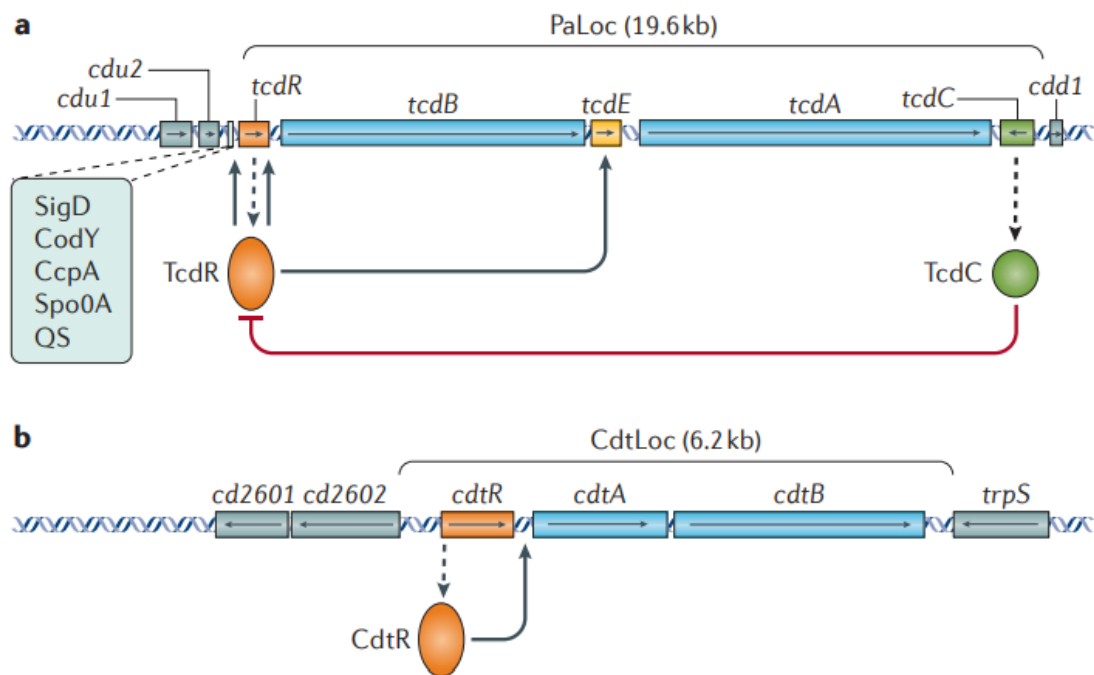


Figura 1. Locus de patogenicidad (PaLoc) y locus de la toxina binaria (CdtLoc). a) Representación esquemática del locus de patogenicidad (PaLoc). Se muestran los genes *tcdA* y *tcdB*, codificantes de las toxinas A y B respectivamente (recuadros azules); junto con su regulación positiva mediante el gen *tcdR* (recuadro naranja) y negativa mediante el gen *tcdC* (recuadro verde). **b)** Representación esquemática del locus de la toxina binaria (CdtLoc). Se muestran los genes de la toxina binaria *cdtA* y *cdtB* (recuadros azules), junto con su gen regulador *cdtR* (recuadro naranja). Adaptado de Smits, W. K., Lyras, D., Lacy, D. B., Wilcox, M. H. & Kuijper, E. J. *Clostridium difficile* infection. doi:10.1038/nrdp.2016.20.

Además del locus PaLoc, algunas cepas de *C. difficile* son portadoras de una transferasa (*C. difficile* transferasa: CDT), denominada también toxina binaria, formada por 2 subunidades: CDTa y CDTb, implicada en una mayor toxicidad y virulencia de estas cepas. Los genes que codifican esta toxina se encuentran en el locus Cdt (CdtLoc) (Fig. 1)³². La CDT está presente típicamente en la cepa hipervirulenta BI/NAP1/027 (descrita por primera vez en Latinoamérica por Quesada-Gómez et al. en 2010 en Costa Rica³³) como así también en los ribotipos 078 y 023.

Las proteínas de superficie llamadas proteínas de la pared celular (Cwps), que incluyen las proteínas de la capa superficial (S) (SLPs), la adhesina Cwp66 y la cisteína proteasa Cwp84; están implicadas en la adherencia y en la colonización intestinal pero también son capaces de disparar fuertes respuestas inmunes ³⁴; lo que sugiere que estas proteínas podrían tener un papel muy importante en la patogénesis ³⁵. Por otra parte, la formación de biofilms protege a la bacteria del oxígeno y de los antibióticos (incluyendo MNZ o VAN) ³⁶.

Las investigaciones actuales se centran, en su mayoría, en el papel de los dos principales factores de virulencia, TcdA y TcdB ³⁷, mientras que el papel de las proteínas de *C. difficile* liberadas durante su crecimiento y expuestas en la bacteria permanecen poco exploradas.

Los distintos factores de virulencia de *C. difficile* podrían dar lugar a diferentes mecanismos que lleven a la generación de una respuesta inmune protectora o a la inmunopatogénesis. Por lo tanto, evaluar el rol de estos factores resulta fundamental para comprender el desarrollo y desenlace de la CDI, así como también la implicancia en los casos de recurrencia.

Transmisión de la CDI

La transmisión de *C. difficile* ocurre típicamente por la vía fecal-oral, pero también puede tener lugar a partir de superficies, objetos u alimentos contaminados (**Fig. 2**) ^{38,39}; incluso el contagio vía secreciones naso-bucal ha sido recientemente sugerido ⁴⁰, como así también el potencial zoonótico ^{41,42}. Además, un reservorio natural en la comunidad lo constituyen los infantes menores a dos años de edad, quienes son frecuentemente colonizados por *C. difficile* ⁴³.

La CDI se contrae mediante la ingestión de esporas. El primer paso en el establecimiento de la colonización por *C. difficile* es la germinación de las esporas en células vegetativas productoras de toxinas, que es estimulada por los ácidos biliares primarios. En este sentido, una microbiota conservada protege frente a la CDI. Los miembros del filo Firmicutes pueden metabolizar los ácidos biliares primarios en ácidos biliares secundarios; los cuales inhiben el crecimiento de *C. difficile*. Entonces, una alteración del microbioma intestinal y la disminución de Firmicutes pueden aumentar el riesgo de colonización e infección por *C. difficile* ⁴⁴.

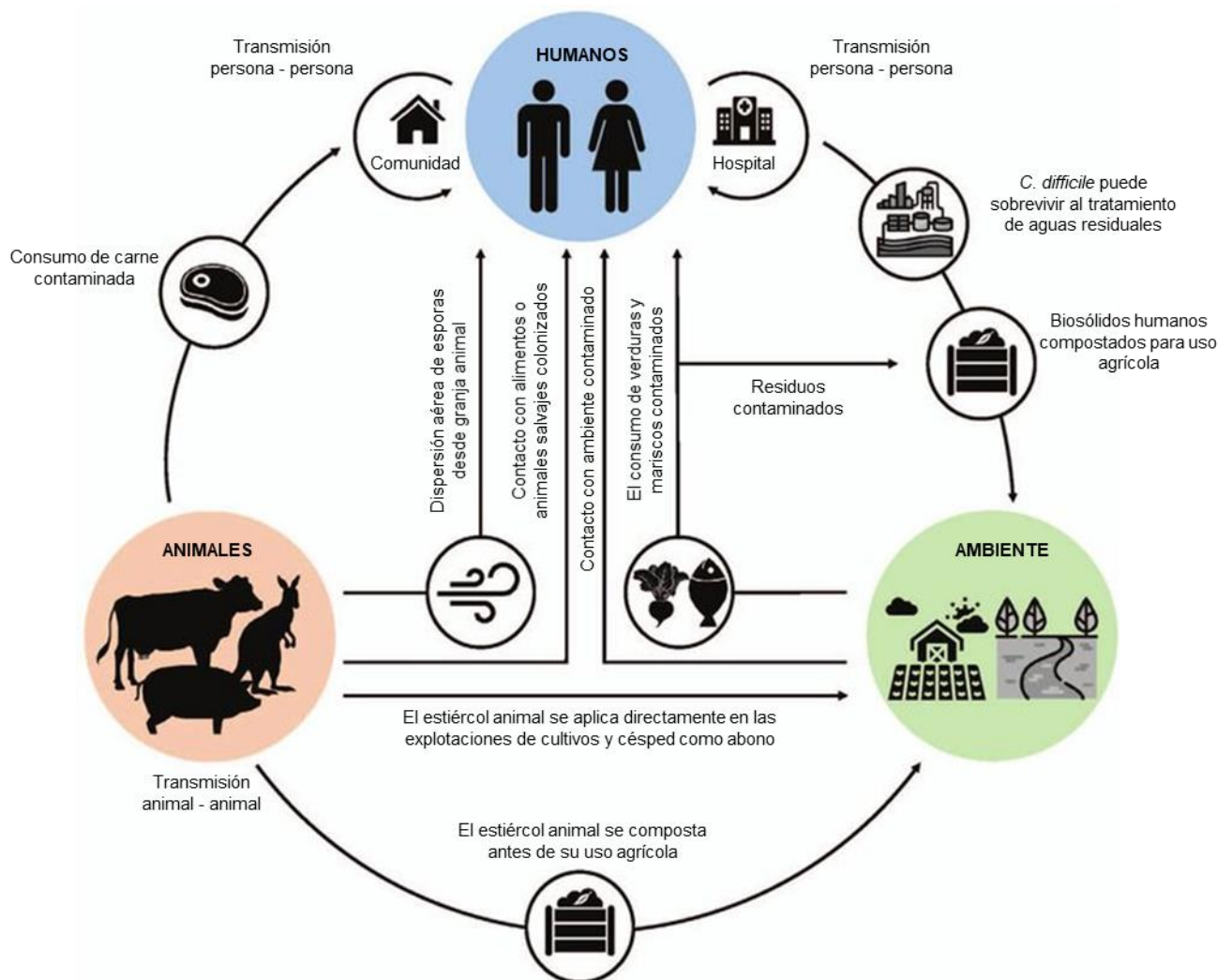


Figura 2. Principales reservorios y vías de transmisión de *C. difficile*. Adaptado de Lim, S. C., Knight, D. R. & Riley, T. V. *Clostridium difficile and One Health*. *Clin. Microbiol. Infect.* 26, 857–863 (2020).

Tuberculosis (TB)

Epidemiología

La Tuberculosis (TB) es una enfermedad que ha evolucionado junto con la humanidad durante milenios. Es causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis* y persiste como una de las 13 principales causas de muerte en todo el mundo ⁴⁵. A pesar de ser una enfermedad ancestral, aún hoy constituye un riesgo para la humanidad y un grave problema para la salud pública; ya que se estima que produce infección latente en entre 1/4 y 1/3 de la población mundial. Exceptuando el impacto de la pandemia por COVID-19, la TB ha sido la principal causa de mortalidad por un agente infeccioso en el mundo desde 2016. Según el último reporte de la Organización Mundial de la Salud, en 2022 la TB causó 1.30 millones de muertes ⁴⁵.

Datos actuales estiman que el 85% de los pacientes que desarrollan TB pueden ser tratados con éxito mediante un régimen de 6 meses de duración ⁴⁶. Es importante remarcar que la BCG (Bacillus Calmette-Guérin), introducida en 1921, es la única vacuna disponible, pero es de eficacia variable especialmente en regiones endémicas y sólo protege contra ciertos tipos de TB infantil. Por lo tanto, actualmente no existe una vacuna eficaz para prevenir la enfermedad en adultos, ni antes ni después de la exposición a *M. tuberculosis*.

La TB afecta principalmente a los pulmones, pero también puede afectar otros sitios (TB extrapulmonar). La infección por *M. tuberculosis* puede dar lugar a un espectro dinámico de manifestaciones clínicas, afectando principalmente el parénquima pulmonar presentando pérdida sostenida de peso, sudores nocturnos, fiebre, tos crónica, emaciación y hemoptisis. A su vez, el pronóstico puede variar desde la eliminación de la infección, hasta la TB latente asintomática o la TB clínicamente activa. Varios factores influyen en estos estados dinámicos, en particular la respuesta inmune, la microbiota y la interacción entre ellos.

Los principales factores de riesgo de la TB incluyen la infección por VIH, el alcoholismo, la desnutrición, el tabaquismo, la diabetes y la pobreza en general ⁴⁷, los cuales están estrechamente asociados con disbiosis intestinal y susceptibilidad proinflamatoria.

De particular importancia es el hecho de que las personas infectadas con *M. tuberculosis* a menudo tienen un diagnóstico tardío o se someten a un tratamiento con antibióticos no tuberculosos antes de que se les prescriba un tratamiento específico para la TB ^{48,49}; por lo que en ambos casos, la disbiosis del microbioma resultante puede aumentar la gravedad de la enfermedad ⁵⁰.

El boletín epidemiológico de Argentina emitido en Marzo 2023 por el Ministerio de Salud indica un aumento del 13,5% en el número de casos registrados en relación al 2020 ⁵¹. Durante 2021, 12.596 casos fueron notificados, y 734 muertes fueron registradas, un 11% más que en 2020 ⁵¹. Aunque todas las jurisdicciones de nuestro país presentaron casos de TB, la provincia de Buenos Aires y la CABA registraron el mayor número de casos (65,7%) ⁵¹.

Mycobacterium tuberculosis

M. tuberculosis es un patógeno intracelular que pertenece al género *Mycobacterium*, especie *Mycobacterium tuberculosis*. Todas las micobacterias pertenecientes al complejo de *Mycobacterium tuberculosis* puede producir la enfermedad, aunque en nuestro país el agente causal más frecuente de la enfermedad es *M. tuberculosis*. Además, varias especies poseen potencial zoonótico ⁴⁶.

El bacilo tuberculoso es una bacteria aeróbica estricta que mide entre 2 a 5 µm de largo y 0,2 a 0,3 µm de ancho, adopta forma de bastón con extremidades redondeadas, no presenta esporas, ramificaciones, ni flagelos y por lo tanto son inmóviles.

No se tiñen con la coloración de Gram, pero presentan características de microorganismos tanto Gram positivos como Gram negativos. Se tiñen con fucsina fenicada alcalina en calor (coloración de Ziehl-Neelsen) y son resistentes a la decoloración con ácidos en medio alcohólico (debido al elevado contenido de lípidos de su pared como se describe más adelante).

M. tuberculosis es un microorganismo muy resistente a agentes físicos y químicos. Se desarrolla de manera óptima a 35-37 °C, con una lenta capacidad de división (16-20 h) y su crecimiento depende de las condiciones locales en las cuales se desarrolla (como la presencia o ausencia de oxígeno o el pH del medio). La resistencia del bacilo en el granuloma (infiltrado inflamatorio que limita el crecimiento de *M. tuberculosis* en el pulmón) frente al estrés oxidativo generado por células fagocíticas o ante la limitación de nutrientes se debe a la gran ductilidad metabólica y a la gran capacidad para sintetizar proteínas dedicadas a la óxido-reducción y al transporte de oxígeno ⁵².

La envoltura de *M. tuberculosis* es una estructura compleja que facilita su supervivencia bajo condiciones extremas y contribuye sustancialmente con su patogenicidad y resistencia a drogas ⁵³. Está constituida por una cápsula, una pared celular y una membrana plasmática, las cuales se encargan de mediar el contacto y reconocimiento de las bacterias por parte de las células del sistema inmune (**Fig. 3**).

Fuera de la membrana plasmática, una capa de peptidoglicano (PG) está unida covalentemente al polisacárido arabinogalactano (AG). Los extremos no reductores del AG están esterificados con ácidos micólicos (MAc) de cadena larga ^{54,55}. Los lipoglicanos, glicolípidos y lípidos unidos de forma no covalente atraviesan los MAc y crean una capa lipídica periférica. Esta capa incluye clases de lípidos claves que influyen en los resultados de la infección y representan el 40% de la composición de la envoltura de las células de *M. tuberculosis* ⁵⁵.

Dichas estructuras tienen un papel fundamental en la patogénesis de la TB y son reconocidas diferencialmente por receptores de reconocimiento de patrones (PRR) ⁵⁶.

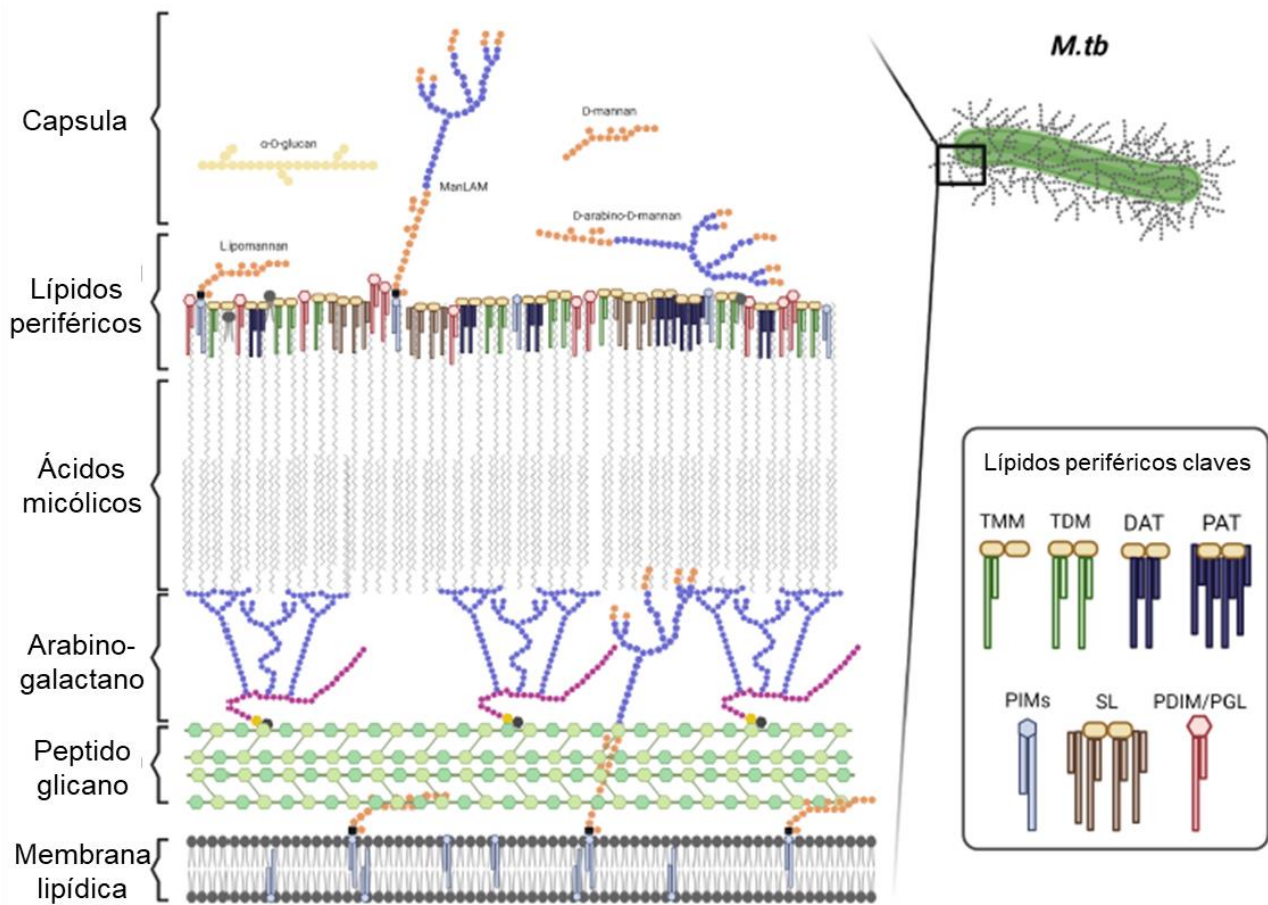


Figura 3. La envoltura celular de *M. tuberculosis*. TMM, monomicolato de trehalosa; TDM, dimicolato de trehalosa; DAT, diaciltrehalosa; PAT, pentaaciltrehalosa; PIM, fosfatidil-mio-inositol manósidos; SL, sulfolípidos; PDIM, dimicocerosatos de ftiocerol; y PGL, glicolípidos fenólicos. Adaptado de Schami, A., Islam, M. N., Belisle, J. T. & Torrelles, J. B. *Drug-resistant strains of Mycobacterium tuberculosis: cell envelope profiles and interactions with the host. Front. Cell. Infect. Microbiol.* 13, 1–14 (2023).

Transmisión de la Tuberculosis (TB)

El mecanismo de transmisión de la TB más común es través de la vía aerógena, por la inhalación de microgotas aerosolizadas emitidas por un individuo con TB activa mediante la tos, el estornudo u otros movimientos respiratorios que son depositadas en los alvéolos pulmonares distales. Aunque el sistema inmune puede controlar la infección, el control no lleva a esterilización. De hecho, la mayoría de los individuos infectados con *M. tuberculosis* son clínicamente asintomáticos, constituyendo un estadio conocido como TB latente ⁵⁷.

Los individuos infectados latentemente representan un enorme reservorio de la enfermedad. La forma latente de TB está definida por la ausencia de síntomas visibles de enfermedad, pero por la presencia de bacilos vivos persistentes en el hospedador. Este estado puede durar toda la vida de la persona infectada o progresar a TB activa mediante la reactivación de la infección existente (**Fig. 4**)⁵⁸.

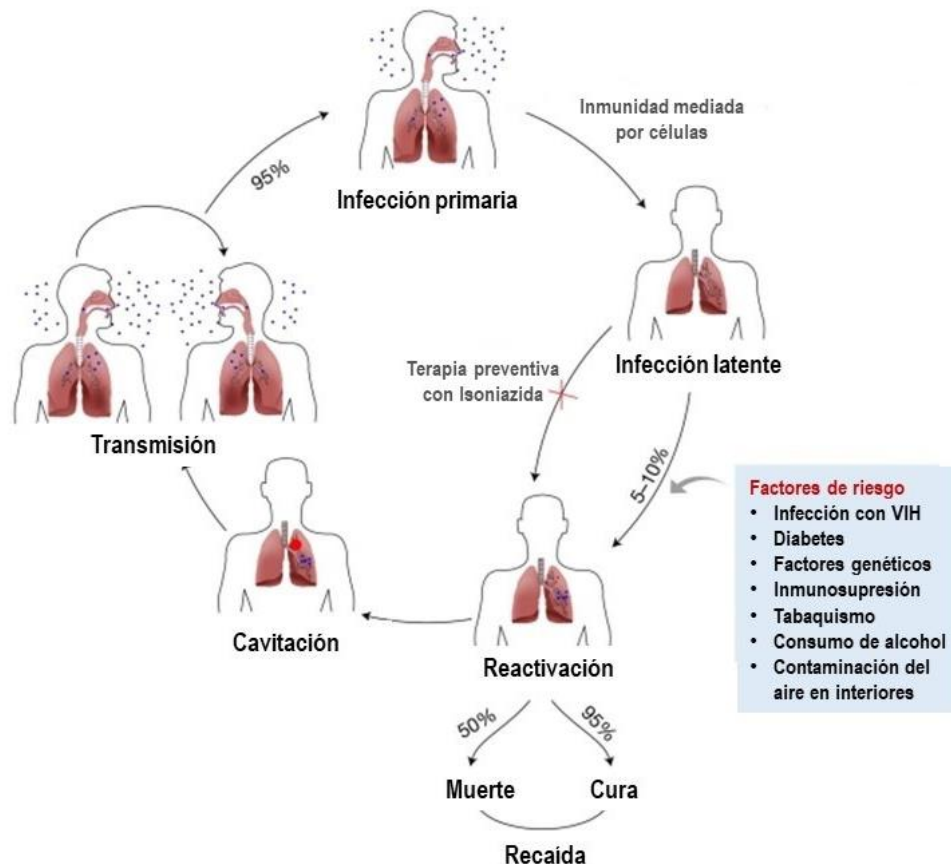


Figura 4. Ciclo de transmisión de la TB y principales factores de riesgo. Adaptado de Churchyard, G. et al. *What We Know about Tuberculosis Transmission: An Overview.* *J. Infect. Dis.* 216, S629–S635 (2017).

Macrófagos

Si bien la respuesta inmune frente a ambas infecciones es compleja e involucra diversos tipos celulares, los macrófagos, células mieloides fagocíticas residentes de tejido, ofician de centinelas inmunitarios en la primera línea de defensa.

En la CDI, la etapa de patogénesis temprana (0-12 h) se caracteriza predominantemente por inflamación intestinal aguda mediada por la respuesta inmune innata ⁵⁹. A diferencia de lo que ocurre en otros tejidos, los macrófagos intestinales requieren renovación constante a partir de monocitos circulantes ⁶⁰. Los estudios acerca de los macrófagos en la CDI indican que éstas células se activan y producen citoquinas y quimioquinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-12p40, MIP-1 α , MIP-2, MCP) y que inducen la expresión de ciertos receptores y moléculas coestimuladoras como TLR-2, TLR-4, CD40, CD80, CMH-II ^{34,61}.

Se ha propuesto también que la activación del inflammasoma en macrófagos podría ser beneficiosa para controlar la carga bacteriana ^{62,63}. Saad y col., expusieron la línea de macrófagos Raw 264.7 a diferentes cepas de *C. difficile* de ocurrencia común en entornos intrahospitalarios y encontraron que aquellas que producían un mayor nivel de toxinas, inducían una activación más profunda de los macrófagos (aumento en la expresión de IL-12, IL-6 y TNF- α) así como una pérdida de la integridad estructural ⁶⁴. Por otro lado, las esporas de *C. difficile*, a pesar de ser eficientemente reconocidas e internalizadas por las células murinas Raw 264.7, logran sobrevivir dentro de los macrófagos evitando su eliminación y promoviendo la persistencia en el intestino ⁶⁵. También se ha observado que la TcdA es internalizada por monocitos ⁶⁶ y nuestro grupo ha demostrado recientemente que los macrófagos son capaces de endocitar la bacteria vegetativa por macropinocitosis; proceso que se ve favorecido por la presencia de plaquetas ⁶⁷.

Por otro lado, el rol de los macrófagos en la TB es clave. Los macrófagos alveolares (AM) son células terminalmente diferenciadas que se acumulan en los pulmones durante el desarrollo fetal y se mantienen mediante la producción de GM-CSF y TGF- β por parte de las células del epitelio alveolar ⁶⁸. Después de la infección, son reemplazadas continuamente por macrófagos derivados de monocitos. *M. tuberculosis* ingresa a las vías respiratorias y es endocitada por los AM donde inicia el proceso de replicación ⁶⁹⁻⁷⁴. Los AM infectados con *M. tuberculosis* impulsan la formación de granulomas, junto con otros macrófagos intersticiales (IM) y espumosos, así como también con células epiteliales y otras células inmunes.

En un principio, los AM regulan positivamente la defensa contra *M. tuberculosis*, pero eventualmente la bacteria subvierte la respuesta antimicrobiana de estas células ⁷⁵. Es así que *M. tuberculosis* regula la autofagia, la apoptosis, la producción de citoquinas inflamatorias, la formación de inflamomas, y la presentación de antígenos. *M. tuberculosis* induce además la necroptosis a través de la secreción de TNF e INF de tipo I, ocasionando la muerte de los macrófagos, lo que irónicamente conduce a un mayor crecimiento y replicación bacteriana ⁷⁰. *M. tuberculosis* impulsa un fenotipo antiinflamatorio dependiente del metabolismo de ácidos grasos en los AM, mientras que los IM tienen un fenotipo proinflamatorio que limita la diseminación bacteriana ^{74,76}. A parte de esto, *M. tuberculosis* inicia la fusión de los macrófagos para formar células gigantes multinucleadas, que tienen una capacidad fagocítica reducida y pueden servir como un nicho permisivo para la supervivencia y propagación bacteriana ^{74,77,78}.

Interesantemente, estudios en ratones inmunizados con la vacuna de Bacillus Calmette-Guérin (BCG) han revelado la importancia de los macrófagos en la memoria inmune innata. Se ha demostrado que la BCG tiene la capacidad de reprogramar (a nivel epigenético y metabólico) a las células madre hematopoyéticas en la médula ósea.

Estos cambios hacen que los progenitores de monocitos generen macrófagos con un perfil proinflamatorio luego de la re-estimulación y restringen la replicación virulenta de *M. tuberculosis*^{69,79}. Todos estos cambios celulares contribuyen a una mejor respuesta a un estímulo heterólogo. Tras la estimulación, estas células entrenadas podrían exhibir una mayor expresión de moléculas coestimuladoras en la superficie celular, liberación de citoquinas inflamatorias y activación del inflamasoma⁸⁰.

Eje intestino-pulmón

El cuerpo humano contiene una amplia diversidad de microorganismos, conocidos en su conjunto como microbiota, que forman un sistema dinámico y funcional que co-evoluciona con el hospedador. Aunque el intestino alberga la mayor población, también están presente en la piel, las membranas mucosas, el tracto urogenital y el respiratorio ⁸¹. En condiciones fisiológicas, el microbioma es resistente a los cambios, lo que beneficia tanto al hospedador como a las comunidades microbianas, y se considera que se encuentra en estado de eubiosis ⁸². Contrariamente, la reducción de la capacidad adaptativa de un microbioma a cambios que provocan alteraciones desfavorables para el hospedador se denomina disbiosis ⁸³.

El sistema gastrointestinal y el sistema respiratorio, aunque constituyen entidades anatómicas separadas y distantes, forman parte de un sistema inmunológico asociado a las mucosas conocido como el eje intestino-pulmón. El eje intestino-pulmón postula que la preservación de una microbiota saludable es esencial para el desarrollo del sistema inmunitario y el mantenimiento de la homeostasis, estableciendo una conexión crucial entre la microbiota intestinal y la salud del sistema respiratorio, y viceversa (**Fig. 5**).

Incluso una microbiota distal al sitio de infección necesitaría mantenerse en equilibrio para que el sistema inmune pueda montar una respuesta eficiente frente a los patógenos. En efecto, la disbiosis intestinal se ha asociado con enfermedades pulmonares ⁸⁴. Diversas pruebas sugieren que los epitelios del hospedador y las células inmunitarias asimilan la información directamente de los microorganismos y de la respuesta local concomitante de citoquinas para ajustar las respuestas inflamatorias, y que esto da forma a las respuestas inmunes en sitios alejados como los pulmones ⁸⁵.

Estas interacciones están influenciadas por la migración de células inmunitarias y los metabolitos microbianos en respuesta a una infección o inflamación ^{86,87}. Los metabolitos microbianos producidos por la microbiota intestinal, como los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), el triptófano, los ácidos biliares secundarios y sus derivados, modulan las células inmunitarias y epiteliales ^{88,89}. Los AGCC inhiben la producción de citoquinas proinflamatorias por parte de los macrófagos y regulan la diferenciación de células T a Th1, Th17 y Tregs, por lo que son un componente central de esta interacción ^{90,91}.

Algunos trabajos han estudiado tanto la microbiota intestinal como la asociada al pulmón durante la infección por *M. tuberculosis* ⁹². A pesar del progreso en el tratamiento para la TB, la mayor susceptibilidad de las personas tratadas con drogas a la reinfección o reactivación de la enfermedad sugiere que los antibióticos pueden tener efectos asociados que impiden la generación de inmunidad permanente. Esta disbiosis da como resultado una disminución general de la producción microbiana de AGCC, que se ha asociado con una barrera epitelial intestinal debilitada y una reducción de la expresión de mucinas y AMP (incluidas las lectinas de tipo C, las defensinas y las catelicidinas), con la correspondiente exacerbación de la respuesta inflamatoria ^{90,93}.

En otros estudios se observó una disminución de bacterias productoras de AGCC en materia fecal de pacientes con TB ⁹⁴ así como modificaciones de la microbiota intestinal en pacientes con TB recurrente ⁹⁵. Más aun, estudios recientes demuestran que la terapia antituberculosa (Isoniacida (INH), Pirazinamida (PYZ) y Rifampicina (RIF)) produce cambios en la composición y diversidad del microbioma tanto en ratón como en humanos ^{96,97}. También se ha demostrado que el tratamiento con INH/PYZ previo a la infección con *M. tuberculosis* incrementa la carga bacteriana en pulmones y bazo comprometiendo así la defensa del hospedador; resultado que se revirtió mediante trasplante de materia fecal.

La falla en el control de la infección en los ratones tratados con INH/PYZ se asoció con defectos en la respuesta inmune innata, principalmente macrófagos alveolares con menores niveles de CMH II, TNF- α e IL-1 β y defectos en las funciones bactericidas ⁹⁸.

Interesantemente, los cambios en el microbioma inducidos por fármacos antituberculosos ocurren tanto durante el ciclo terapéutico como luego de la interrupción de la terapia, generando disbiosis a largo plazo ⁹⁹. También ha sido sugerido que la reactividad cruzada entre ciertos microorganismos intestinales y epítopes de *M. tuberculosis* es importante para mantener la resistencia a la infección por este patógeno a largo plazo y prevenir recurrencias ¹⁰⁰.

Asimismo, se han informado infecciones comunes y recurrentes por *C. difficile*, así como una mayor susceptibilidad a infecciones por *Salmonella enterica* y *Escherichia coli* después de la exposición a antibióticos ^{101,102}. Por tanto, es posible que el tratamiento antituberculoso tenga un efecto secundario que obstaculice la respuesta inmunitaria contra las micobacterias. La recaída de la enfermedad, la activación de los bacilos persistentes y el aumento de la susceptibilidad a la reinfección podrían ser causados por un control inmunológico disminuido como consecuencia de la disbiosis del microbioma intestino-pulmón ^{103,104}.

Además, la incidencia creciente de casos de infección por *C. difficile* en pacientes con TB ha sido documentada y vinculada a cepas de *C. difficile* que presentan resistencia a la rifampicina ¹⁰⁵⁻¹¹⁰. De hecho, se ha destacado una mutación común que conduce a la resistencia a ciertos antibióticos tanto en *C. difficile* como en *M. tuberculosis* ¹¹¹. Más aun, ha sido reportado que macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica de pacientes con enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) presentan funciones alteradas (fagocitosis, eliminación de patógenos, secreción de citoquinas y producción de intermediarios oxidativos) ¹¹²⁻¹¹⁴.

La evidencia acumulada sugiere que la disbiosis de la microbiota puede modular la susceptibilidad a la infección por *M. tuberculosis*, la transición de la latencia a la TB activa y la respuesta a la terapia antituberculosa ¹¹⁵. No obstante, el papel de la CDI en las respuestas inmunológicas generadas en el pulmón no ha sido objeto de estudio. Además, permanece desconocido el impacto de la CDI en las células del sistema inmunológico frente a la infección por *M. tuberculosis*. Es así que, una mejor comprensión de la comunicación entre el intestino y los macrófagos durante el desarrollo de infecciones pulmonares podría proporcionar nuevos conocimientos sobre futuras estrategias terapéuticas dirigidas a la interacción intestino-pulmón.

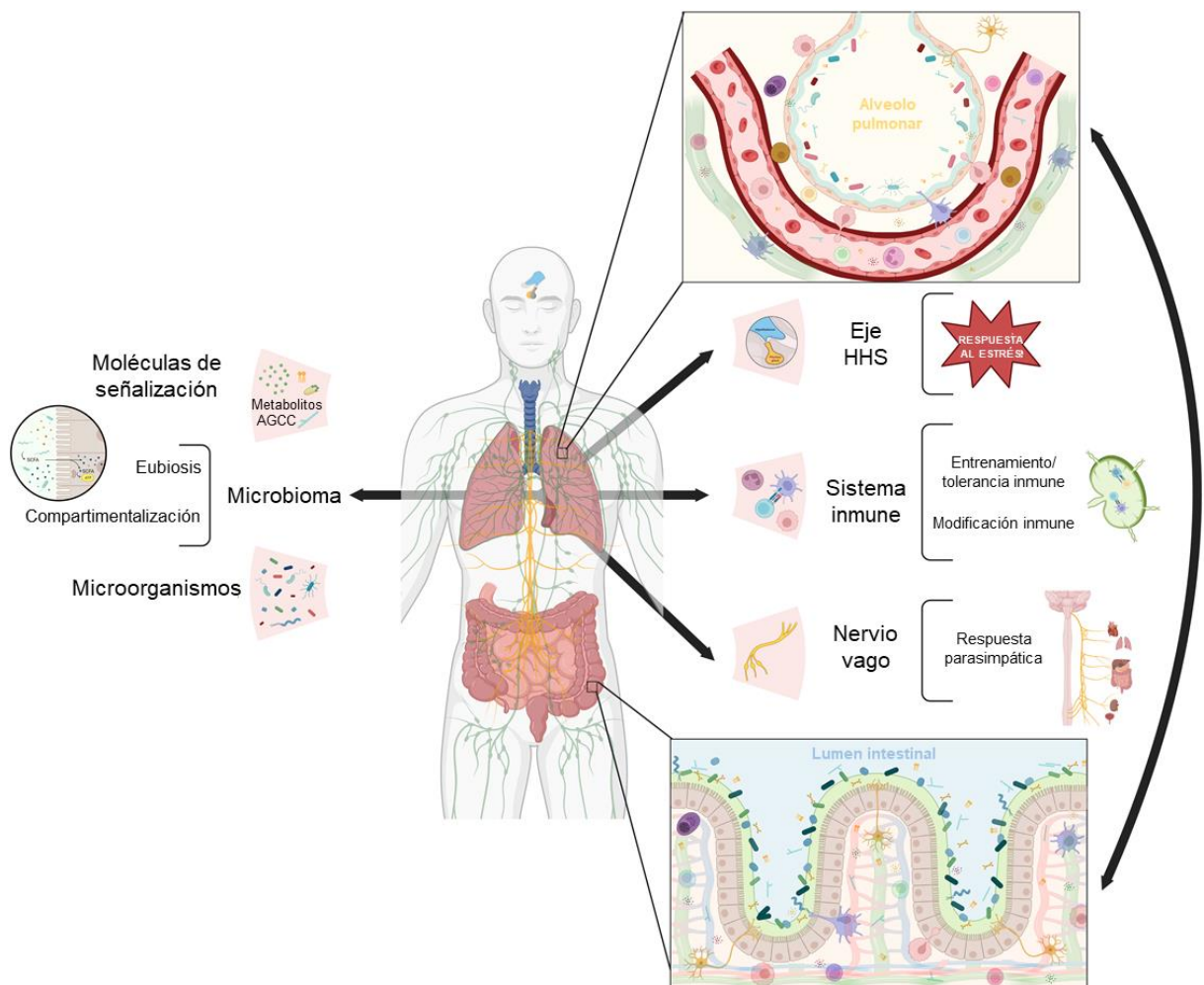


Figura 5. Vías y mecanismos de comunicación del eje intestino-pulmón descritas hasta el momento en la literatura. Eje hipotalámico-hipofisario-suprarrenal (HHS), Ácidos grasos de cadena corta (AGCC). Adaptado de Alvarado-Peña, N., Galeana-Cadena, D., Gómez-García, I. A., Mainero, X. S. & Silva-Herzog, E. The microbiome and the gut-lung axis in tuberculosis: interplay in the course of disease and treatment. *Front. Microbiol.* 14, 1–12 (2023).

SLAMF1

La molécula linfocitaria activadora de señales (SLAMF1), integrante de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig), específicamente perteneciente a la subfamilia CD2^{116,117}, ha sido objeto de estudios que revelan su expresión en diversas células del sistema inmunológico. Se ha documentado su presencia en células T activadas, células B, células dendríticas (CDs), macrófagos, plaquetas y células Tfh del centro germinal¹¹⁸. En términos de su funcionalidad, SLAMF1 actúa como molécula coestimuladora y como un sensor de patógenos, desempeñando roles cruciales en múltiples interacciones con microorganismos.

En humanos, SLAMF1 funciona como receptor de internalización para el virus del sarampión a través de la interacción con la hemaglutinina¹¹⁹ e interacciona con morbilivirus en otras especies¹²⁰. Además, posee capacidad para interactuar con *T. cruzi*¹²¹. En el contexto de bacterias Gram-negativas, SLAMF1 se ha asociado con la entrada de *E. coli* y *Citrobacter Rodentium* en macrófagos de mamíferos^{122,123} y reconoce proteínas de membrana externa tanto de *E. coli* (OmpC y OmpF)¹²³ como de *Brucella abortus* (Omp25)¹²⁴ y *Salmonella typhimurium*¹²³.

Destacablemente, SLAMF1 desempeña un papel clave en la respuesta a la infección por *M. tuberculosis*. La coestimulación a través de SLAMF1 se ha asociado con la inducción de la producción de interferón- γ (IFN- γ) por parte de las células T¹²⁵. En estudios de expresión génica mediante *microarrays*, se han observado niveles elevados de ARNm de SLAMF1 en macrófagos humanos estimulados con diversas bacterias, incluyendo BCG y la cepa Erdman de *M. tuberculosis*¹²⁶, así como en macrófagos alveolares humanos infectados con las cepas H37Ra y H37Rv de *M. tuberculosis*¹²⁷. Los estudios de Song y col. han evidenciado que la regulación positiva de SLAMF1 favorece la eliminación bacteriana tanto en la línea celular macrofágica murina Raw 264.7 infectada con BCG como en el pulmón de ratones infectados con esta bacteria¹²⁸.

Adicionalmente, se ha destacado la participación de SLAMF1 en la autofagia mediada por neutrófilos durante la TB ¹²⁹. Resultados de nuestro grupo de trabajo demuestran el direccionamiento de *M. tuberculosis* hacia los lisosomas en macrófagos humanos ¹³⁰.

El papel de SLAMF1 en la CDI aún permanece desconocido. Sin embargo, en el contexto intestinal, se ha observado que ratones deficientes para SLAMF1 presentan una disminución en la producción de TNF- α e IL-12 por parte de macrófagos peritoneales estimulados con LPS y/o IFN- γ ¹³¹. En pacientes con enfermedad de Crohn, se ha identificado un elevado número de monocitos, macrófagos y otras células SLAMF1+, subrayando su potencial implicancia en condiciones inflamatorias intestinales ¹³². Van Driel y col. han sugerido que SLAMF1 podría regular la homeostasis de los macrófagos durante episodios de enterocolitis crónica o aguda ¹³³. Además, Wang y col. han informado que SLAMF1, junto con SLAMF8, modulan la migración de CD4 y macrófagos hacia el intestino inflamado ¹³⁴. Estos hallazgos destacan la multifuncionalidad de SLAMF1 en el contexto intestinal, sugiriendo su posible participación en la respuesta a la inflamación y la regulación de la homeostasis celular en este entorno particular.

Estos descubrimientos subrayan la importancia de SLAMF1 como un regulador crítico en las respuestas inmunológicas asociadas tanto con la infección por *M. tuberculosis* como con las enfermedades inflamatorias intestinales. Por lo tanto, SLAMF1 podría constituir un nuevo blanco terapéutico en el tratamiento de enfermedades inflamatorias intestinales, así como en las terapias dirigidas al hospedador durante la TB.

Hipótesis

Como ha quedado demostrado, *C. difficile* y *M. tuberculosis* son agentes infecciosos que representan una amenaza grave para la salud a nivel mundial. Asimismo, se ha puesto de manifiesto la necesidad de comprender el eje intestino-pulmón dada su importancia en condiciones fisiológicas y patológicas. La microbiota en su conjunto representa un actor clave en el funcionamiento del sistema inmune, y aún más, en el desarrollo de estas infecciones bacterianas. La evidencia reunida hasta el momento demuestra que la perturbación del equilibrio en la microbiota afecta la susceptibilidad del hospedador a *M. tuberculosis*, así como la respuesta al tratamiento. Sin embargo, los procesos subyacentes que conllevan a este escenario aún permanecen poco explorados. En otra perspectiva, los extensos tratamientos anti-TB suponen un desencadenante de la disbiosis, lo que podría permitir la colonización por *C. difficile*, por lo que todavía resta explorar cómo el establecimiento de este patógeno puede repercutir en la respuesta inmune frente a *M. tuberculosis*. Por ende, aún se requieren investigaciones profundas en modelos experimentales adecuados y utilizando muestras humanas que permitan dilucidar los mecanismos que moldean la relación entre *M. tuberculosis*, el eje intestino-pulmón y la disbiosis, así como también el impacto de la CDI en este contexto. Teniendo en cuenta que la disbiosis genera un impacto sistémico que modula al sistema inmune, en específico a actores cruciales en la respuesta antiinfecciosa como son los macrófagos; y que a su vez genera un estado permisivo para el establecimiento de patógenos oportunistas como *C. difficile*, consideramos que el estado del microbioma podría ser un factor clave en la infección ocasionada por *M. tuberculosis*. Por tanto, *la hipótesis que sustenta el presente trabajo radica en que la disbiosis intestinal originada por el consumo de antibióticos, y la consecuente infección por C. difficile, podrían modificar la estructura pulmonar y modular la respuesta macrofágica, llevando a una alteración de su función endocítica y, en consecuencia, interferir con su rol inmunoprotectivo frente a la infección por M. tuberculosis.*

OBJETIVOS

Objetivo general

Teniendo en cuenta la intercomunicación entre la microbiota y el sistema inmune, el objetivo general de este trabajo final de grado consiste en caracterizar la población de pacientes con CDI en nuestra región y evaluar la estructura pulmonar y la función endocítica de los macrófagos frente a *M. tuberculosis* en el contexto de la disbiosis intestinal generada por la administración de antibióticos y de la infección por *C. difficile*. Esto nos permitirá comenzar a explorar el eje intestino-pulmón en el contexto de dos infecciones bacterianas de relevancia epidemiológica y a desentrañar su rol en las respuestas inmunes innatas.

Objetivos específicos

Objetivo 1 Estudiar el perfil de pacientes con sospecha de infección por *C. difficile* del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.

1.1 Realizar una caracterización de parámetros clínicos y demográficos de pacientes con sospecha de CDI.

1.2 Analizar factores de riesgo asociados a la infección por *C. difficile* en pacientes hospitalizados bajo sospecha de CDI.

1.3 Llevar a cabo una revisión sistemática y un meta-análisis con el fin de documentar la asociación entre factores de riesgo relacionados con el desarrollo de CDI de estudios seleccionados y los pacientes con sospecha de CDI evaluados en este trabajo.

Objetivo 2 Analizar la capacidad endocítica de macrófagos provenientes de dadores sanos frente a *M. tuberculosis* pre-sensibilizados o no con *C. difficile* en un modelo *in vitro* humano.

2.1 Obtener macrófagos derivados de monocitos, pre-sensibilizarlos o no con *C. difficile* y estudiar la endocitosis de *M. tuberculosis*.

2.2 Evaluar el rol de la Molécula Linfocitaria Activadora de Señales (SLAMF1) como sensor microbiológico de *M. tuberculosis* en los macrófagos luego de la pre-sensibilización con *C. difficile*.

Objetivo 3 Evaluar el impacto de la disbiosis intestinal y de la CDI a nivel tisular en un modelo murino.

3.1 Examinar características histológicas del ciego y el colon durante la disbiosis y la evolución de la CDI.

3.2 Estudiar la estructura pulmonar y caracterizar histológicamente la existencia de cambios tisulares mediados por la disbiosis intestinal y la CDI.

MATERIALES Y MÉTODOS

Objetivo 1. Estudiar el perfil de pacientes con sospecha de infección por *C. difficile* del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires

Toma de muestras e Instituciones participantes

Se obtuvieron 249 muestras de materia fecal (no formadas) de pacientes hospitalizados mayores de 18 años, las cuales fueron congeladas a -20 °C hasta su utilización. Estos pacientes presentaron diarrea con sospecha clínica de infección por *C. difficile* (CDI). La investigación se llevó a cabo de acuerdo con la Declaración de Helsinki (2013) promulgada por la Asociación Médica Mundial y aprobada por el Comité de Ética de la UNNOBA (COENOBAs, expediente N° 2919-1594/17), luego de obtener los consentimientos informados.

Las muestras fueron derivadas de los siguientes centros de salud de la ciudad de Junín: Hospital Interzonal General de Agudos (HIGA) Abraham Félix Piñeyro, Clínica Centro de Junín, Clínica IMEC de Junín y Clínica La Pequeña Familia. Particularmente, el HIGA nuclea muestras de la Región Sanitaria III, comprendida por los municipios de Chacabuco, F. Ameghino, General Arenales, General Pinto, General Viamonte, Junín, Leandro N. Alem y Lincoln.

Caracterización de las/los pacientes

Se evaluaron parámetros clínico-demográficos de la totalidad de pacientes con sospecha de CDI comprendidos entre el 1 de enero del año 2018 hasta el 31 de diciembre del año 2023. La información evaluada se obtuvo a partir de las historias clínicas (**Fig. 1**) de las/los pacientes provistas por el personal de salud. Para esto, en primer lugar, se determinó la presencia de *C. difficile* en muestras de materia fecal utilizando un algoritmo diagnóstico de rutina en nuestro laboratorio (**Fig. 2**).

Ficha del paciente (CDI)		Antecedentes de diarrea por CD. Tuvo CDI <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> ¿Cuándo?				
Edad		Fecha de inicio de la diarrea				
Sexo: Femenino <input type="checkbox"/> Masculino <input type="checkbox"/>		LABORATORIO	Día 1 Fecha:	Día 3 Fecha:	Día 5 Fecha:	Día 7 Fecha:
Nacionalidad		GB				
Etnia: Caucásico <input type="checkbox"/> Amerindio <input type="checkbox"/> Asiático <input type="checkbox"/>		N				
Días de internación/Fecha de internación		L				
Fecha de toma de muestra:		Eo				
Internación previa en los últimos 28 días Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>		Mo				
Procedencia: domicilio, geriátrico/hogar, otra institución de salud		Bas				
Clasificación epidemiológica CDI: Comunidad <input type="checkbox"/> IH <input type="checkbox"/> IH de inicio en comunidad <input type="checkbox"/>		Úrea				
Adquisición en otra institución Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Cual?		Creatinina				
Lugar de internación: PISO <input type="checkbox"/> UTI <input type="checkbox"/>		Plaquetas				
¿Estuvo internado en otra sala? Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> ¿Cuál?		Albumina				
Fecha de ingreso/egreso:		Evolución				
Motivo de internación		Tiempo hasta resolución de la diarrea (en días)				
Comorbilidades (HIV, DBT, Corticoides, ERC, ICC, IBD, Quimioterapia, Inmunosupresores, enfermedades respiratorias, otras). Medicación habitual:		Ingreso a UTI Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Motivo relacionado?				
Recibió ATB en los últimos 3 meses antes de internarse: Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>		Shock Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Ileo Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Megacolon Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>				
Describir (cual/es, inicio/fin, Dosis)		Óbito en la internación Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> ¿Relacionado?				
Recibió ATB durante esta internación: Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>		Clasificación:				
Describir (cual/es, inicio/fin, Dosis)		Moderada Severa Fulminante				
Recibió inhibidores de la bomba de protones en la internación Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>		Fecha de alta/total días de internación:				
Recibió inhibidores H2 u otros reductores del ácido gástrico previo a la interacción Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>		Observaciones				

Figura 1. Modelo de historia clínica utilizada en este estudio epidemiológico.

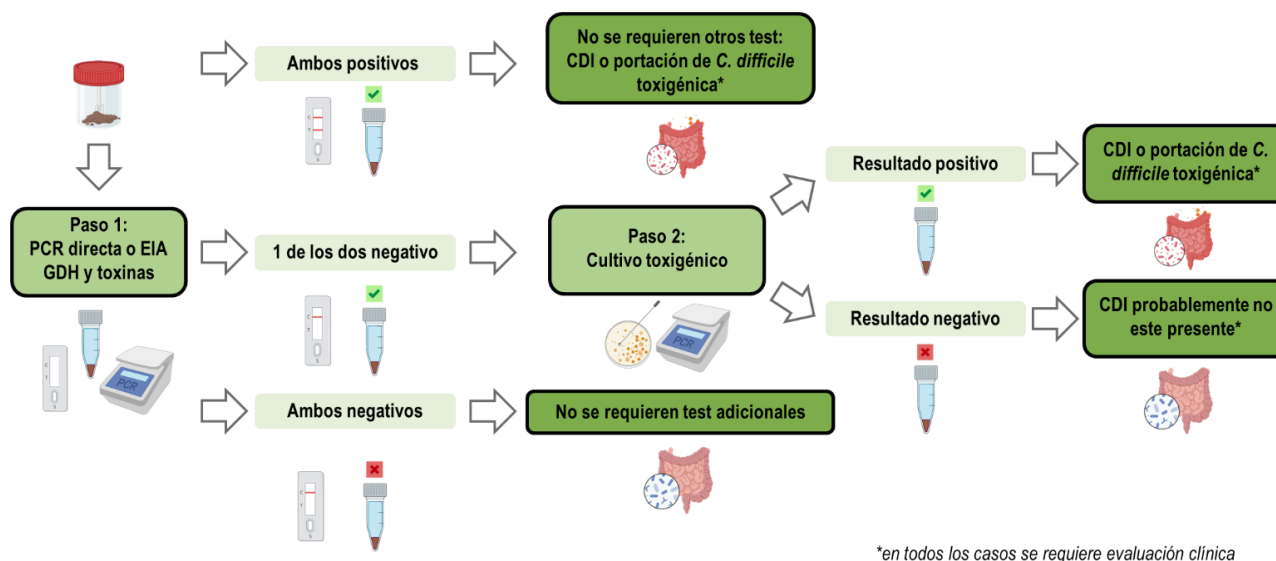


Figura 2. Algoritmo diagnóstico de detección de *C. difficile*. Los tres métodos de detección (EIA, PCR y Cultivo toxigénico) fueron aplicados en el procesamiento de las 249 muestras de materia fecal abarcadas en este estudio.

Algoritmo diagnóstico

El algoritmo de detección de *C. difficile* implica tres técnicas: Enzimoimmunoensayo (EIA), Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y Cultivo toxigénico (**Fig. 2**).

Enzimoinmunoensayo EIA

Una vez descongelada la muestra de materia fecal se realizó un EIA para GDH (Glutamato deshidrogenasa de *C. difficile*) y toxinas A y B de *C. difficile* (*CoproStrip™ C. difficile GDH + Toxin A + Toxin B Savyon® Diagnostics Ltd*) siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, se toma una alícuota de materia fecal, y se mezcla con el buffer comercial del EIA. A continuación, se colocan 4 gotas de muestra en cada uno de las ranuras del cassette (**Fig. 3**). Luego de 10 minutos se analiza el resultado.



Figura 3. Procedimiento para la realización del EIA.

PCR punto final para la detección GDH y tcdB de *C. difficile*

Se utilizó el kit *Taq Phire Tissue Direct PCR Master Mix* (Thermo Fisher (Cat. F-1705)). Se tomaron 3 μ l de muestra de materia fecal y se colocaron en 20 μ l de *Dilution Buffer* en un microtubo estéril. Luego se adicionaron 0,5 μ l de *DNA Release Additive Buffer*, se dejó reposar durante 2 a 5 minutos a temperatura ambiente, y seguidamente 2 minutos a 98 °C en termobloque. Transcurrido el tiempo, se realizó un spin, y se tomó el sobrenadante que contiene el ADN. Se preparó la mix de PCR como se detalla en la **Tabla 1**. El ciclado se resume en la **Tabla 2** y los cebadores utilizados en la **Tabla 3**. Finalmente, las muestras amplificadas se resolvieron en un gel de agarosa al 2% teñido con Sybr Safe (Invitrogen) y se visualizaron en transiluminador UV. Los amplicones resueltos corresponden a tcdB (410 pb) y GDH (736 pb).

Mezcla para 20 μL finales	1X
Mix 2X	10 μ L
Cebadores <i>gdh</i> Fw	1 μ L dilución 1/16.6
Cebadores <i>gdh</i> Rv	1 μ L dilución 1/16.6
Cebadores <i>tcdB3</i> Fw	1 μ L dilución 1/16.6
Cebadores <i>tcdB3</i> Rv	1 μ L dilución 1/16.6
H₂O UP	5 μ L
Muestra (ADN)	1 μ L

Tabla 1. Mezcla de reacción para la detección de *gdh* y *tcdB*.

98°C 5 minutos ---[Desnaturalización Inicial

98°C 5 segundos	} 35 ciclos <i>tcdB</i>
62°C 5 segundos	
72°C 20 segundos	

72°C durante 1 minuto ---[Elongación final

98°C 5 segundos	} 20 ciclos <i>gdh</i>
56°C 5 segundos	
72°C 40 segundos	

72°C durante 1 minuto ---[Elongación final

Tabla 2. Ciclos de PCR para la detección de *gdh* y *tcdB* en una misma reacción.

	Secuencia	Amplicón
TcdB3 Fw	5'-CCAAAATGGAGTGTTACAAACAGGTG-3'	410 pb
Tcdb3 Rv	5'-GCATTTCTCCATTCTCAGCAAAGTA-3'	
GDH Fw	5'-GGAAAAGATGTAAATGTCTTCGAGATG-3'	736 pb
GDH Rv	5'-CTGATTTACACCATTTCAGCCATAGC-3'	

Tabla 3. Cebadores específicos para la detección de *gdh* y *tcdB*.

Cultivo toxigénico

Se realizó shock etanólico a las muestras de materia fecal con el fin de eliminar la mayor cantidad de microorganismos y activar la germinación de las esporas de *C. difficile*. Para esto, en un tubo de microcentrífuga se agregaron en partes iguales material fecal y etanol 70%, y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se realizó una centrifugación a 4000 rpm durante 10 minutos, descartando el sobrenadante.

El pellet obtenido se cultivó en medio CHROMAgar™ *C. difficile* a 37 °C durante 72 h utilizando sobres de anaerobiosis (AnaeroPack, Mitsubishi Gas Chemical Company, Inc, Japón) y jarras para cultivo en condiciones de anaerobiosis en agitador/incubador *ThermoFisher Scientific MaxQ4450*. Una vez obtenidas las colonias aisladas, se tomaron al menos dos con el ansa y se colocaron en 150 µl de agua estéril en un tubo de microcentrífuga. A continuación se realizó un *boiling* en termobloque precalentado a 98 °C durante 20 minutos. Se centrifugó a 10000 rpm por 2 minutos y se tomó el sobrenadante para detectar la presencia de la toxina B y GDH mediante PCR como fue descrito previamente (**Tablas 1, 2 y 3**).

Establecimiento de predictores de riesgo

Clasificados los pacientes como CDI+ y CDI-, se tuvieron en cuenta los siguientes factores informados en las historias clínicas (**Tabla 4**):

FACTORES CLÍNICO-DEMOGRÁFICOS	RECUENTOS SANGUÍNEOS
Edad	Leucocitos (cels./mm ³)
Sexo Biológico	Neutrófilos (cels./mm ³)
Internación previa	Monocitos (cels./mm ³)
Consumo previo de Antibióticos	Linfocitos (cels./mm ³)
Antibióticos durante la internación	Eosinófilos (cels./mm ³)
Presencia de comorbilidades	Basófilos (cels./mm ³)
Consumo previo de Inhibidores de la Bomba de Protones	Plaquetas (cels./mm ³)
CDI previa	Urea (mg/dl)
Lugar de internación	Creatinina (mg/dl)
Necesidad de Unidad de Cuidados Intensivos (UTI)	Albúmina (g/dl)
Procedencia	
Clasificación de diarrea	
Shock	
Óbito	

Tabla 4. Parámetros analizados para la caracterización de las/los pacientes.

Las variables categóricas se resumieron mediante el número de pacientes en cada grupo de comparación, mientras que, por su parte, las variables continuas se resumieron mediante estadísticas descriptivas (media y desviación estándar).

El tipo de adquisición de la CDI se definió, según la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas (del inglés, IDSA) ¹³⁵, como:

- CDI Hospitalaria: CDI que se presenta luego de las 72 h de internación.
- CDI de inicio en la comunidad pero asociado al ámbito sanitario: CDI en un paciente que se presenta en la comunidad, pero con antecedentes de internación y alta en los últimos 28 días.
- CDI Comunitaria: CDI que se presenta en la comunidad o en las primeras 72 h de internación y sin antecedentes de internación en los últimos 28 días.

Para la clasificación de la severidad de la CDI se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros según la IDSA ¹³⁵:

- CDI leve/moderada: Presencia de diarrea, leucocitos normales o elevados y creatinina normal.
- CDI grave: Presencia de diarrea, más dos de los siguientes parámetros: Leucocitos superiores a 15000/mm³, creatinina superior a 1.5 mg/dl, albumina sérica inferior a 3 gr/dl y/o lactato superior a 2.2 mmol/l
- CDI complicada: CDI grave aunada a íleo y/o hipotensión y/o shock séptico y/o perforación y/o requerimiento de UTI y/o deterioro del sensorio y/o ascitis (sin otra causa) y/o colitis pseudomembranosa en colonoscopia y/o criterios imagenológicos (distensión de colon superior a 6 cm, engrosamiento de pared de colon, inflamación de la grasa pericolónica).

Análisis estadístico

En las comparaciones para cada variable se utilizó el método paramétrico prueba t o no paramétrico test de Mann-Whitney para muestras no pareadas. Para el análisis de distribución de frecuencias de variables cualitativas/nominales se utilizó el test exacto de Fisher.

Los valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Los datos se analizaron con el software GraphPad Prism 8.0.1 (San Diego, CA, EE. UU.).

Meta-análisis

Se realizó una búsqueda bibliográfica en los buscadores académicos PubMed y Google Scholar, además del buscador con IA integrada SciSpace. Los términos de búsqueda utilizados fueron: “CDI”, “*C. difficile*”, “CDI *clinical records*”, “CDI *Epidemiology*”, “*Cases and Control CDI study*”. Se seleccionaron aquellos trabajos que cumplieran con la definición de casos (pacientes con diarrea y diagnósticos CDI positivo mediante EIA, PCR y/o cultivo toxigénico) y controles (pacientes con diarrea y diagnóstico de CDI negativo mediante EIA, PCR y/o cultivo toxigénico). Se priorizó además aquellos que contuvieran las siguientes variables de interés: Edad, Sexo biológico, Uso de antibióticos en los 3 meses previos, Uso de inhibidores de la bomba de protones, Conteo de leucocitos, Conteo de plaquetas, Presencia de comorbilidades (*Diabetes mellitus*, Enfermedad cardíaca, Enfermedad renal, HIV).

Los datos de los estudios seleccionados se recabaron en una tabla modelo (**Fig. 4**), y se cargaron en RStudio haciendo uso del package “*Metafor*”. Se procedió al cálculo de *Odds Ratio* (OR, para las variables categóricas) y de Diferencia de Media Estandarizada (SMD, para variables continuas), para luego ajustar un modelo de efectos aleatorios de REML (*Random Effect Maximum Likelihood*). Se tomó como potencial predictor de riesgo de incidencia de CDI aquellos modelos que presentaron un valor $p < 0,05$. El flujo de trabajo del meta-análisis se encuentra resumido en la **Fig. 5**.

Estudio ID	Características del estudio							Datos demográficos										
	Autor, Año	País	Tiempo de muestreo	Fuente de la información	Número de camas	Diseño del estudio	Criterios de inclusión del caso	Selección de controles	Tamaño muestral	Casos CDI	Casos no CDI	Edad, Media, SD, CDI	Edad >65, CDI	Edad, Media, SD, No CDI				

ATB 3 meses grupo CDI		ATB 3 meses grupo no CDI		PPI grupo CDI		PPI grupo no CDI		Internación previa grupo CDI		Internación previa grupo no CDI		CDI previa grupo CDI		CDI previa grupo no CDI	
Expuesto	No expuesto	Expuesto	No expuesto	Expuesto	No expuesto	Expuesto	No expuesto	Expuesto	No expuesto	Expuesto	No expuesto	Expuesto	No expuesto	Expuesto	No expuesto

Leucocitos (cel/mm3)		Plaquetas		Diabetes <i>mellitus</i>				Enfermedad cardiaca cronica				Enfermedad renal cronica				HM			
Grupo CDI	Grupo no CDI	Grupo CDI	Grupo no CDI	Grupo CDI Expuesto	Grupo CDI No expuesto	Grupo No CDI Expuesto	Grupo No CDI No	Grupo CDI Expuesto	Grupo CDI No expuesto	Grupo No CDI Expuesto	Grupo No CDI No	Grupo CDI Expuesto	Grupo CDI No expuesto	Grupo No CDI Expuesto	Grupo No CDI No	Grupo CDI Expuesto	Grupo CDI No expuesto	Grupo No CDI Expuesto	Grupo No CDI No

Figura 4. Tabla utilizada para la recolección de datos en los estudios incluidos en el meta-análisis.

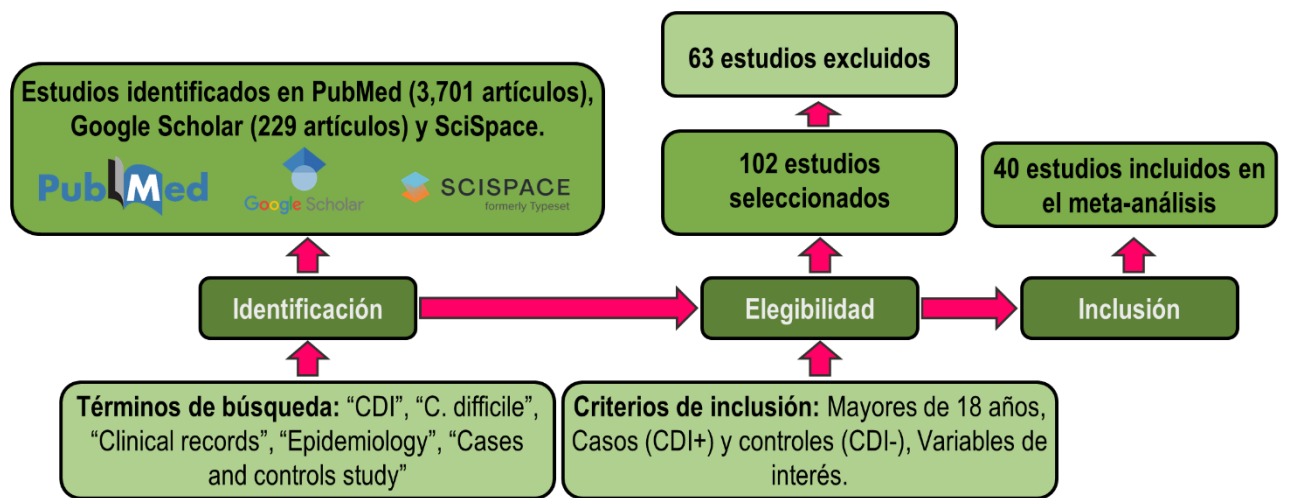


Figura 5. Flujo de trabajo seguido durante la realización del meta-análisis. Aquellos trabajos identificados por los términos de búsqueda que cumplieron con los criterios de elegibilidad fueron incluidos en el meta-análisis.

Objetivo 2. Analizar la capacidad endocítica de macrófagos provenientes de dadores sanos frente a *M. tuberculosis* pre-sensibilizados o no con *C. difficile*

Cultivo e inactivación de *C. difficile*

La cepa hipervirulenta NAP1/BI/027 de *C. difficile* (provista por el Servicio de Bacteriología Sanitaria del Instituto Carlos Malbrán-ANLIS) se cultivó utilizando placas de CHROMagar™ *C. difficile* a 37 °C en condiciones de anaerobiosis utilizando bolsas de anaerobiosis (Mitsubishi) y parches generadores de atmósfera anaeróbica (AnaeroPack, Mitsubishi). Para los cultivos en suspensión en BHI se utilizó el patrón de turbidez de McFarland como referencia para determinar el número de bacterias/ml. Para inactivar la bacteria, se tomó una alícuota del caldo de cultivo de *C. difficile* y se centrifugó a 15000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Se lavó el pellet de bacterias con PBS 1X centrifugando a 15000 rpm por 10 minutos a 4 °C y se resuspendió en PBS 1X una vez descartado el sobrenadante. Posteriormente, se incubó a 95 °C por 30 minutos en termobloque. Finalmente, se cuantificó el contenido antigénico (CDH) a 600 nm y se ajustó a una DO de 1 para garantizar la paridad entre ensayos.

Obtención de *M. tuberculosis*

M. tuberculosis inactivada por rayos gamma (WCMtb, NR -14819, cepa virulenta H37Rv) fue obtenida de BEI Resources. En este caso, el contenido antigénico también se ajustó a una DO de 1 a 600 nm.

Tinción de bacterias

Para ciertos ensayos, CDH fue acoplada a FITC (Sigma Aldrich) y WCMtb a FITC o Rodamina (5(6) - Éster carboxitetrametilrodamina N-succinimidílico, Sigma Aldrich). Ambas bacterias inactivadas resuspendidas en PBS se centrifugaron a 10000 g durante 4 minutos y se descartó el sobrenadante.

Se resuspendieron en buffer NaHCO₃ 0,1M pH = 9 con 1 mg/mL de la solución FITC - dimetilsulfóxido (DMSO) o solución de Rodamina a 5 mg/ml. Se dejaron en agitación por 2 h a 37 °C en oscuridad. Finalmente, el exceso de colorantes fue eliminado mediante lavados con PBS 1X y las bacterias se resuspendieron en PBS 1X.

Individuos participantes

Para estudiar la respuesta de los macrófagos frente a *M. tuberculosis* se utilizaron muestras de sangre periférica de 5 dadores sanos adultos del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires. Luego de recibir el consentimiento informado, se tomaron las muestras.

La investigación se llevó a cabo de acuerdo con la Declaración de Helsinki (2013) promulgada por la Asociación Médica Mundial y se encuentra aprobada por el Comité de Ética de la UNNOBA (COENOB). La presencia de patologías previas, comorbilidades u hospitalizaciones recientes se consideraron criterios de exclusión.

Obtención y cultivo de macrófagos derivados de monocitos

A partir de la sangre periférica heparinizada, las células mononucleares se obtuvieron mediante gradiente de Ficoll-Hypaque (Cytiva). Los monocitos se purificaron por selección magnética (micro-perlas CD14, Miltenyi) a partir de las células mononucleares aisladas previamente según instrucciones del fabricante (**Fig. 6**). Los monocitos purificados se cultivaron a una densidad de $0,5 \times 10^6$ células/mL. Los macrófagos derivados de monocitos se obtuvieron luego de la adherencia de los monocitos por 2 h en medio RPMI (Serendipia LAB) libre de suero bovino fetal (SBF), y posterior incubación de las células adherentes en medio RPMI completo (RPMI, penicilina/estreptomicina 1% (Gibco), glutamina 1% (Sigma-Aldrich) y SBF (Natocor) al 10%) por 16-18 h. Las células no adherentes se removieron mediante lavados con PBS 1X (**Fig. 6**).

Los macrófagos fueron estimulados con *C. difficile* inactivada por calor (CDH) en una relación macrófagos:bacteria 1:1, durante 1, 2, 5 o 7 días. Luego de esta pre-sensibilización, se estimularon *in vitro* por 1 o 24 h con *M. tuberculosis* inactivada por rayos gamma (WCMtb) en una relación macrófagos:bacteria 5:1. Antes de adicionar WCMtb, se realizó o no un recambio del medio de cultivo para indagar si la presencia extracelular de *C. difficile* influye en la endocitosis de *M. tuberculosis* (Fig. 6).

Todos los experimentos se llevaron a cabo en una incubadora a 37 °C y en una atmósfera con 5% de CO₂. Los controles experimentales incluyeron macrófagos sin pre-sensibilización con CDH.

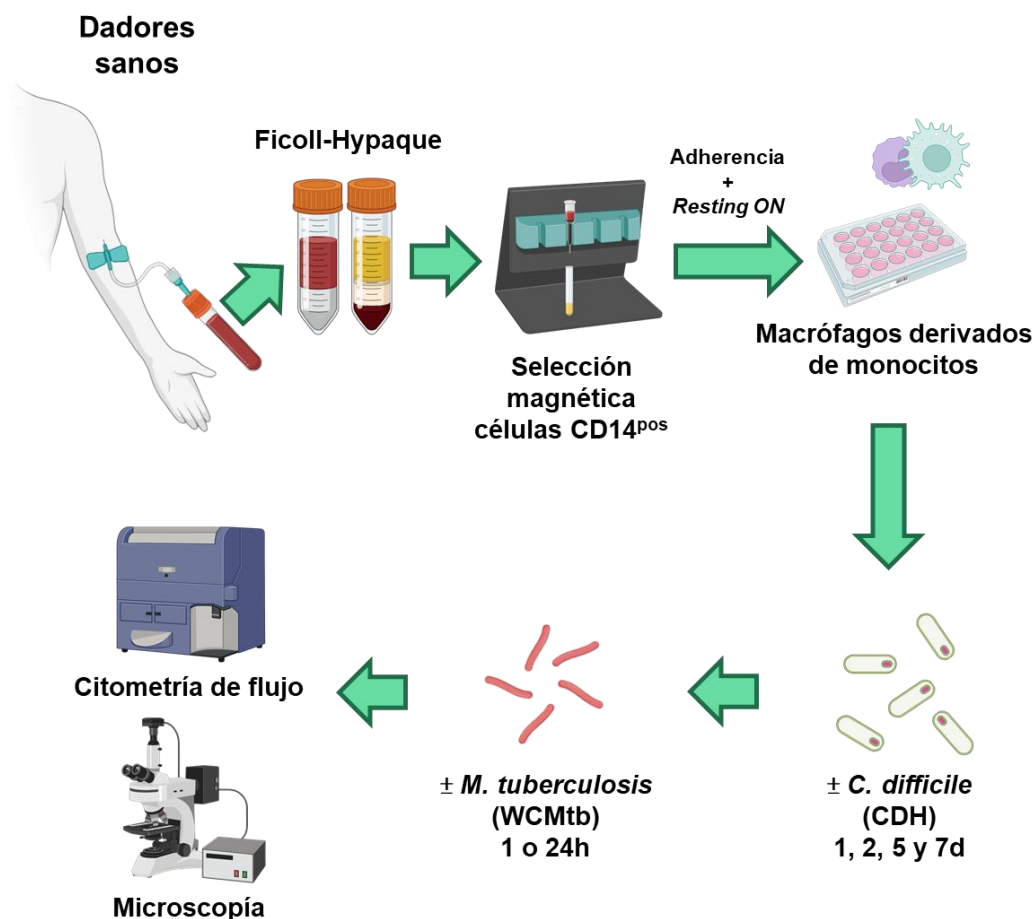


Figura 6. Modelo *in vitro*. Los macrófagos derivados de monocitos de dadores sanos fueron obtenidos por Ficoll-Hypaque y posterior separación por microperlas magnéticas conjugadas a anticuerpos anti-CD14. Se los adhirió y se los dejó en reposo por 16-18 h, antes de estimularlos o no con CDH durante 1, 2, 5 y 7 días, para luego enfrentarlas a un estímulo de WCMtb durante 1 o 24 h. Los análisis se llevaron a cabo mediante citometría de flujo y microscopía de fluorescencia.

Citometría de Flujo

Para todas las marcaciones se empleó el colorante de viabilidad/muerte celular Fixable Viability Dye eFluor™ 780 (eBioscience™) con el fin de excluir las células no viables de los análisis. Brevemente, una vez finalizado el tiempo de estímulo, se retiró el medio de cultivo, las células se lavaron con *buffer* FACS frío (PBS 1X, SBF 2%) y se adicionó el Fixable Viability Dye eFluor™ 780 directamente en la placa de cultivo durante 15 minutos en frío y oscuridad.

Posteriormente, los macrófagos se colectaron mediante lavados con *buffer* FACS. Las células se centrifugaron a 2000 rpm por 5 minutos a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se realizó la marcación con anticuerpo anti SLAMF1 PE (Biolegend) durante 30 minutos en frío y oscuridad. Las células se lavaron y se re-suspendieron en PFA 1% para su fijación y posterior análisis en citómetro de flujo FACSCanto II (BD).

Se evaluó además el porcentaje y la intensidad media de fluorescencia de células endocíticas para WCMtb (FITC positivas). Todos los análisis se realizaron en el software FlowJo™ v10 (BD Life Sciences).

Microscopía de fluorescencia

Para evaluar la endocitosis de *M. tuberculosis*, así como de *C. difficile*, mediada por los macrófagos se realizaron inmunomarcaciones de fluorescencia (IF). Asimismo, se realizaron IF para identificar la expresión y co-localización de SLAMF1 con *C. difficile* y *M. tuberculosis* en los macrófagos.

Las células se fijaron con PFA 4% por 20 minutos a temperatura ambiente. Se lavó con solución fisiológica (SF) y se permeabilizó durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente con *buffer* de Permeabilización (BP; PBS 1X, SBF 10%, saponina 0,05%). Transcurrida la media hora, se lavó con BP frío, se incubó con el anticuerpo primario específico (anti-CD14 o anti-SLAMF1) durante 30 minutos a temperatura ambiente.

A continuación, se lavó nuevamente con BP frío y se incubó con el anticuerpo secundario conjugado a AlexaFluor 647 durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron dos lavados con BP, y se contra-tiñó con DAPI durante 5 minutos. Para el montaje se utilizó PolyMount (Polysciences). Las IF se evaluaron con microscopio de fluorescencia trinocular Axio Imager.A2 (Carl Zeiss, Alemania).

Cuantificación de las inmunomarcaciones

La cuantificación de las IF se realizó mediante el software QuPath versión 0.4.4, tomando 5 campos aleatorios por condición experimental (**Fig. 7**). Se utilizó la herramienta *Cell detection* para la detección de células mediante la identificación del núcleo marcado con DAPI. Seguidamente, se utilizó la herramienta *Create single measurement classifier* para la detección de células CDH FITC positivas, WCMtb Rodamina positivas o SLAMF1 A647 positivas. Por último, se utilizó la función *Train pixel classifier* para la medición de intensidad de fluorescencia por célula. Los valores calculados para cada imagen se exportaron, se calculó la mediana de cada condición y se aplicaron los test estadísticos correspondientes.

Análisis estadístico

Se utilizaron el test de Mann-Whitney y el test de Wilcoxon para muestras no pareadas o pareadas respectivamente. Se utilizó el test de Kruskal-Wallis (ANOVA no paramétrico de muestras no pareadas), el test de Friedman (ANOVA no paramétrico de muestras pareadas) y el post test de Dunns. Los datos se analizaron con el software GraphPad Prism 8.0.1 y los valores de $p < 0,05$ se consideraron significativos.

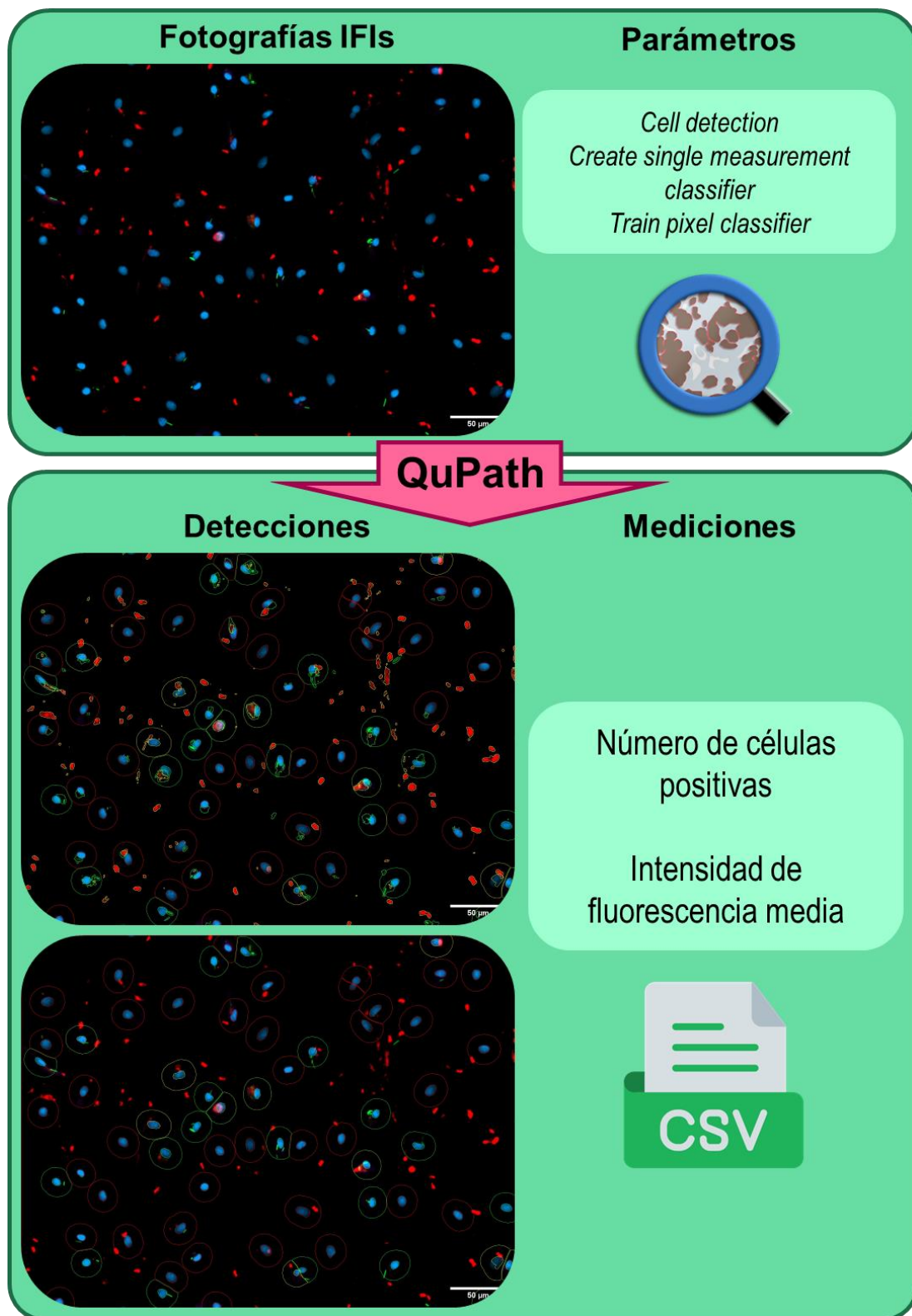


Figura 7. Flujo de trabajo seguido durante la cuantificación de las IF mediante QuPath. Micrografías de 5 campos en aumento 20X de cada condición fueron capturadas. Se detectó el número de células mediante la identificación del núcleo por DAPI, para luego estimar el número de células que internalizaron CDH y/o WCMtb; así como también, la intensidad de fluorescencia de los fluoróforos utilizados. Los datos obtenidos en un archivo de extensión .csv se analizaron estadísticamente en GraphPad.

Objetivo 3. Evaluar el impacto de la disbiosis intestinal y de la CDI a nivel tisular en un modelo murino

Animales de estudio

Se emplearon ratones machos y hembras de la cepa endocriada C57BL/6 de 6-8 semanas de vida, de calidad SPF y criados en el bioterio del Centro de Investigaciones Básicas y Aplicadas (CIBA), Centro de investigaciones y transferencia del noroeste de la provincia de Buenos Aires (CITNOBA), en condiciones de luz, temperatura y humedad adecuadas (**Tabla 5**). Todos los protocolos experimentales aplicados han sido aprobados previamente por el comité de ética de la UNNOBA (COENOB, expediente N° 0667/22).

Ciclo luz / oscuridad	Temperatura	Humedad ambiente relativa	Extracción de aire	Tipo de cama	Cambio de cama
12 h de luz/oscuridad	18 – 22 °C	45 – 65 %	Ventilación permanente	Viruta autoclavada	Cada 7 días

Tabla 5. Resumen de las condiciones de mantenimiento de los ratones.

Se incluyeron tres grupos de animales: ratones control (no recibieron ningún tratamiento), ratones con disbiosis intestinal y ratones con disbiosis infectados con *C. difficile* (**Fig. 8**). El sacrificio se realizó por dislocación cervical a los 2, 5 u 8 días post disbiosis/infección.

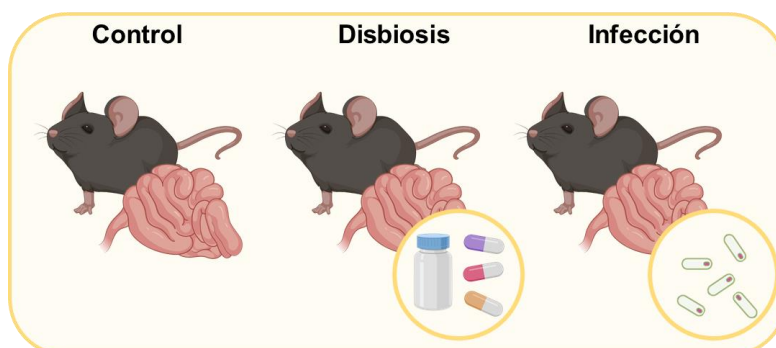


Figura 8. Grupos experimentales utilizados en el modelo murino.

Modelo murino de CDI

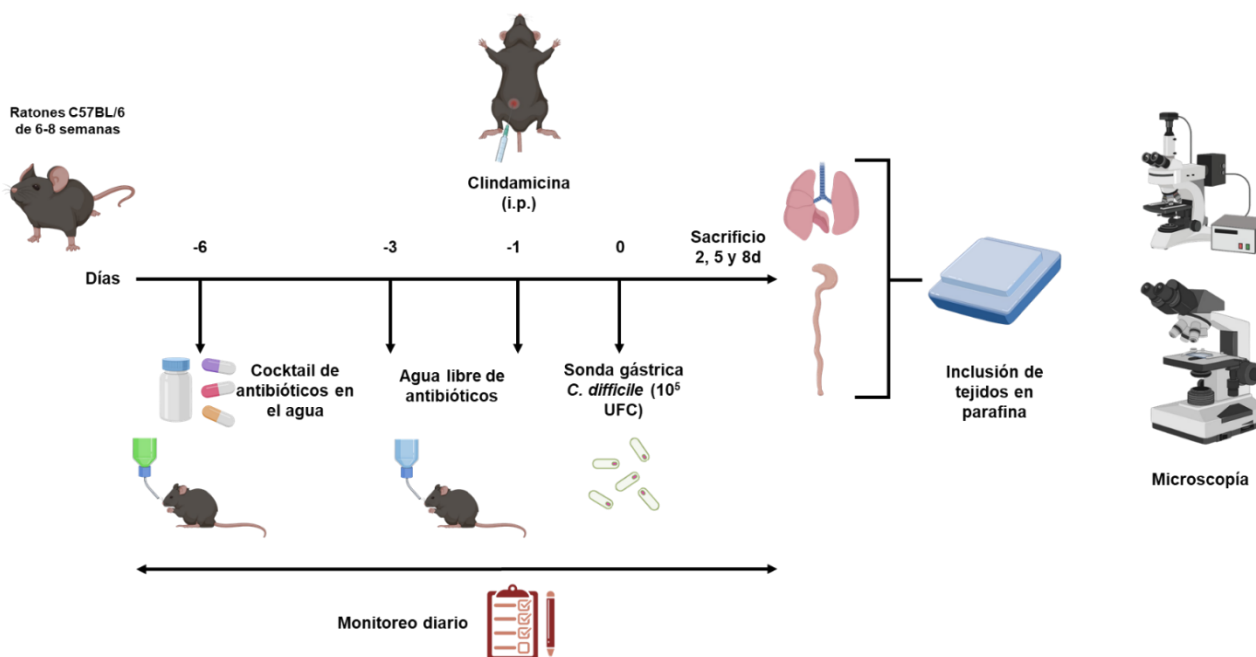


Figura 9. Inducción de infección primaria de *C. difficile*. Esquema experimental del modelo de CDI inicial. Luego del tratamiento con antibióticos, los ratones son desafiados con 10^5 UFC de la cepa NAP1/BI/027 de *C. difficile*. Finalizado el esquema experimental se procede a la extracción de órganos para la evaluación histológica y el score clínico.

Para generar la disbiosis de la microbiota intestinal, se administró un cocktail de antibióticos constituido por Gentamicina (50 mg/ml), Metronidazol (5 mg/ml), Colistina (25 mg/ml) y Vancomicina (50 mg/ml) en la botella de agua de consumo por 3 días. Luego, se cambió el contenido de la botella por agua libre de antibióticos por 2 días.

Seguidamente, se inyectó Clindamicina (10 mg/kg) vía intraperitoneal (i.p) 1 día previo a la inoculación por sonda gástrica de 10^5 Unidades Formadoras de Colonias (UFCs) de *C. difficile* de la cepa NAP1/BI/027 o PBS (para los ratones del grupo disbiosis) (**Fig. 9**), modelo ampliamente utilizado para el estudio de la infección por *C. difficile*¹³⁶. Se monitorearon a los ratones diariamente detectando los síntomas de enfermedad característicos: diarrea, postura encorvada, cola húmeda y pérdida de peso.

Obtención de esporas de *C. difficile*

Las esporas de *C. difficile* para inocular a los ratones se obtuvieron mediante cultivo en medio Clospore¹³⁷. Se realizó el recuento de UFCs en medio BHI-agar suplementado con taurocolato 10% m/v, como ha sido descrito previamente¹³⁷. Las esporas se almacenaron en glicerol a – 80 °C hasta su utilización en los ensayos *in vivo*.

Score histopatológico

Se analizó la severidad clínica causada por la disbiosis intestinal y el establecimiento de *C. difficile* según el score histopatológico. Tejidos de colon y ciego (secciones de 1 cm aproximadamente) fueron fijados en una solución de formaldehído al 4% por 24 h y luego incluidos en parafina. Se realizaron cortes de los tejidos en secciones de 6 µm con micrótopo y finalmente se tiñeron con hematoxilina-eosina (H&E) para el análisis histológico. Se utilizaron los siguientes parámetros: (1) acumulación de células inflamatorias, (2) migración de neutrófilos e infiltración del tejido, (3) congestión hemorrágica, (4) edema de la mucosa y (5) daño celular en epitelio. De acuerdo a la severidad se asignaron valores en el rango de 0-3 (0: sin daño, 1: leve, 2: moderado, 3: severo) para cada uno de los parámetros, como ha sido reportado previamente¹³⁸. Se tomaron fotos de 5 campos aleatorios de cada animal y condición experimental (Microscopio de campo claro Leica DM750).

Características histológicas de pulmón

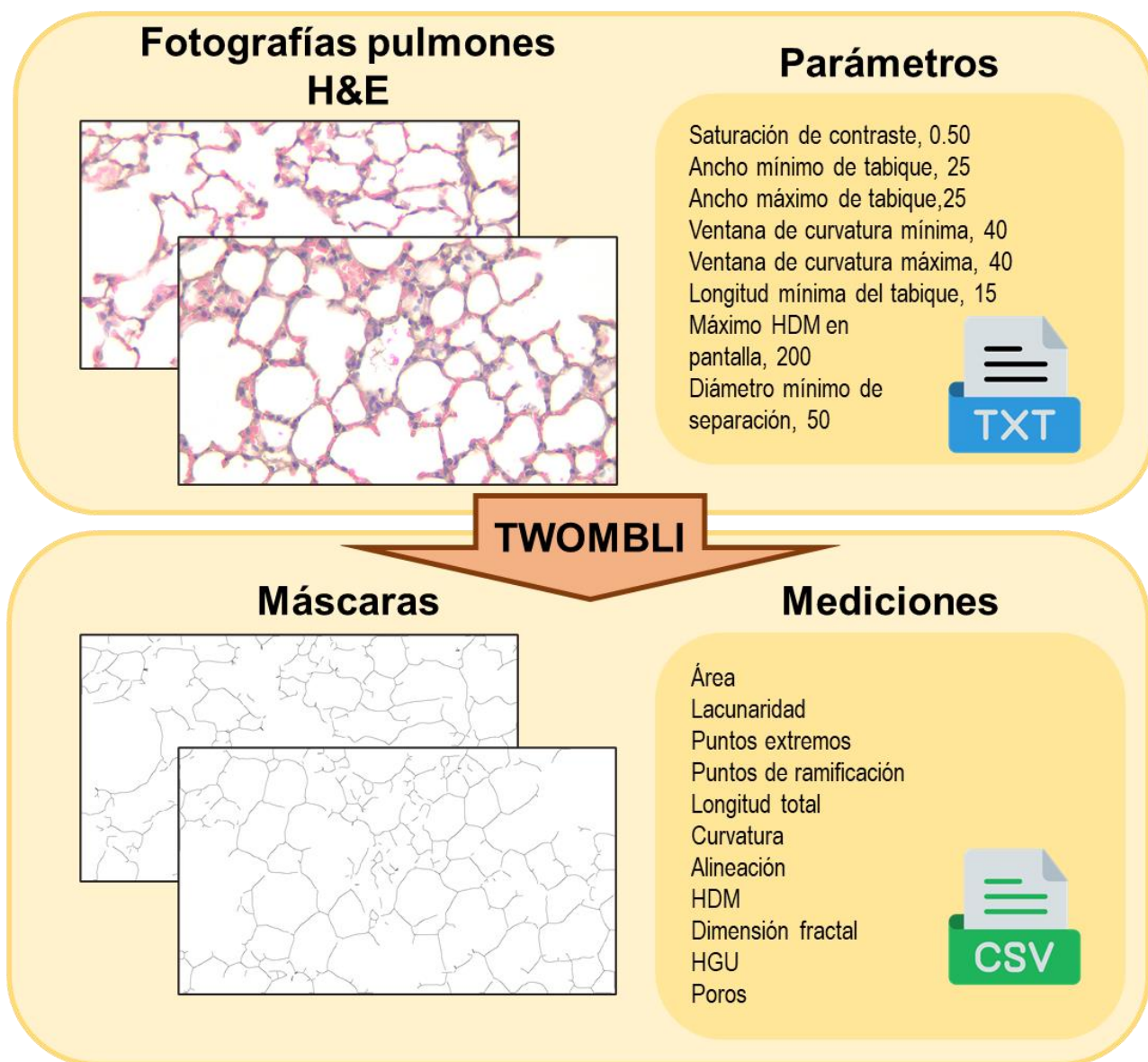
Luego del sacrificio de los animales, se infundieron los pulmones de los ratones con formalina al 10% a través de la tráquea como ya ha sido descrito¹³⁹ y se fijaron en formalina durante 16-18 h. Posteriormente se incluyeron en parafina.

Se tiñeron secciones de 6 µm con hematoxilina y eosina (H&E) y se analizó el infiltrado inflamatorio en el espacio alveolar, presencia de micro-trombos y micro-abscesos, enfisema e integridad epitelial. Se tomaron fotos de 5 campos aleatorios de cada animal y condición experimental (Microscopio de campo claro Leica DM750).

Se empleó el macro “TWOMBLI”¹⁴⁰ en el programa ImageJ para la cuantificación de patrones del tejido. Para ello, se siguió el flujo de trabajo expuesto en la **Fig. 10**. Las métricas analizadas fueron las siguientes: área que ocupan los tabiques alveolares en la imagen, número de puntos extremos en los tabiques alveolares, número de puntos de ramificación en los tabiques alveolares, longitud total de los tabiques alveolares, curvatura de los tabiques alveolares, alineación (refleja hasta qué punto los tabiques alveolares están orientados en la misma dirección), proporción de matriz de alta densidad (HDM) (medida de la proporción de píxeles de una imagen que corresponden a los tabiques alveolares), dimensión fractal de los tabiques alveolares (medida de la auto-similitud y complejidad del tejido), unidad de crecimiento hifal (HGU) (una medida del número de puntos extremos por unidad de longitud), poros entre los tabiques alveolares y lacunaridad (una medida del número y tamaño de los huecos y de cómo los tabiques alveolares rellenan el espacio).

Tinción con Hematoxilina y Eosina (H&E)

Para la tinción de H&E, las secciones de 6 µm se desparafinizaron y deshidrataron con xileno dos veces durante 10 minutos cada una. Seguidamente se incubaron en concentraciones decrecientes de etanol (100%, 96%, 90% y 70%) durante 10 minutos cada una. A continuación, se incubó en agua destilada durante 5 minutos, y se continuó con una incubación con hematoxilina durante 5 minutos. Transcurrido el tiempo, se dejó el corte de tejido 15 minutos en agua común, y se realizaron dos lavados de 5 minutos con agua destilada, para posteriormente realizar la tinción con eosina 0,1% por 2 minutos. Por último, se deshidrató el corte nuevamente con etanol 96% por 5 minutos y se realizaron dos incubaciones en xileno durante 10 minutos. Al finalizar, se montó en medio montaje DPX.



Fotografías pulmones H&E

Máscaras

Combinación

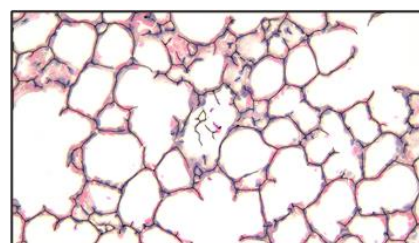
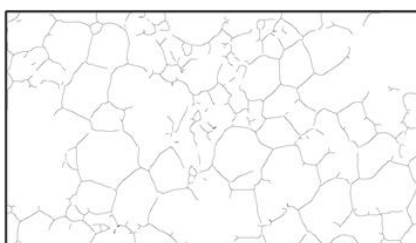
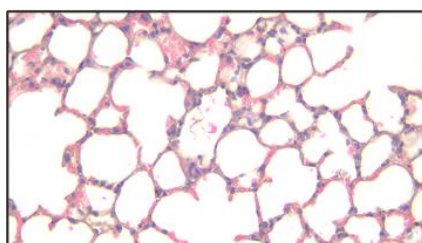


Figura 10. Flujo de trabajo del macro de ImageJ “TWOMBLI” utilizado para el análisis de la estructura histológica pulmonar. Luego de la definición de los parámetros y la carga de imágenes, el macro “TWOMBLI” genera una serie de máscaras a partir de las cuales se estiman las variables mencionadas. Los datos obtenidos en un archivo de extensión .csv se analizaron estadísticamente en GraphPad.

Análisis estadístico

Se utilizaron el test de Mann-Whitney y el test de Wilcoxon para muestras no pareadas o pareadas, respectivamente. Se utilizó el test de Kruskal-Wallis (ANOVA no paramétrico de muestras no pareadas), el test de Friedman (ANOVA no paramétrico de muestras pareadas) y el post test de Dunns. Los datos se analizaron con el software GraphPad Prism 8.0.1 y los valores de $p < 0.05$ se consideraron significativos.

RESULTADOS

Epidemiología de la CDI en el NOBA

Como se ha mencionado, en Argentina los estudios y reportes sobre la CDI, además de escasos, son heterogéneos. Es de interés destacar que los datos recabados solo atienden a hospitales de Gran Buenos Aires, siendo hasta el momento inexistentes los estudios que abarquen otras regiones del país, y menos aún a la Región Sanitaria III de la provincia de Buenos Aires. Más aun, desde 2019, la CDI ha sido declarada una amenaza urgente por el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC). En conjunto, esto pone de manifiesto la necesidad imperiosa de conocer acerca de la prevalencia de esta infección.

En este trabajo realizamos la primera caracterización clínico demográfica de pacientes bajo sospecha de CDI en el Noroeste de la Provincia de Buenos Aires (NOBA), a partir de la aplicación de un algoritmo diagnóstico puesto a punto en nuestro laboratorio (siguiendo las recomendaciones de IDSA ¹³⁵) y de la recopilación de historias clínicas de los pacientes. Mediante el análisis retrospectivo de 249 muestras de materia fecal provenientes de diferentes centros de salud de la ciudad de Junín (que nuclean la Región Sanitaria III), determinamos que aproximadamente uno de cada cinco pacientes (21,29%) que presentaban diarrea portaban a *C. difficile* como agente causal (**Fig. 1 a**).

Al evaluar la población CDI positiva, se evidenció que más del 80% de los pacientes estaban infectados con cepas de carácter toxigénico; indicado por la presencia de la Toxina B (**Fig. 1 b**). Por otra parte, es importante denotar que la mayoría de las infecciones por *C. difficile* se dieron en el ámbito comunitario (**Fig. 1 b**).

Al realizar un análisis de los casos de forma anual, la frecuencia de la CDI en el NOBA osciló alrededor del 20% desde 2019 a 2023 (**Fig. 1 c**). Curiosamente, en el año 2020 se registró la mayor incidencia de CDI en nuestra cohorte de estudio (**Fig. 1 c**).

En relación a esto, desde el inicio de la pandemia por COVID-19, se estima que aproximadamente el 72% de los pacientes fueron tratados preventivamente con antibióticos de amplio espectro para evitar coinfecciones bacterianas; lo que podría estar asociado al aumento en la detección de los casos de CDI en el año 2020.

a)

	POSITIVA	NEGATIVA	DISCORDANTE	TOTAL
Toxigénica	43	191	5	
No toxigénica	10			249
Frecuencia	0,2129	0,7671	0,0201	
Porcentaje	21,29	76,71	2,01	

b)

CDI POSITIVA			
		FRECUENCIA	PORCENTAJE
Toxigenicidad (TcdB+)	Toxigénica	0,8113	81,13
	No toxigénica	0,1887	18,87
Procedencia	Domicilio	0,6571	65,71
	Geriátrico	0,1429	14,29
	Otra institución de salud	0,2000	20,00
Clasificación de diarrea	Moderada	1	100,00
	Severa	0	0,00

c)

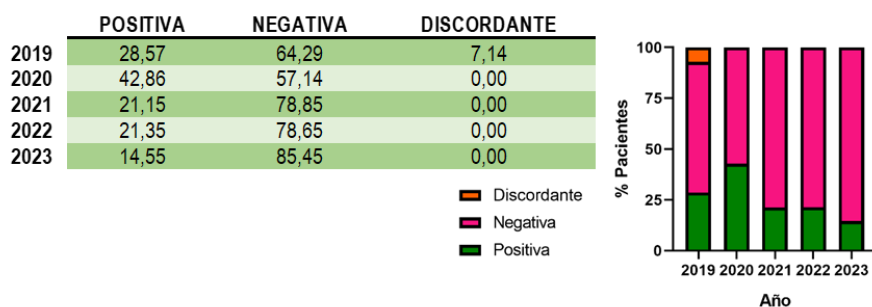


Figura 1. Frecuencia de la CDI en el NOBA. a) Se evaluaron 249 muestras de materia fecal mediante el algoritmo diagnóstico. **b)** Se determinó la toxigenicidad (presencia de Toxina B) del total de casos positivos, la procedencia de los pacientes CDI+ al momento del diagnóstico, y la clasificación de la severidad de la diarrea. **c)** Desglose del porcentaje de CDI por años incluidos en la cohorte de estudio.

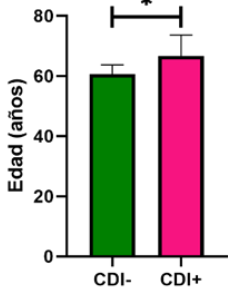
Factores de riesgo y parámetros sanguíneos en los pacientes del NOBA

A partir de la clasificación de los pacientes como CDI+ y CDI-, determinamos los factores de riesgo que podrían estar implicados en la incidencia de la CDI. Como se observa en la **Fig. 2 a**, hallamos diferencias significativas en la edad de los pacientes CDI+ y los CDI-, presentando la población CDI+ una mayor edad promedio (CDI+: media = 72 años vs. CDI-: media = 65 años). El punto de corte a partir del cual la edad avanzada se considera un factor de riesgo en nuestra cohorte fue de 67 años (**Fig. 2 b**). En cuanto al sexo biológico no se encontraron diferencias (**Fig. 2 c**) respecto a la proporción de masculinos y femeninas entre ambas poblaciones de pacientes.

El consumo previo de antibióticos en los 3 meses previos al diagnóstico de CDI, así como haber cursado una hospitalización de manera previa, podrían considerarse como factores de riesgo para esta infección (**Fig. 2 d y g**). Por su parte, el haberse infectado con anterioridad con *C. difficile* parecería ser una condición que predispone a la población del NOBA a contraer nuevamente la enfermedad (**Fig. 2 h**). Por otro lado, el consumo de inhibidores de la bomba de protones previo al diagnóstico y la presencia de comorbilidades no mostraron diferencias significativas entre pacientes CDI- y CDI+ (**Fig. 2 e-f**). La **Fig. 2 i** muestra un desglose de las comorbilidades reportadas en los pacientes bajo estudio. Si bien se analizaron de manera individual, no se hallaron variaciones sustanciales entre la población CDI+ y CDI- para ninguna de ellas. La **Fig. 2 j** muestra un desglose de los antibióticos consumidos por los pacientes CDI+ agrupados por familias. Observamos que el 56,52% de los pacientes con CDI habían consumido alguna clase de penicilina con anterioridad al diagnóstico.

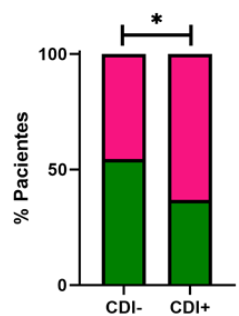
a)

	CDI-	CDI+
Media (años)	65	72



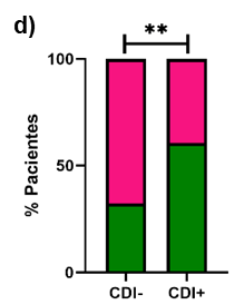
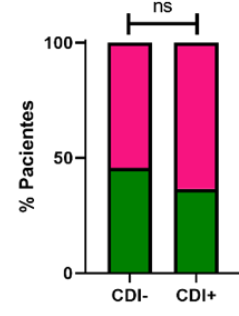
b)

	<67 años	>67 años
CDI-	60,93	39,07
CDI+	43,24	56,76

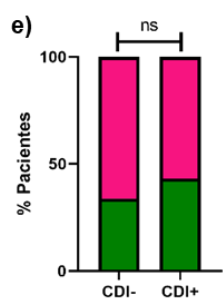


c)

	Masculino	Femenino
CDI-	45,70	54,30
CDI+	36,59	63,41



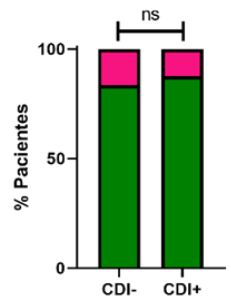
	ATB previo	No ATB previo
CDI-	32,39	67,61
CDI+	60,53	39,47



	PPI previo	PPI previo
CDI-	33,80	66,20
CDI+	43,24	56,76

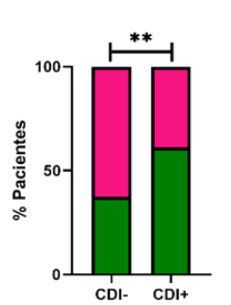
f)

	Con comorbilidad previa	Sin comorbilidad previa
CDI-	83,45	16,55
CDI+	87,5	12,5



g)

	Con hospitalización previa	Sin hospitalización previa
CDI-	37,41	62,59
CDI+	61,11	38,89



h)

	Con CDI previa	Sin CDI previa
CDI-	2,22	97,78
CDI+	11,11	88,89

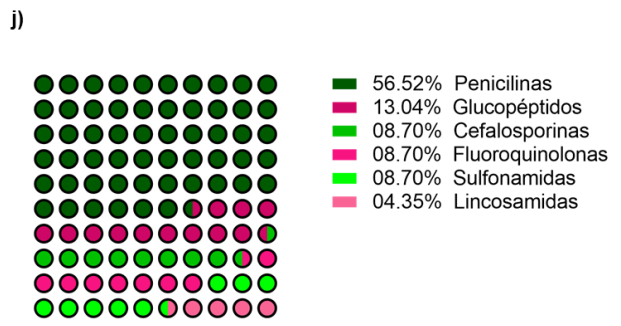
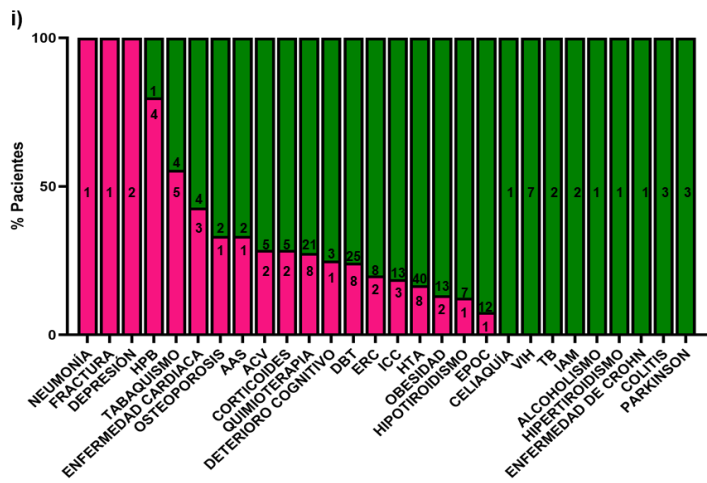
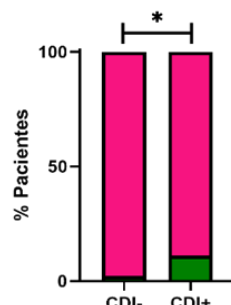


Figura 2. Evaluación de los factores de riesgo asociados con la CDI. a) Edad, b) Edad de corte que determina la edad como factor de riesgo (67 años), c) Sexo biológico, d) Consumo previo de antibióticos (ATB), e) Consumo previo de inhibidores de la bomba de protones (PPI), f) la presencia de comorbilidades previas, g) Hospitalización previa, h) Infección previa por CDI, i) Desglose de comorbilidades previas presentes en los pacientes. j) Desglose de familias de antibióticos consumidos por los pacientes CDI+. Las barras representan la media \pm SEM.

Test exacto de Fisher. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Además, analizamos los valores de hemogramas de los pacientes provistos por el personal de salud al día de la toma de muestra de materia fecal y detección de *C. difficile*. En lo que concierne a los recuentos celulares sanguíneos, observamos un aumento significativo de leucocitos (**Fig. 3 a**) y plaquetas (**Fig. 3 j**) en los pacientes infectados por *C. difficile*, mientras que se aprecia una disminución significativa en el recuento de basófilos (**Fig. 3 i**). Por su parte, el recuento de eosinófilos no parece estar afectado por la presencia de la CDI (**Fig. 3 h**). Al analizar el recuento de linfocitos, monocitos y neutrófilos individualmente entre ambas poblaciones de pacientes, aunque se evidencia un aumento, no encontramos diferencias significativas (**Fig. 3 b-d**). Sin embargo, es importante notar que los pacientes CDI+ presentaron al menos dos de estas poblaciones leucocitarias significativamente aumentadas con respecto a los CDI- (**Fig. 3 e-g**) al momento del diagnóstico.

Con respecto al resto de los parámetros sanguíneos evaluados, se destaca el aumento de la concentración de urea (**Fig. 3 k**) en los pacientes infectados con *C. difficile*; mientras que no se evidenciaron diferencias en la concentración de creatinina y de albumina séricas (**Fig. 3 l-m**).

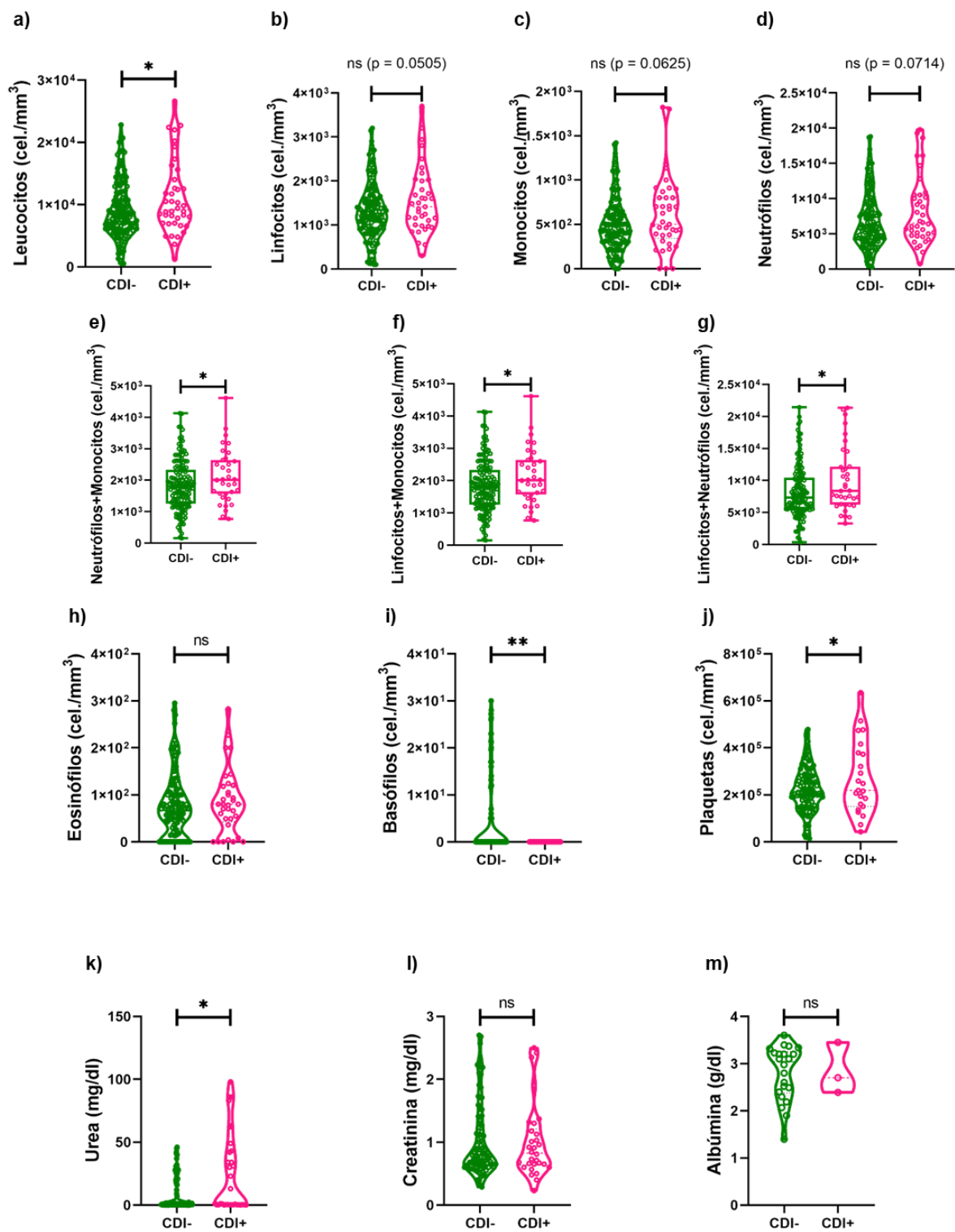


Figura 3. Parámetros sanguíneos en pacientes CDI+ y CDI-. Recuentos de **a)** leucocitos **b)** linfocitos, **c)** monocitos y **d)** neutrófilos, **e)** neutrófilos + monocitos, **f)** linfocitos + monocitos, **g)** linfocitos + neutrófilos, **h)** eosinófilos, **i)** basófilos, **j)** plaquetas. Concentraciones séricas de **k)** urea, **l)** creatinina y **m)** albúmina.

Test de Mann-Whitney. * p < 0,05, ** p < 0,01.

En lo que concierne a las variables referidas a la evolución de los pacientes durante su ingreso en los centros de salud (Antibióticos durante la internación, Lugar de internación, Necesidad de UTI, Procedencia, Clasificación de diarrea, Shock, Óbito), no se encontraron diferencias relevantes (no mostrado).

En conjunto, hemos podido definir factores de riesgo asociados a la CDI en nuestra población de estudio. Más aun, hemos encontrado modulaciones en distintas variables evaluadas en hemogramas que podrían contribuir a un diagnóstico y seguimiento más eficientes de los pacientes.

Meta-análisis

Un meta-análisis es un método estadístico que combina los resultados de múltiples estudios independientes sobre un tema específico para obtener estimaciones más precisas y generalizables. Esta metodología puede proporcionar una síntesis cuantitativa de la evidencia disponible, colaborando con la obtención de conclusiones más robustas y fiables sobre la relación entre ciertos factores y la incidencia de enfermedades infecciosas, como es la CDI.

En este sentido, definimos criterios de selección (mencionado en la sección de Materiales y Métodos) y realizamos una revisión sistemática que nos permitió seleccionar 40 trabajos independientes del tipo caso/control. En la **Fig. 4**, se muestran en color verde los países donde se llevaron a cabo los estudios seleccionados, los cuales incluyen Argentina ²⁴, Brasil ¹⁴¹, Canadá ¹⁴², China ^{143–147}, Colombia ^{148,149}, Corea del Sur ¹⁵⁰, Dinamarca ¹⁵¹, Estados Unidos ^{152–158}, Francia ¹⁵⁹, Hungría ¹⁶⁰, India ^{161,162}, Islandia ¹⁶³, Japón ¹⁶⁴, México ¹⁶⁵, Polonia ¹⁶⁶, Sudáfrica ^{108,167}, Tailandia ¹⁶⁸, Taiwán ^{169,170}, Turquía ¹⁷¹ y Reino Unido ^{172–176}.

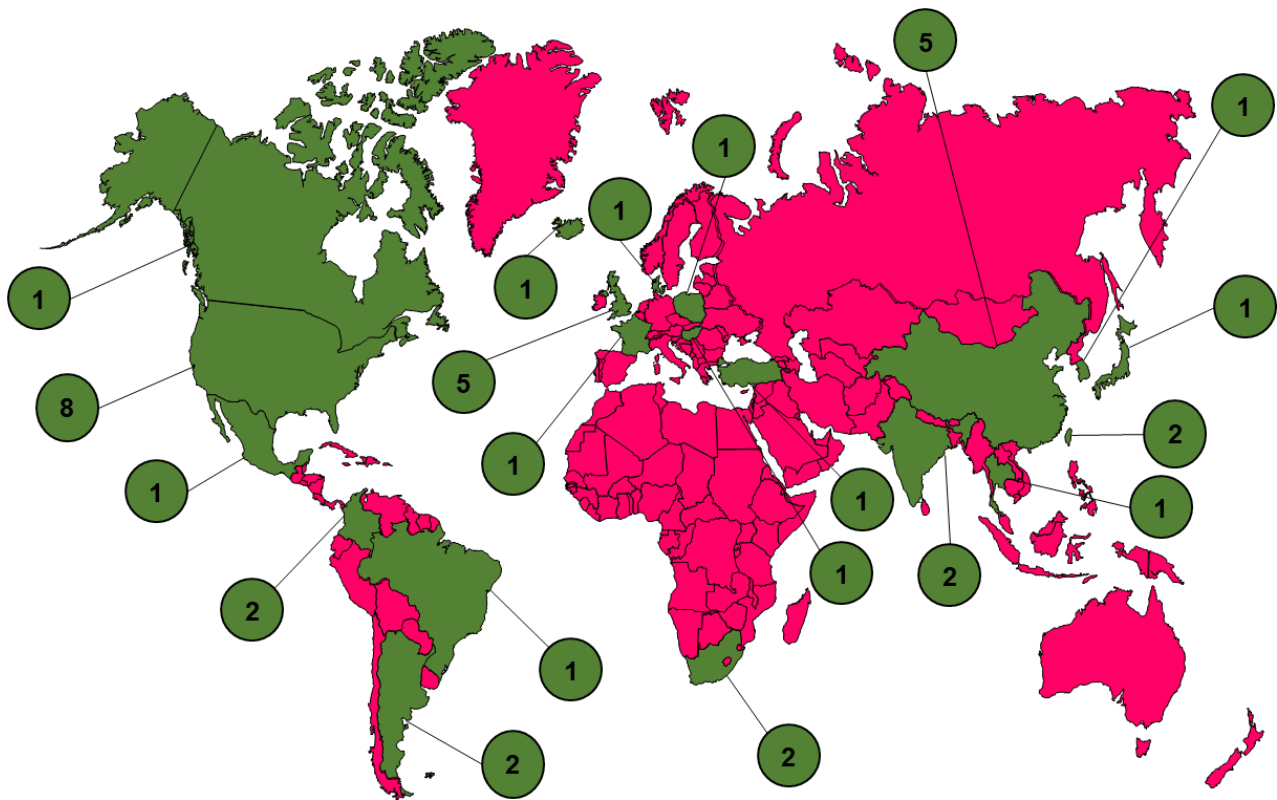


Figura 4. Distribución geográfica de los estudios incluidos en el meta-análisis. En verde, países de los cuales provienen los estudios incluidos en el meta-análisis. Se indica el número de estudios incluidos por país.

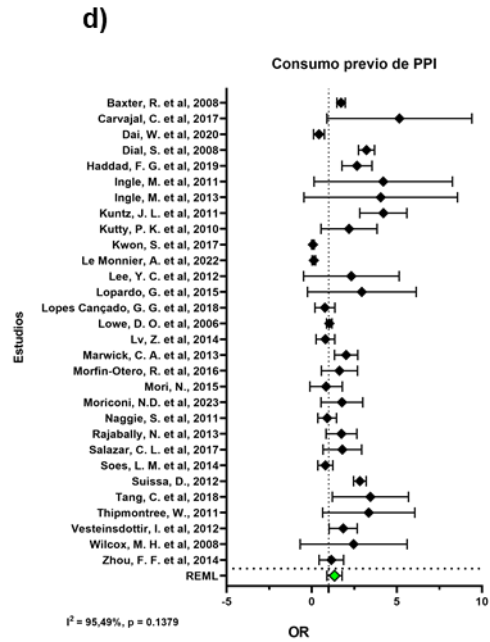
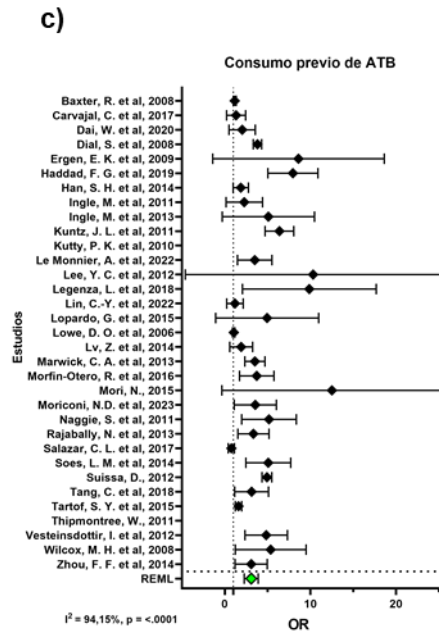
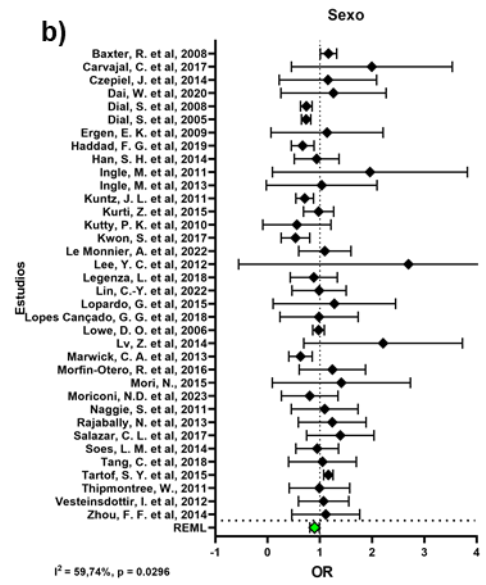
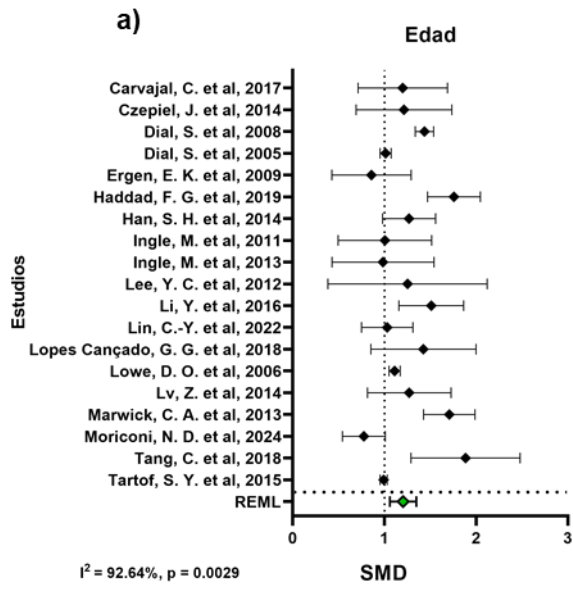
La **Fig. 5** exhibe los “*Forest Plot*” obtenidos para cada uno de los parámetros de interés seleccionados. Estos gráficos representan el efecto individual (*odds ratios* (OR) para variables cualitativas y desviación media standard (SMD) para variables cuantitativas) de cada uno de los estudios seleccionados (rombos negros) y al final, indicado con un rombo verde, el efecto del modelo estadístico obtenido para la variable en función de todos los trabajos seleccionados. La **tabla 6** es un resumen de los efectos para cada una de las variables evaluadas en el meta-análisis. Como ejemplo, el OR obtenido para la variable “Consumo previo de ATB”, indica que un individuo tiene una probabilidad tres veces mayor de infectarse por *C. difficile* si ha consumido previamente antibióticos en contraposición a un individuo que no consumió.

Los parámetros demográficos Edad y Sexo biológico obtuvieron modelos significativos, lo que implica que, a nivel global, la edad avanzada y el sexo biológico femenino se asocian a una mayor incidencia de CDI. El consumo previo de antibióticos y la internación previa resultaron ser los predictores de riesgo de mayor efecto que predisponen a un individuo a contraer la CDI, no así el consumo previo de inhibidores de la bomba de protones y el haber tenido CDI con anterioridad. En este punto, la CDI previa es ampliamente reportada como un factor de riesgo para posteriores casos de CDI y/o recurrencias en los pacientes. Consideramos que el limitado número de estudios que cumplieron con nuestros criterios de inclusión y que contenían esta variable de estudio puede estar sesgando este resultado.

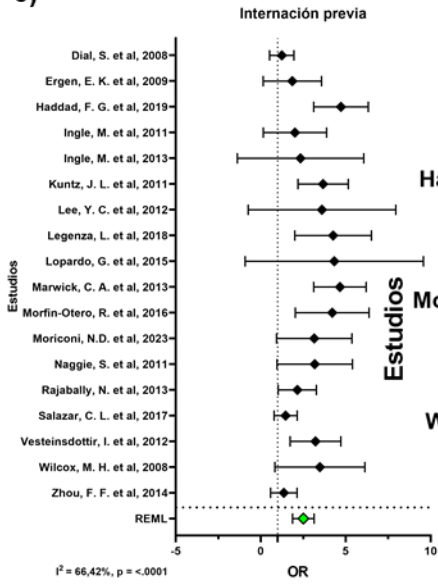
El recuento leucocitario aumentado también constituye un factor de riesgo significativo para la CDI según este análisis comparativo. Si bien el número de plaquetas no muestra un valor estadísticamente significativo, es importante remarcar que sólo 2 estudios aparte del nuestro evalúan este parámetro.

Por último, en el apartado de comorbilidades, tanto las enfermedades cardíacas como la enfermedad renal crónica, exhibieron modelos con efectos significativos. Por ende, pacientes con estas patologías, podrían contraer CDI de manera más probable.

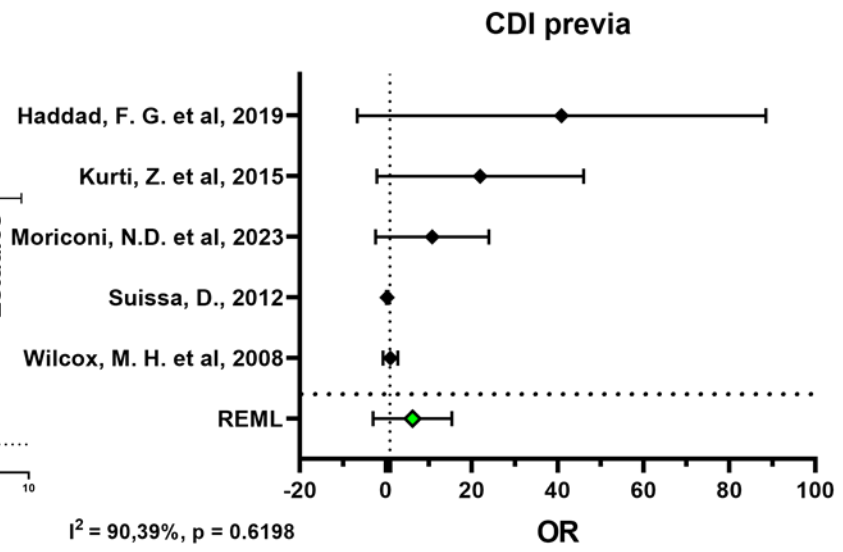
En resumen, este tipo de análisis metodológico nos permitió establecer una comparativa entre nuestros resultados a nivel local y los resultados de estudios previos en diferentes países del mundo en distintos años. Varios de nuestros hallazgos coincidieron con lo reportado en el mundo, a excepción del sexo biológico y el recuento plaquetario.



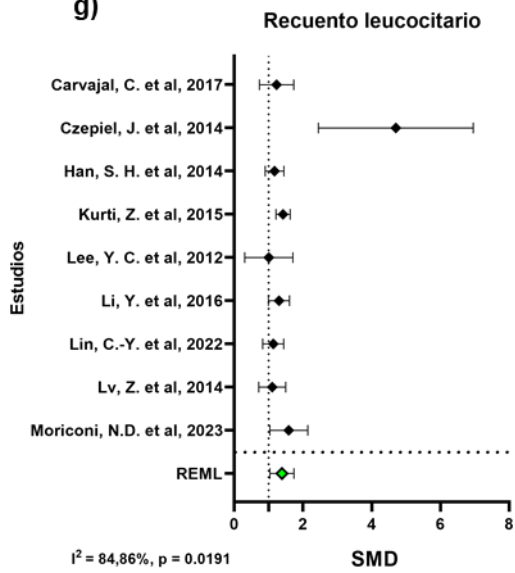
e)



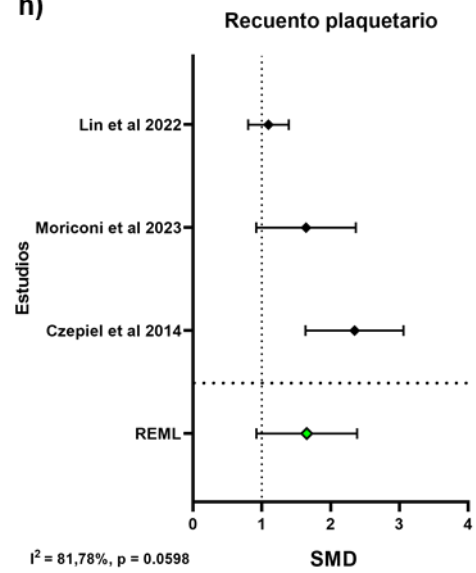
f)



g)



h)



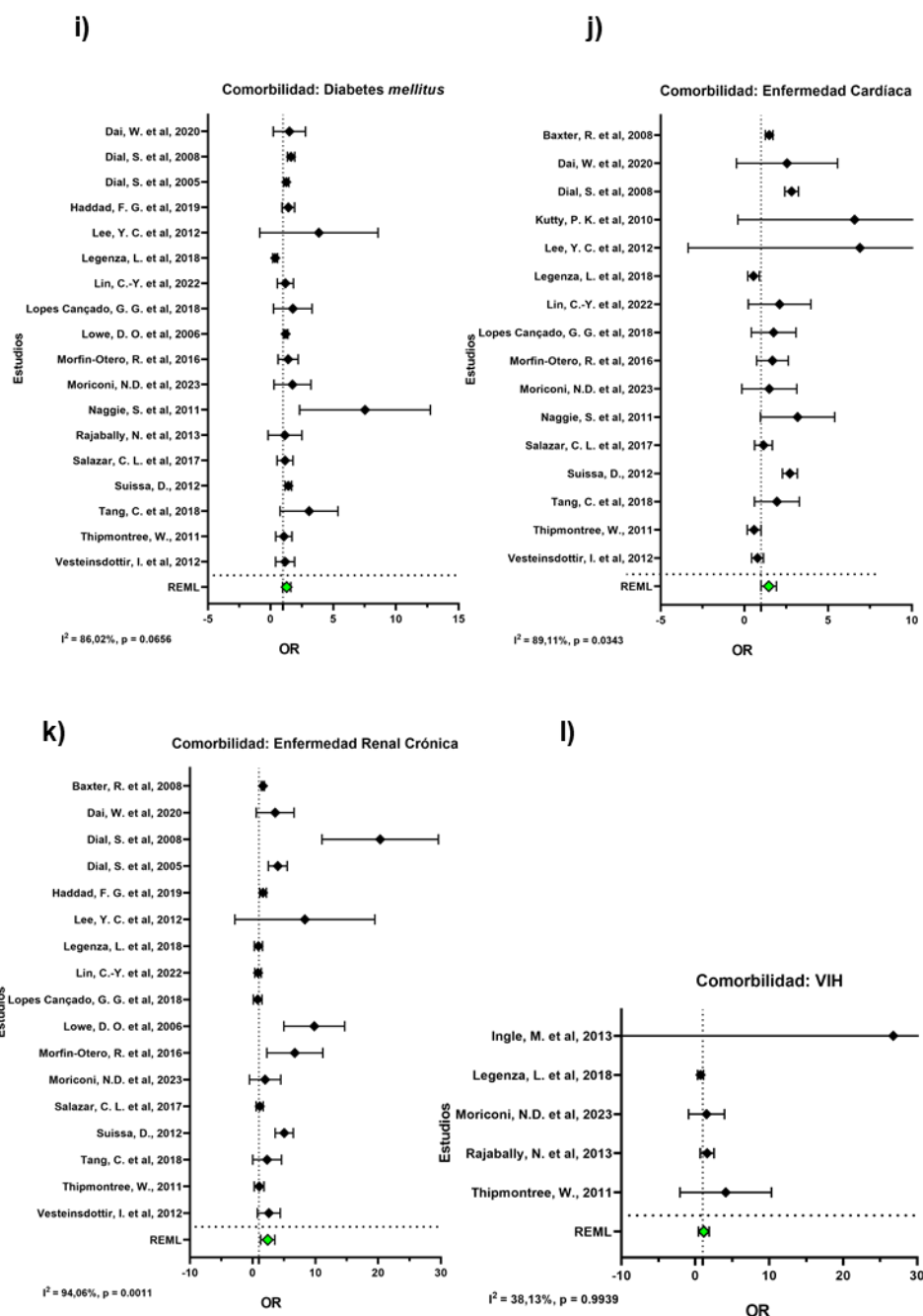


Figura 5. “Forest plots” de cada variable analizada en el meta-análisis. a) Edad, b) Sexo biológico, c) Consumo previo de ATB, d) Consumo previo de PPI, e) Internación previa, f) CDI previa, g) Recuento leucocitario, h) Recuento plaquetario, i) Diabetes *mellitus*, j) Enfermedad cardíaca, k) Enfermedad renal crónica, l) VIH. La variable evaluada se considera significativa si el rombo verde, que equivale a la media del modelo estimado, no cruza la línea de significancia estadística. El valor obtenido del modelo (OR/SMD) se interpreta como el aumento de la probabilidad de adquirir CDI por poseer una de las variables de interés. Los rombos negros representan las medias de cada una de las variables, al mismo tiempo que las barras indican los extremos de confianza inferior y superior respectivamente. REML (*Restricted Maximun Likelihood*). Valores de OR/SMD \pm IC inferiores o superiores a 1 se consideraron significativos. Nuestro estudio se menciona como *Moriconi, N.D. et al, 2023*.

PREDICTOR DE RIESGO	OR
Edad	1,19 **
Sexo biológico	0,89 *
Consumo previo de ATB	3,02 ***
Consumo previo de PPI	1,28 ns
Internación previa	2,45 ***
CDI previa	1,76 ns
WBC (10 ⁹ cel/mm ³)	1,35 *
Plaquetas (10 ⁹ cel/ mm ³)	1,54 .
Comorbilidades	
Diabetes <i>mellitus</i>	1,26 .
Enfermedad Cardíaca	1,41 *
Enfermedad Renal Crónica	2,23 ***
VIH	1,00 ns

Tabla 6. Tabla resumen con los efectos obtenidos para cada variable de interés analizada mediante la metodología de meta-análisis. La edad, el sexo biológico, el consumo previo de ATB, los recuentos de leucocitos, la internación previa y la presencia de comorbilidades previas como cardiopatías y nefropatías mostraron diferencias significativas.

ANOVA por Máxima Verosimilitud Restringida (REML). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Características morfológicas y capacidad endocítica de los macrófagos entrenados con *C. difficile* frente a *M. tuberculosis*

El eje intestino-pulmón establece una conexión crucial entre la microbiota intestinal y la salud del sistema respiratorio, y viceversa, lo cual sugiere la importancia de mantener una microbiota saludable para el desarrollo inmunológico y la homeostasis. Teniendo en cuenta que los macrófagos (MΦ) son actores claves en la respuesta anti-tuberculosa, nos propusimos evaluar la función endocítica de MΦ derivados de monocitos humanos frente a *M. tuberculosis* en el contexto de una pre-exposición a *C. difficile*.

Inicialmente, evaluamos cambios morfológicos en los MΦ, los cuales fueron obtenidos a partir de monocitos de sangre periférica de donadores sanos (n = 5) y cultivados por 1, 2, 5 y 7 días en presencia de CDH. La **Fig. 6 a** muestra la selección de la población inicial de MΦ mediante los parámetros *Forward scatter* (FSC, dispersión frontal-tamaño celular) y *Side scatter* (SSC, dispersión lateral-granularidad celular). Se observan dos poblaciones de MΦ principales, que varían particularmente en su tamaño. Con el transcurso de los días de cultivo, ambas poblaciones tienden a concentrarse en una de mayor tamaño celular. La **Fig. 6 b** muestra la viabilidad de los MΦ (células eFluor 780 negativas) en cada uno de los tiempos analizados; la cual se mantiene alrededor de un 90%; incluso en el día 7, y sin necesidad de renovar el medio de cultivo o adicionar factores de crecimiento durante el desarrollo del experimento.

Los MΦ también fueron evaluados por microscopía de campo claro y fluorescencia. La **Fig. 6 c y d** muestra el cambio en el tamaño y forma celular de los MΦ, confirmando lo observado por citometría de flujo. En estas micrografías se evidencia que los MΦ modifican la forma esférica típica de monocitos conforme avanza el proceso de diferenciación. A medida que pasan los días de cultivo, los MΦ presentan un tamaño superior y exhiben prolongaciones celulares como filopodios y lamelipodios que se incrementan en número y longitud.

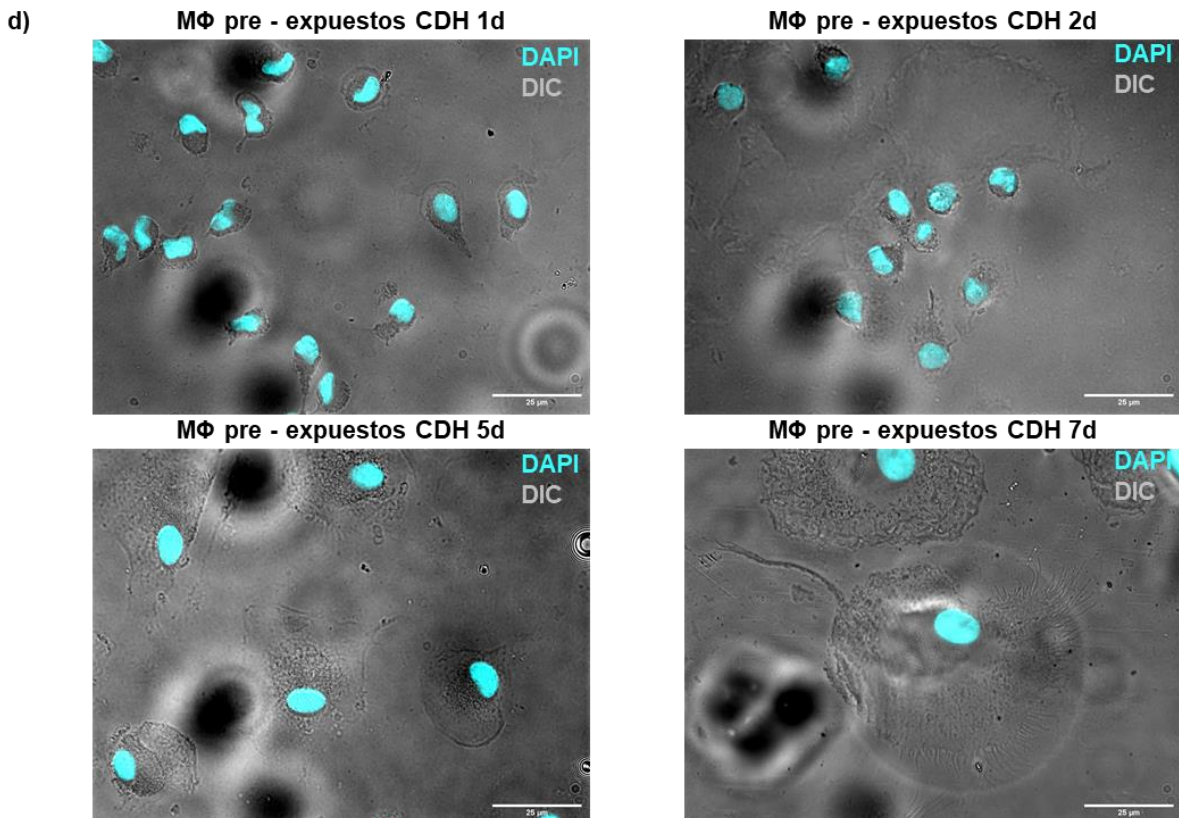
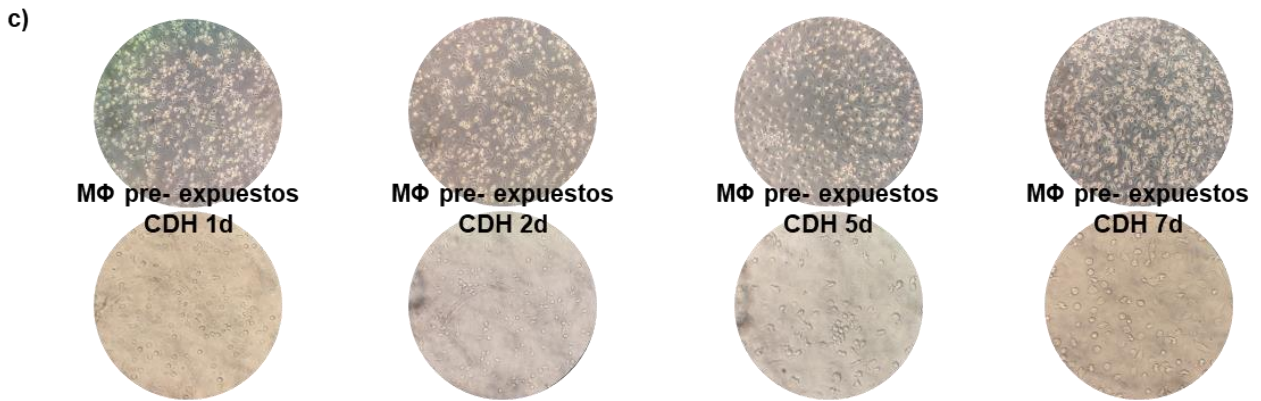
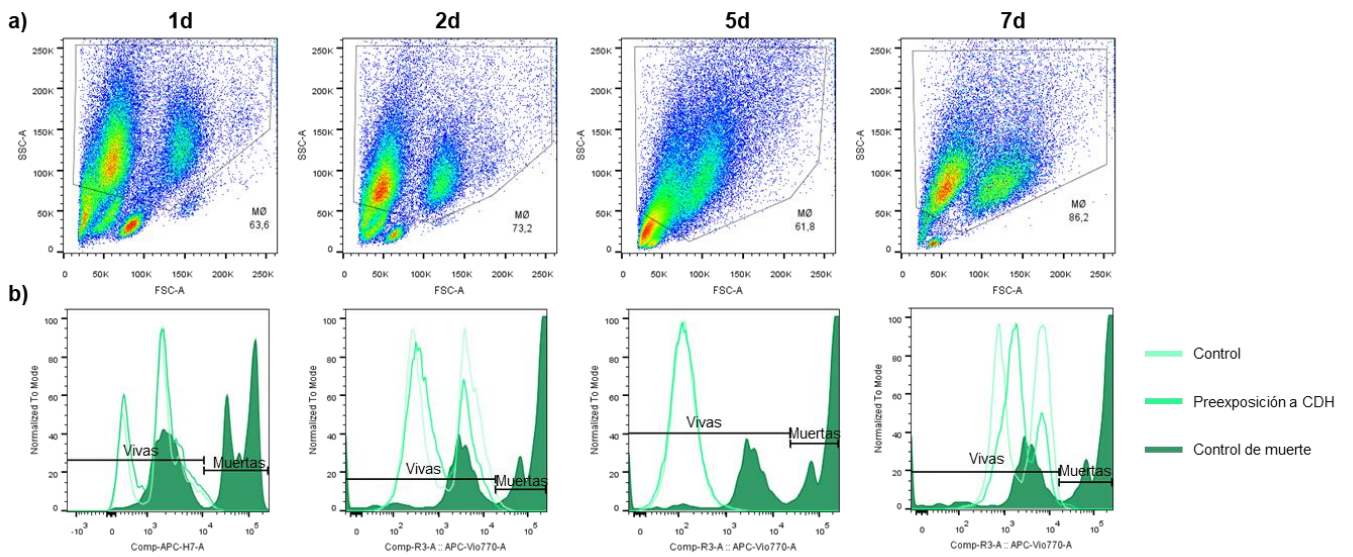


Figura 6. Morfología de macrófagos derivados de monocitos estimulados con CDH. **a)** Los cambios en los volúmenes citoplasmáticos y la granularidad se evaluaron mediante citometría de flujo. **b)** La viabilidad celular en los diferentes puntos temporales se analizó mediante el colorante de viabilidad eFluor™ 780, el cual se une a células muertas. En los histogramas se comparan los MΦ bajo estudio con y sin pre-sensibilización, contra un control positivo de muerte (MΦ muertos por calor). Se muestran ejemplos representativos en todos los casos. **c)** y **d)** La detección de estructuras endocíticas típicas (por ejemplo, pseudópodos o lamelipodios) se observó mediante microscopía. En **d)** se observa el núcleo teñido con DAPI (Cian).

DIC, contraste de interferencia diferencial.

Barras de escala: 25 μm

Para evaluar si el entrenamiento de los MΦ con *C. difficile* impacta sobre la capacidad endocítica frente a *M. tuberculosis*, los MΦ fueron cultivados en presencia o ausencia de CDH por 1, 2, 5 y 7 días y luego enfrentados a WCMtb FITC por 1 h. Adicionalmente, con el fin de determinar si la presencia extracelular de *C. difficile* es necesaria para modular el reconocimiento de *M. tuberculosis* mediado por los MΦ, a cada condición experimental se le realizó un recambio del medio de cultivo previo al estímulo con WCMtb FITC. La endocitosis se analizó mediante citometría de flujo determinando el porcentaje de células FITC positivas y la mediana de intensidad de fluorescencia (**Fig. 7**).

Si bien no encontramos diferencias significativas al analizar la capacidad individual de cada MΦ para internalizar a WCMtb (intensidad de fluorescencia, **Fig. 7 a**), se observa una disminución de los niveles endocíticos en el día 2 y su posterior aumento en los días 5 y 7, donde se llega a un máximo para cualquiera de las condiciones de estudio. Esta observación se repite al evaluar la cantidad de MΦ capaces de internalizar a WCMtb, mostrando diferencias significativas entre el segundo y el séptimo día de cultivo y el mayor porcentaje de células FITC positivas al día 7 (**Fig. 7 b**). Respecto a las diferentes condiciones de cultivo (**Fig. 7 c-d**), tanto el entrenamiento previo de los MΦ con CDH como la presencia extracelular de CDH parecen no modificar la capacidad endocítica frente a WCMtb en nuestro modelo de estudio.

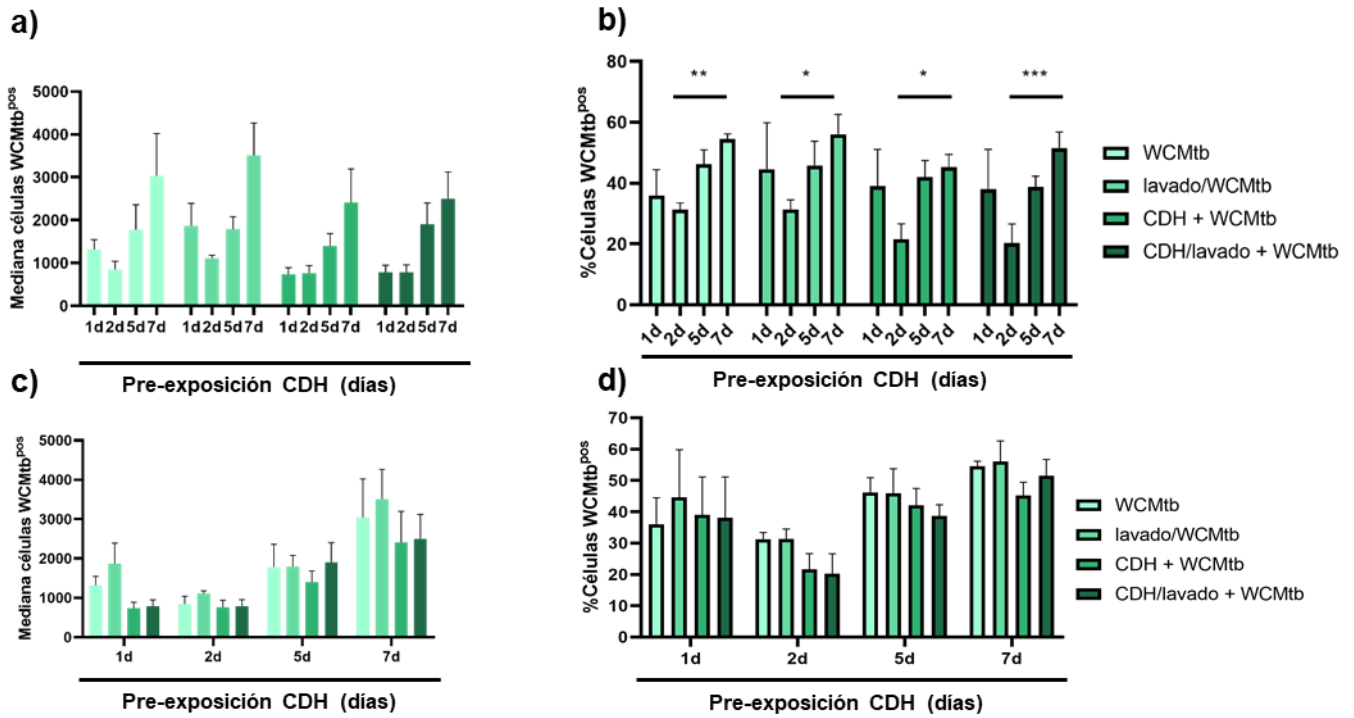


Figura 7. Capacidad endocítica frente a *M. tuberculosis*. Los MΦ derivados de monocitos de donadores sanos fueron pre-expuestos o no a CDH (MΦs:CDH 1:1) durante 1, 2, 5 o 7 días. A continuación, se cambiaron o no los medios de cultivo (lavado) y se estimuló con WCMtb acoplado a FITC durante 1h (MΦs:WCMtb 1:5). La mediana de la intensidad de fluorescencia **a)** y **c)** y los porcentajes **b)** y **d)** de MΦ FITC positivos (MΦ internalizando WCMtb) se evaluaron mediante citometría de flujo. **a)** y **b)** Cambios en la capacidad endocítica en cada condición experimental. **c)** y **d)** Análisis la cinética de la capacidad endocítica para cada condición experimental estudiada. Las barras representan la media ± SEM.

ANOVA de 2 vías con post-test de Tukey. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,01

Para cuantificar la endocitosis de *M. tuberculosis* y *C. difficile* por parte de los MΦ, así como efectos excluyentes en la internalización de ambas bacterias, los experimentos fueron analizados por IF (**Fig. 8-12**). En este caso, ambas bacterias fueron acopladas a fluoróforos para diferenciarlas. En la **Fig. 8** se muestran campos representativos de la microscopía de fluorescencia y en las **Fig. 9, 10 y 12** las cuantificaciones correspondientes a cada condición experimental.

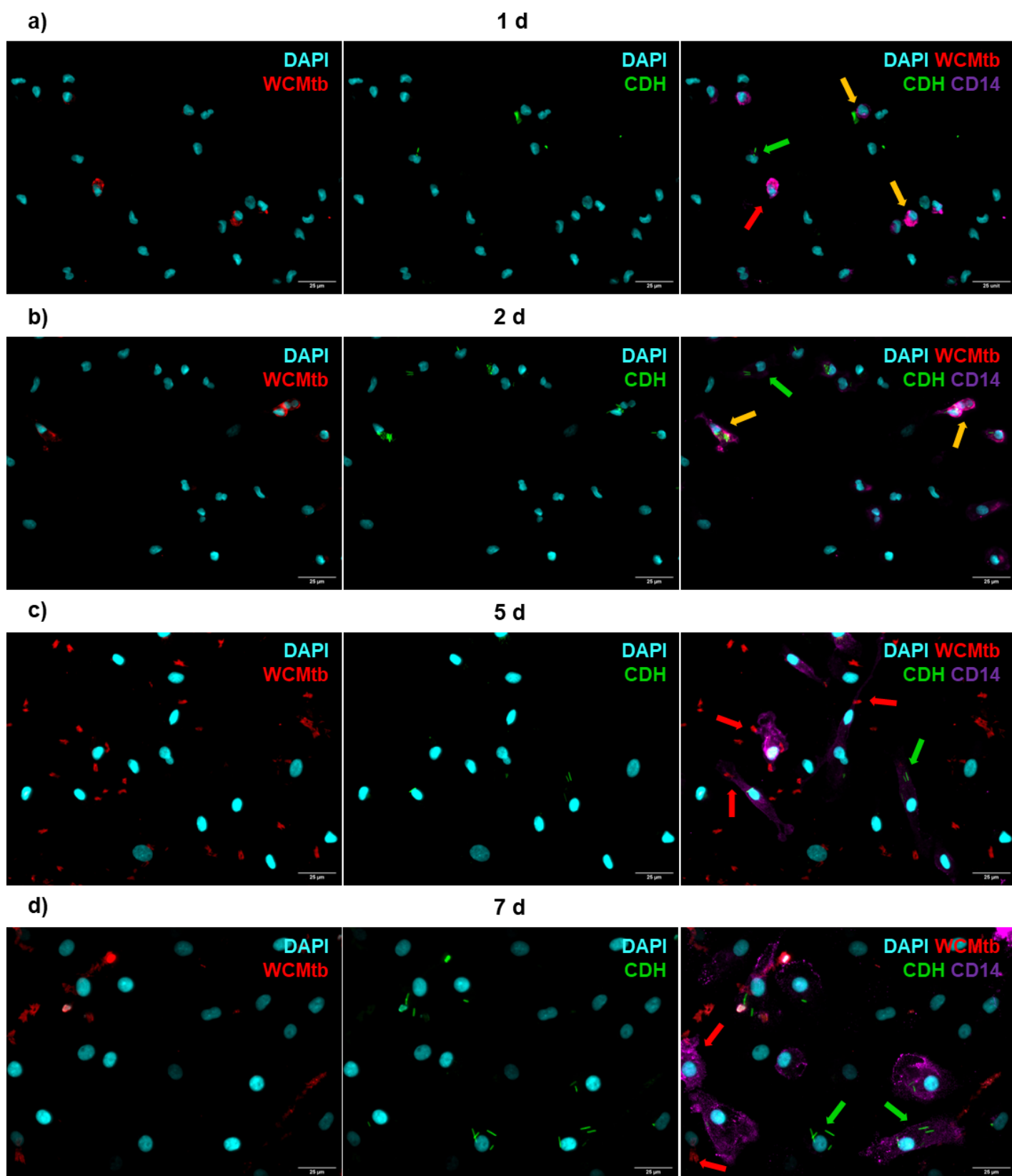


Figura 8. Localización celular de *C. difficile* y de *M. tuberculosis*. Los MΦ derivados de monocitos de dadores sanos fueron pre-expuestos a CDH FITC (MΦs:CDH 1:1) durante **a)** 1, **b)** 2, **c)** 5 o **d)** 7 días. A continuación, se cambiaron los medios de cultivo (lavado) y se estimuló a las MΦs con WCMtb acoplado a Rodamina durante 1h (MΦs:WCMtb 1:5). Se muestran micrografías representativas tomadas con un objetivo 40X. Para la detección de CD14 se utilizaron anticuerpos específicos de ratón anti-CD14 humano, seguido de anticuerpos secundarios anti-ratón conjugados a Alexa Fluor 647 (magenta para CD14). El núcleo se tiñó con DAPI (cian). La detección se realizó luego de la fijación y permeabilización de los macrófagos.

Flecha naranja: MΦ endocitando ambas bacterias. Flecha roja: MΦ endocitando exclusivamente WCMtb RODA. Flecha verde: MΦ endocitando exclusivamente CDH FITC.

Barras de escala: 25 μm

En cuanto a la internalización de *C. difficile*, el porcentaje de células endocíticas no presentó diferencias significativas en ninguno de los cuatro tiempos analizados (**Fig. 9 a-b**). Sin embargo, la intensidad de fluorescencia indica que al día 5 los MΦ contienen una mayor cantidad de CDH intracelular (**Fig. 9 c**). Por último, la proporción de MΦ que endocitaron exclusivamente CDH respecto a los CDH+ totales, no presentó variaciones y se mantuvo alrededor del 50% en todos los tiempos de estudio (**Fig. 9 d**). En general, la capacidad endocítica de los MΦ frente a CDH permanece estable y no se modula al incrementar el tiempo de exposición a *C. difficile*.

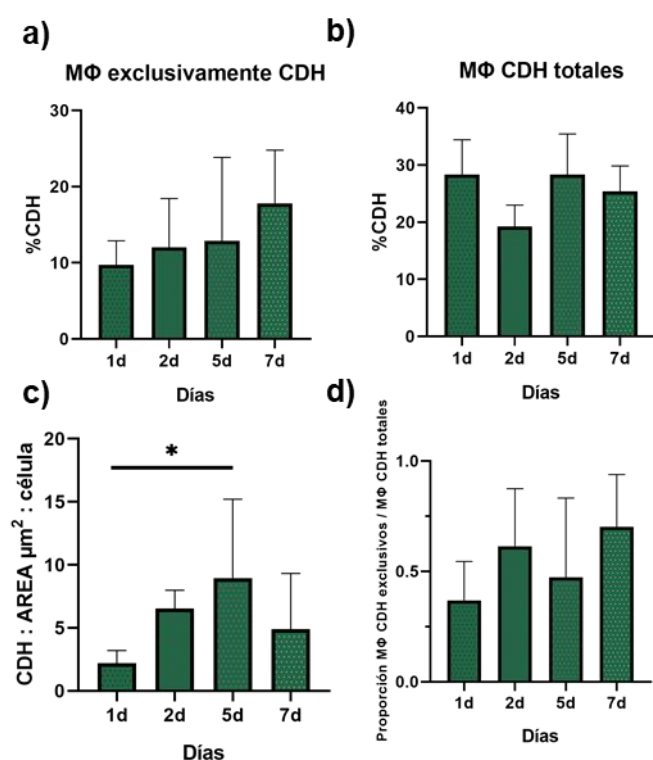


Figura 9. Capacidad endocítica frente a *C. difficile*. Los MΦ derivados de monocitos de dadores sanos fueron pre-expuestos a CDH FITC (MΦ:CDH 1:1) durante 1, 2, 5 o 7 días. A continuación, se cambiaron los medios de cultivo (lavado) y se estimuló a los MΦ con WCMtb Rodamina durante 1h (MΦ:WCMtb 1:5). La mediana de la intensidad de fluorescencia **c)** y los porcentajes **a)**, **b)** y **d)** de MΦ FITC positivos (MΦ internalizando CDH) se evaluaron mediante microscopia de fluorescencia. **a)** MΦ que exclusivamente endocitaron CDH (WCMtb^{neg} CDH^{pos}). **b)** MΦ totales que endocitaron CDH (WCMtb^{neg} CDH^{pos} + WCMtb^{pos} CDH^{pos}). **c)** MΦ totales que endocitaron CDH cuantificado por intensidad (Área ocupada por CDH en μm² por cada célula). **d)** Proporción de MΦ que endocitaron solo CDH (WCMtb^{neg} CDH^{pos}) relativa a la endocitosis total de CDH (WCMtb^{neg} CDH^{pos} + WCMtb^{pos} CDH^{pos}). Las barras representan la media ± SEM.

ANOVA de 2 vías con post-test de Tukey. * p < 0,05

En lo que respecta a WCMtb, observamos una cinética particular en la capacidad endocítica de los MΦ, similar a la obtenida por citometría de flujo. Al evaluar el porcentaje de MΦ que exclusivamente endocitaron WCMtb (**Fig. 10 a**), observamos una mayor fagocitosis de WCMtb en los MΦ pre-sensibilizados por 5 y 7 días respecto a los tiempos más cortos. Por otra parte, se observa una reducción en la capacidad de internalizar a WCMtb en los MΦ expuestos por 48h a CDH (**Fig. 10 b**), lo cual luego se revierte en los MΦ entrenados por 5 días con *C. difficile*.

Resultados similares se obtienen al evaluar la intensidad de fluorescencia para el WCMtb (Rodamina) por célula individual (**Fig. 10 c**), lo cual indica que cada MΦ incrementó la cantidad de WCMtb endocitado en las condiciones correspondientes a los MΦ pre-sensibilizados por 5 días y también por 7 días con CDH. Por último, notamos un aumento significativo de macrófagos que endocitan selectivamente al WCMtb a medida que transcurren los días de entrenamiento (**Fig. 10 d**). Luego de un día de exposición a CDH, aproximadamente el 25% de los MΦ que endocitaron WCMtb eran exclusivos para esta bacteria, mientras que este porcentaje alcanzó el 80% en los MΦ expuestos a CDH por 7 días. En conjunto, estos resultados muestran la especialización de la función endocítica frente a *M. tuberculosis* a medida que los MΦ se diferencian y entrenan con CDH por un tiempo más prolongado. Es decir que si los MΦ se pre-exponen a *C. difficile* por un mayor tiempo, aquellos que hayan internalizado a esta bacteria pierden capacidad para endocitar a *M. tuberculosis*.

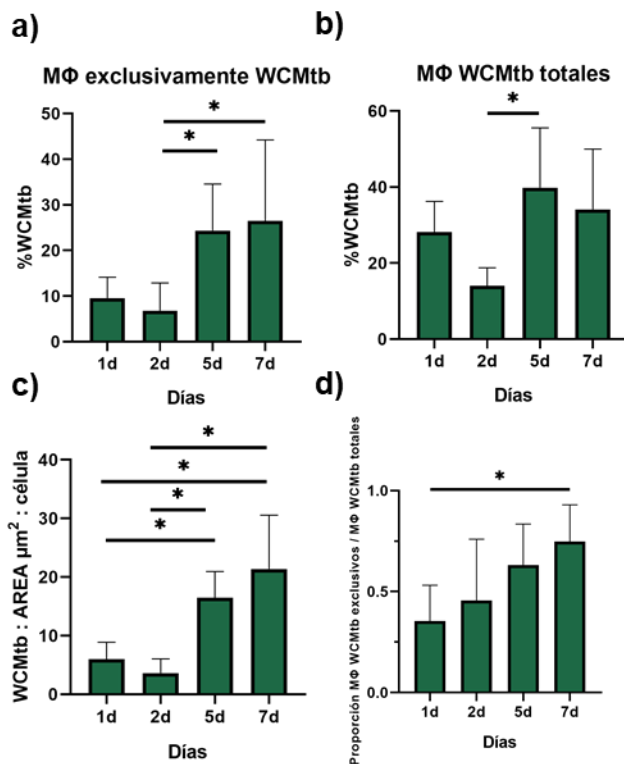
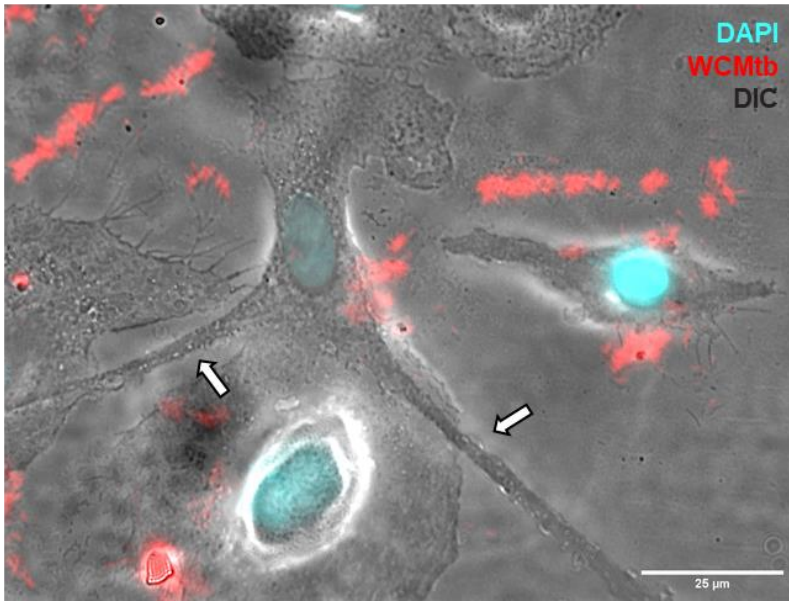


Figura 10. Capacidad endocítica frente a *M. tuberculosis*. Los MΦ derivados de monocitos de dadores sanos fueron pre-expuestos a CDH FITC (MΦ:CDH 1:1) durante 1, 2, 5 o 7 días. A continuación, se cambiaron los medios de cultivo (lavado) y se estimuló a los MΦ con WCMtb Rodamina durante 1h (MΦ:WCMtb 1:5). La mediana de la intensidad de fluorescencia **c)** y los porcentajes **a)**, **b)** y **d)** de MΦ Rodamina positivos (MΦ internalizando WCMtb) se evaluaron mediante microscopia de fluorescencia. **a)** MΦ que exclusivamente endocitaron WCMtb (WCMtb^{pos} CDH^{neg}). **b)** MΦ totales que endocitaron WCMtb (WCMtb^{pos} CDH^{pos} + WCMtb^{pos} CDH^{neg}). **c)** MΦ totales que endocitaron WCMtb cuantificado por intensidad (Área ocupada por WCMtb en μm^2 por cada célula). **d)** Proporción de MΦ que endocitaron solo WCMtb (WCMtb^{pos} CDH^{neg}) relativa a la endocitosis total de WCMtb (WCMtb^{pos} CDH^{pos} + WCMtb^{pos} CDH^{neg}). Las barras representan la media \pm SEM.

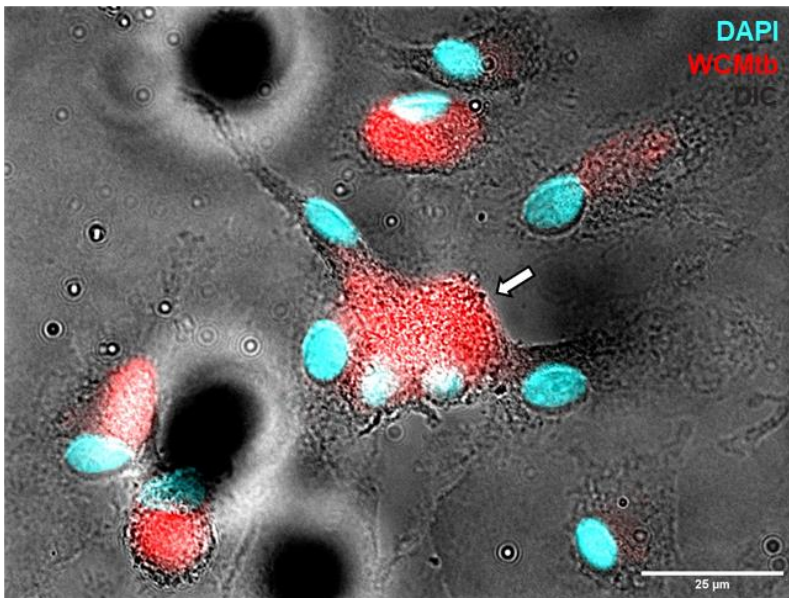
ANOVA de 2 vías con post-test de Tukey. * $p < 0,05$

Al observar las micrografías en detalle, detectamos que los MΦ que fueron expuestos a *M. tuberculosis* tendieron a aglomerarse o agruparse entre sí, presentando uniones entre sus filopodios (**Fig. 11**). Estas uniones permiten construir puentes citoplasmáticos similares a nanotubos (**Fig. 11 a-c**, flechas blancas). Adicionalmente, es posible observar en la **Fig. 11 c** que aquellas células que endocitaron a *C. difficile* se mantienen aisladas del resto y no forman prolongaciones citoplasmáticas, a diferencia de los macrófagos que endocitaron únicamente WCMtb.

a)



b)



c)

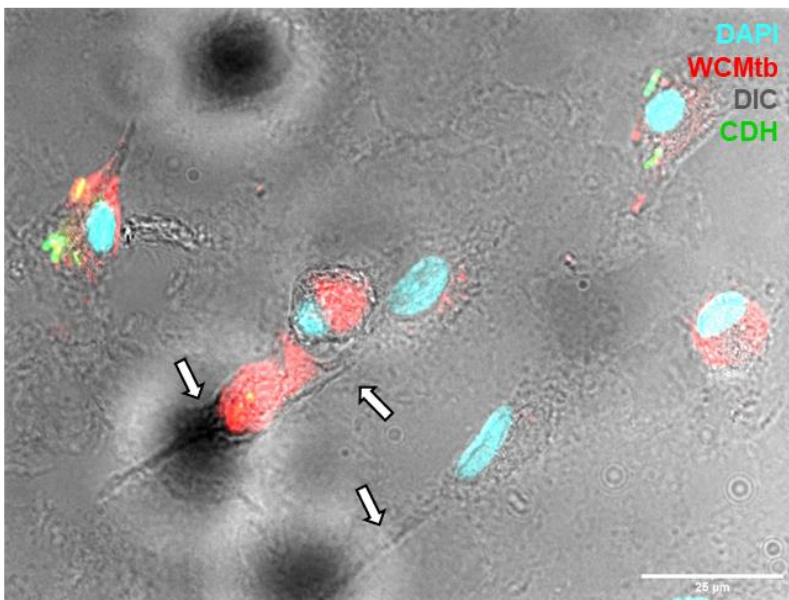


Figura 11. Cambios morfológicos de MΦ expuestos a *M. tuberculosis* y *C. difficile*. Los MΦ derivados de monocitos de dadores sanos fueron pre-expuestos a CDH FITC (MΦ:CDH 1:1, verde) durante 1, 2, 5 o 7 días. A continuación, se cambiaron los medios de cultivo (lavado) y se estimuló a los MΦ con WCMtb teñido con Rodamina durante 1h (MΦs:WCMtb 1:5, rojo). Se muestran micrografías tomadas con un objetivo 63X representativas. El núcleo se tiño con DAPI (cian). La detección se realizó luego de la fijación y permeabilización de los macrófagos. **a)** MΦ a los 7 días. Se aprecia la expansión celular y la formación de lamelipodios. Las flechas blancas resaltan los puentes citoplasmáticos similares a nanotúbulos. **b)** MΦ a los 5 días. La flecha blanca resalta la agregación de los MΦ en torno a WCMtb. **c)** MΦ a los 5 días. Las flechas blancas resaltan la comunicación entre células mediante los puentes citoplasmáticos. Se observa que las células que endocitaron CDH se muestran aisladas, a diferencia de aquellas que solo endocitaron WCMtb, las cuales tienden a agregarse.

DIC, contraste de interferencia diferencial.

Barras de escala: 25 µm

Finalmente, al evaluar el porcentaje de MΦ capaces de endocitar ambas bacterias, este se mantuvo entre el 10 al 20% aproximadamente (**Fig. 12 a**) y aquellos que no endocitaron ninguna de las dos bacterias entre un 50-70% (**Fig. 12 b**), sin presentar variaciones significativas en ningún caso.

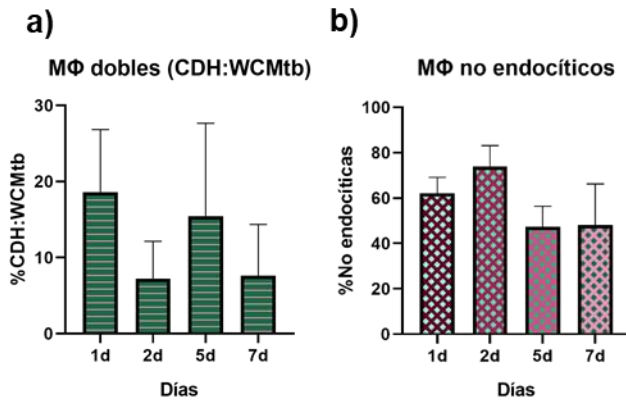


Figura 12. Capacidad endocítica frente a *C. difficile* y *M. tuberculosis*. Porcentaje de **a)** MΦ que endocitaron ambas bacterias ($WCMtb^{pos} CDH^{pos}$) en cada día evaluado y de **b)** MΦs que no endocitaron ninguna de las dos bacterias ($WCMtb^{neg} CDH^{neg}$) en cada día evaluado. Las barras representan la media \pm SEM.

Expresión de SLAMF1 en macrófagos entrenados con *C. difficile* y enfrentados a *M. tuberculosis*

SLAMF1 es una molécula coestimuladora que actúa como sensor de patógenos, desempeñando roles cruciales en interacciones con microorganismos. En humanos, SLAMF1 cumple un papel clave en la respuesta a la infección por *M. tuberculosis*, generando respuestas protectoras en neutrófilos, MΦ y células T. Particularmente, SLAMF1 facilita la entrada de la bacteria a los MΦ dirigiéndolas a endosomas tardíos/lisosomas¹³⁰. Por tanto, decidimos explorar si el entrenamiento de MΦ con *C. difficile* era capaz de modular la expresión de SLAMF1 en respuesta a *M. tuberculosis*. Para ello, los MΦ (n=3) fueron pre-expuestos durante 1, 2, 5 y 7 días con CDH, para luego ser enfrentados a WCMtb por 1 h o 24 h.

Mediante citometría de flujo, encontramos que la expresión de SLAMF1 en la superficie de los MΦ presenta un pico máximo a los 5 días luego del estímulo con WCMtb, independientemente del entrenamiento con CDH y de la presencia o no de *C. difficile* en el medio extracelular (**Fig. 13 a**).

Por otro lado, el porcentaje de MΦ SLAMF1 positivos se vio aumentado cuando las células se pre-sensibilizaron con CDH durante 1 día y *C. difficile* extracelular fue lavada del medio de cultivo (**Fig. 13 b**). Interesantemente, este patrón observado en la expresión de este receptor se invierte en el quinto día (**Fig. 13 b**). Si bien este tiempo es el día de mayor expresión de SLAMF1 en la cinética analizada, el porcentaje de células positivas para SLAMF1 se redujo cuando los MΦ fueron pre-entrenados con *C. difficile* antes de exponerlos a WCMtb (**Fig. 13 b**). A nivel de intensidad de fluorescencia no se observaron cambios significativos (**Fig. 13 c**).

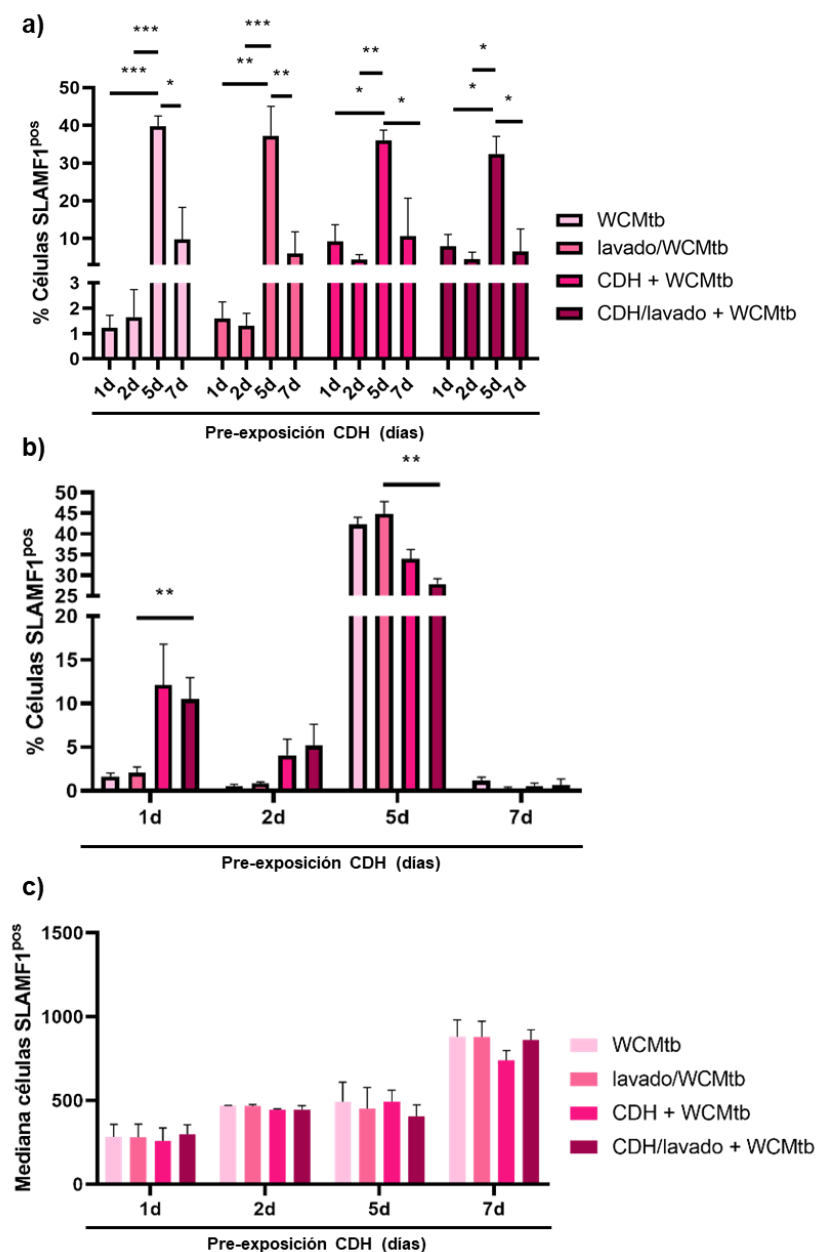


Figura 13. Expresión de superficie del sensor de *M. tuberculosis* SLAMF1.

Los MΦ fueron pre-expuestos o no a CDH (MΦ:CDH 1:1) durante 1, 2, 5 o 7 días. A continuación, se cambiaron o no los medios de cultivo (lavado) y se estimuló a los MΦ con WCMtb durante 1h (MΦ:WCMtb 1:5). Los porcentajes **a)** y **b)** y la mediana de la intensidad de fluorescencia **c)** de la expresión de SLAMF1 se evaluaron mediante citometría de flujo. **a)** Cambios en la expresión de SLAMF1 en cada condición experimental. **b)** y **c)** Cambios en la expresión de SLAMF1 cada día evaluado. Las barras representan la media ± SEM.

ANOVA de 2 vías con posttest de Tukey. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

Resultados previos de nuestro grupo de investigación muestran que *M. tuberculosis* sonicada (*Mtb*) induce la expresión de SLAMF1 significativamente a las 24 h de estimulación¹³⁰, mientras que CDH no es capaz de modular la expresión de SLAMF1 en los MΦ (**Fig. 14 a**). Teniendo en cuenta esta información, decidimos indagar si la reducción de la expresión de SLAMF1 mediada por *C. difficile* observada en este trabajo se mantenía luego de un mayor tiempo de exposición a WCMtb. En primer lugar, evaluamos si WCMtb era capaz de incrementar la expresión de SLAMF1 de igual manera que el sonicated; lo cual se confirmó mediante citometría de flujo (**Fig. 14 b**).

Luego, pre-entrenamos o no a los MΦ con CDH durante 5 días y posteriormente los enfrentamos a WCMtb por 24 h. Con estos experimentos determinamos que la presencia de CDH efectivamente inhibe la expresión de SLAMF1, incluso cuando los MΦ son enfrentados a WCMtb de forma prolongada (**Fig. 14 c**).

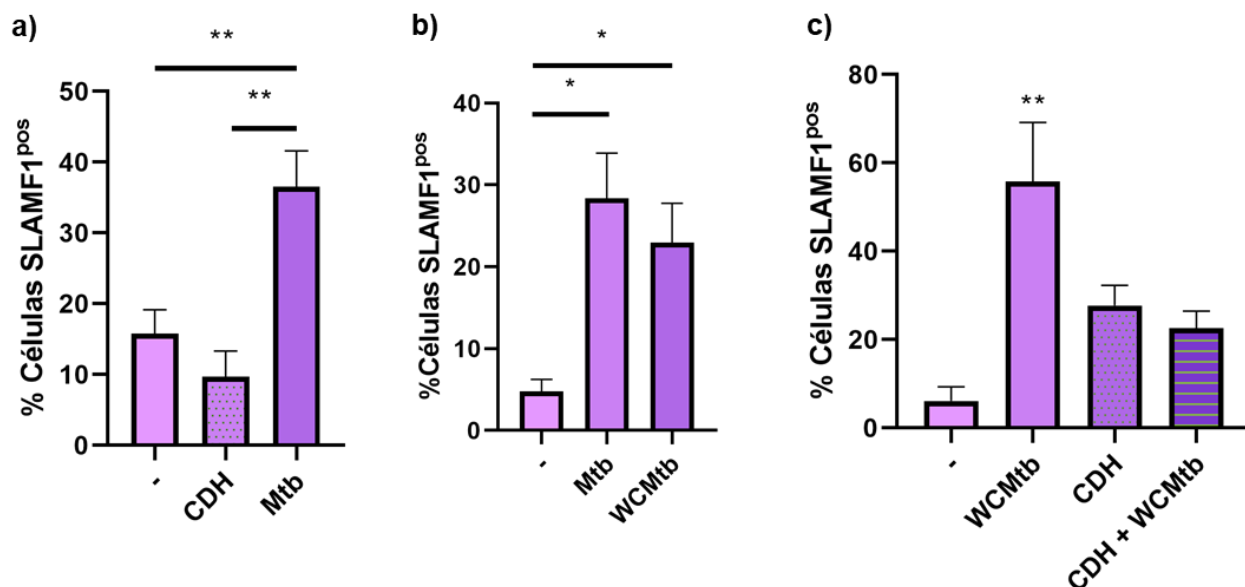


Figura 14. Expresión de SLAMF1 luego de 24h. a) MΦ derivados de monocitos de dadores sanos fueron estimulados con CDH o *M. tuberculosis* (Mtb) sonicada durante 24 h. b) MΦ derivadas de monocitos de dadores sanos fueron estimulados con *M. tuberculosis* (Mtb) sonicada o WCMtb durante 24 h. c) MΦ derivados de monocitos de dadores sanos fueron pre-entrenados o no con CDH por 5 días y luego estimulados o no con WCMtb durante 24 h. En todos los casos el porcentaje de células que expresaban SLAMF1 en superficie se analizó por citometría de flujo. Las barras representan la media ± SEM.

Kuskal-Wallis con post-test de Dunns. * p < 0,05; ** p < 0,01

Seguidamente, con la finalidad de estudiar la co-localización de ambas bacterias con SLAMF1, así como también comprobar su expresión intracelular, realizamos los ensayos por IF. Para esto utilizamos el esquema de pre-sensibilización con CDH por 5 días seguido de un estímulo por 24 h de WCMtb.

Al cuantificar la intensidad de fluorescencia de SLAMF1 por célula, confirmamos lo observado mediante citometría de flujo. La expresión de SLAMF1 intracitoplasmática es también reducida por la pre-sensibilización con CDH (**Fig. 15 a**). Asimismo, la pre-exposición a CDH también disminuye significativamente la endocitosis de WCMtb por parte de los MΦ (**Fig. 15 b**).

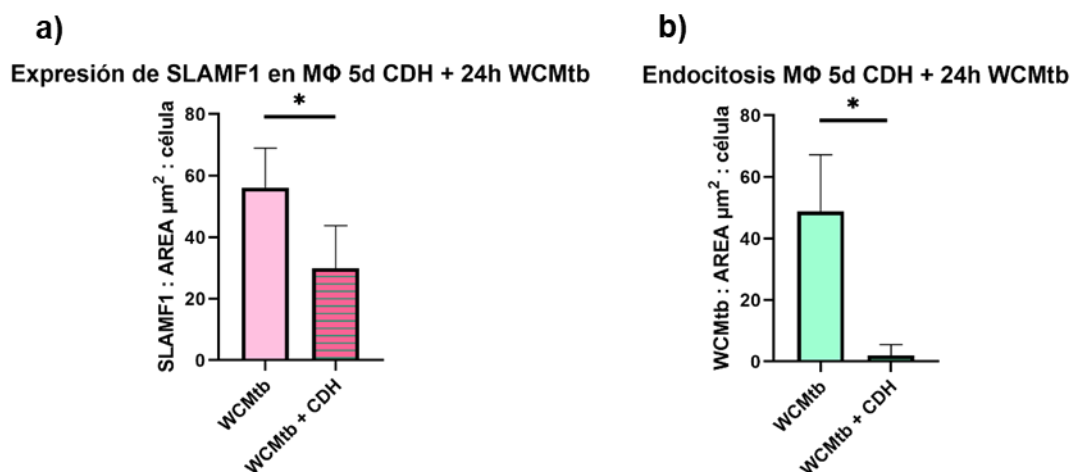


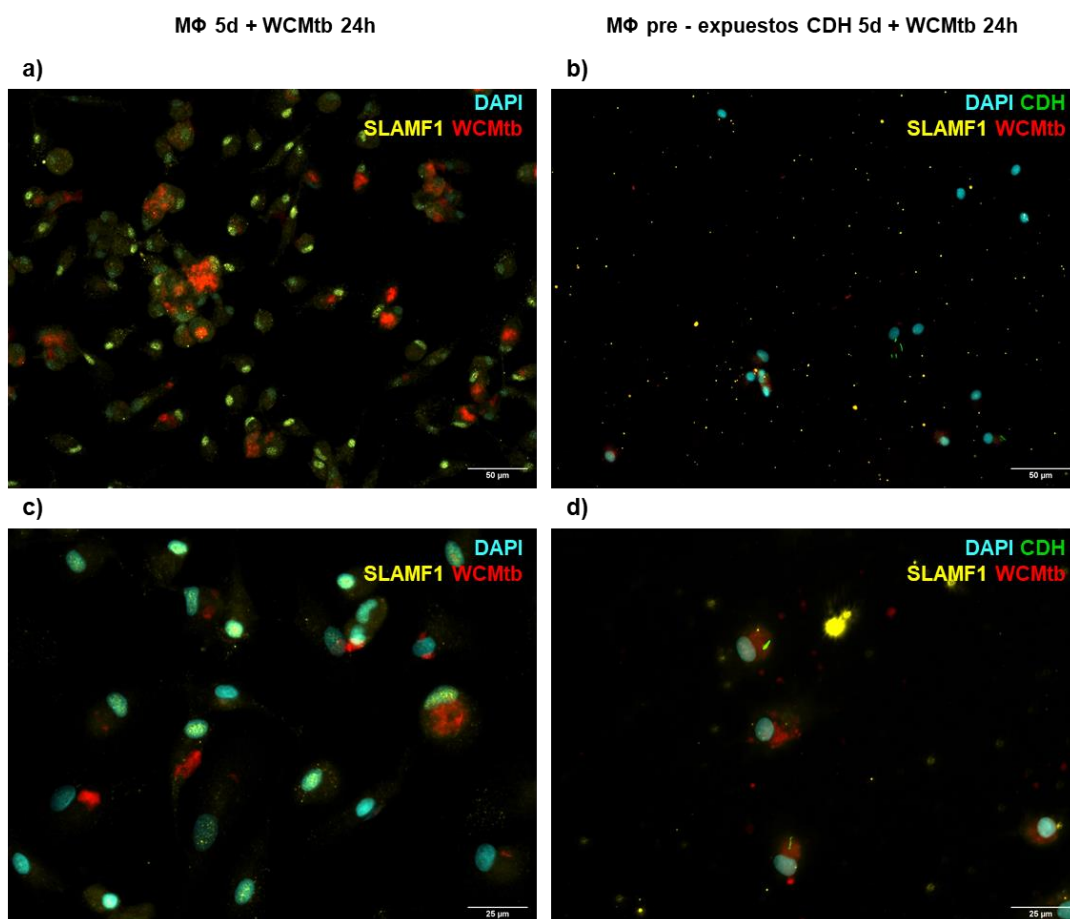
Figura 15. Expresión de SLAMF1 en MΦ pre-entrenados por 5d. Los MΦ sensibilizados o no con CDH por 5 días se estimularon con WCMtb (MΦs:WCMtb 1:1) durante 24 h adicionales y se analizaron mediante microscopia de fluorescencia. Se evaluó **a)** la expresión de SLAMF1 intracelular (intensidad media de fluorescencia) y **b)** la capacidad endocítica frente a WCMtb. Las barras representan la media \pm SEM.

Kuskal-Wallis con post-test de Dunns. * $p < 0,05$

Adicionalmente, en las imágenes de fluorescencia puede observarse que SLAMF1 co-localiza con WCMtb, mientras que en aquellos MΦ que endocitaron CDH, la expresión de este receptor cambia su patrón de expresión (**Fig. 16**). En ausencia de CDH, SLAMF1 se encuentra fuertemente expresado en zonas perinucleares de los MΦ que endocitaron WCMtb (**Fig. 16 a, c y e**). Sin embargo, en aquellos MΦ entrenados con CDH previo al estímulo de WCMtb, SLAMF1 disminuye su expresión, la cual se observa dispersa por todo el citoplasma celular y sin co-localizar con *C. difficile* (**Fig. 16 b, d y f**).

Curiosamente, como mencionamos anteriormente (**Fig. 11**), es posible observar que cuando CDH está ausente, los MΦ tienden a concentrarse en cúmulos alrededor de WCMtb y formar puentes citoplasmáticos entre sí (**Fig. 16 g**). Esta característica también se pierde cuando los MΦ son entrenados con CDH; los cuales muestran estas prolongaciones de comunicación citoplasmáticas únicamente en los casos que hayan endocitado WCMtb (**Fig. 16 h**).

En resumen, todos estos resultados muestran que *C. difficile* puede interrumpir mecanismos inmunes protectivos modificando la capacidad de los MΦ humanos para reconocer y endocitar a *M. tuberculosis*. Teniendo en cuenta que los monocitos periféricos pueden dar lugar a macrófagos que se alojan en los alvéolos, el diseño experimental implementado en estos ensayos ofrece importantes herramientas para aproximarnos a los mecanismos que se ponen en marcha fisiológicamente durante la Tuberculosis.



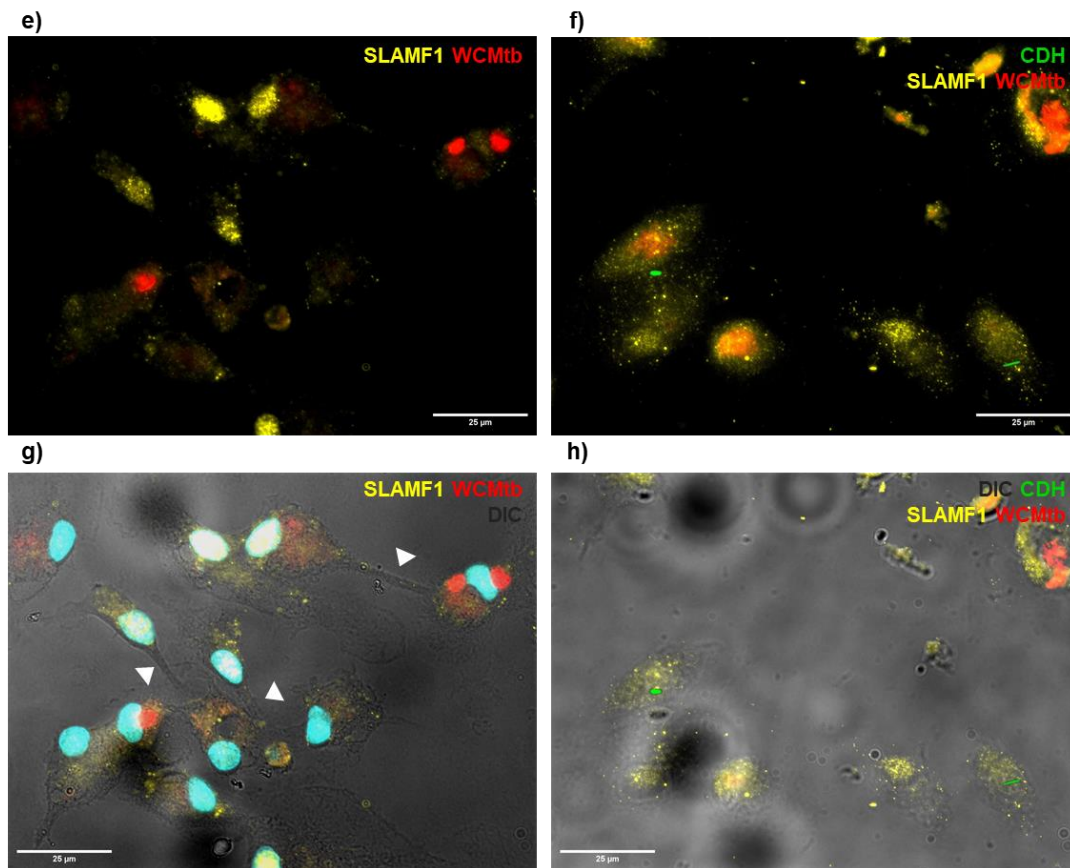


Figura 16. Expresión intracelular de SLAMF1. MΦ sensibilizados o no con CDH FITC (verde) por 5 días y estimulados con WCMtb Rodamina (MΦ:WCMtb 1:1, rojo) durante 24 h adicionales. Se muestran micrografías representativas tomadas con un objetivo 20X para **a)** y **b)**, 40X para **c)** y **d)**, y 63X para **e)**, **f)**, **g)** y **h)**. Para la detección de SLAMF1 se utilizaron anticuerpos específicos de ratón anti-SLAMF1 humano, seguido de anticuerpos secundarios anti-ratón conjugados a Alexa Fluor 647 (amarillo para SLAMF1). El núcleo se tiñó con DAPI (cian). La detección se realizó luego de la fijación y permeabilización de los MΦ.

g) Las flechas blancas resaltan puentes citoplasmáticos formados entre células.

b, d, f y h) Los cúmulos brillantes observados por fuera de las células corresponden a SLAMF1 interaccionando con WCMtb que permaneció adherida a la placa, como ha sido demostrado anteriormente por nuestro grupo (por Barbero et al; 2021¹⁴⁴). Curiosamente, este efecto se observa principalmente en la condición con CDH presente.

DIC, contraste de interferencia diferencial.

Barras de escala: 25 μm

Impacto de la disbiosis y de la CDI sobre la estructura del intestino y el pulmón

La interconexión entre el sistema gastrointestinal y el sistema respiratorio, conocida como el eje intestino-pulmón, ha emergido como un componente crucial para comprender la interrelación entre la microbiota y la salud del hospedador. La utilización de modelos murinos ha sido instrumental para explorar las complejas interacciones entre la microbiota, los metabolitos microbianos y las respuestas inmunológicas.

Con el fin de examinar el impacto de la disbiosis intestinal originada por antibióticos y la CDI en el sitio de infección, analizamos las características histológicas del colon y del ciego de ratones C57BL/6 que 1) no recibieron ningún tratamiento, 2) fueron tratados con antibióticos para generar disbiosis o 3) fueron tratados con antibióticos e infectados con *C. difficile*. Para esto, a partir de cortes de los tejidos teñidos con H&E, evaluamos el score histopatológico detectando infiltración celular mixta, edema y daño epitelial. El rango del score varió de 0-3 de acuerdo a la severidad (0: sin daño, 1: leve, 2: moderado, 3: severo). La condición *disbiosis T=0* corresponde a ratones que recibieron el esquema de antibióticos y fueron sacrificados luego de la inyección de clindamicina. El resto de las condiciones de *disbiosis* corresponden a controles donde se realizó el tratamiento antibiótico, pero no fueron infectados con *C. difficile*, permitiéndoles recuperarse por 2, 5 y 8 días antes del sacrificio.

La **Figura 17** muestra microfotografías representativas de la tinción con H&E de cada una de las condiciones evaluadas. Particularmente, a partir del día 2 (**Fig. 17 c**), se logra apreciar claramente la infiltración celular mixta, así como la edematización del tejido y el daño de la mucosa representado por la erosión de las microvellosidades apicales, la hiperplasia de las criptas intestinales y la desorganización epitelial en general. Además, fue notoria la presencia de agregados linfoides que aumentaron en tamaño con el correr de los días (**Fig. 17 c-h**).

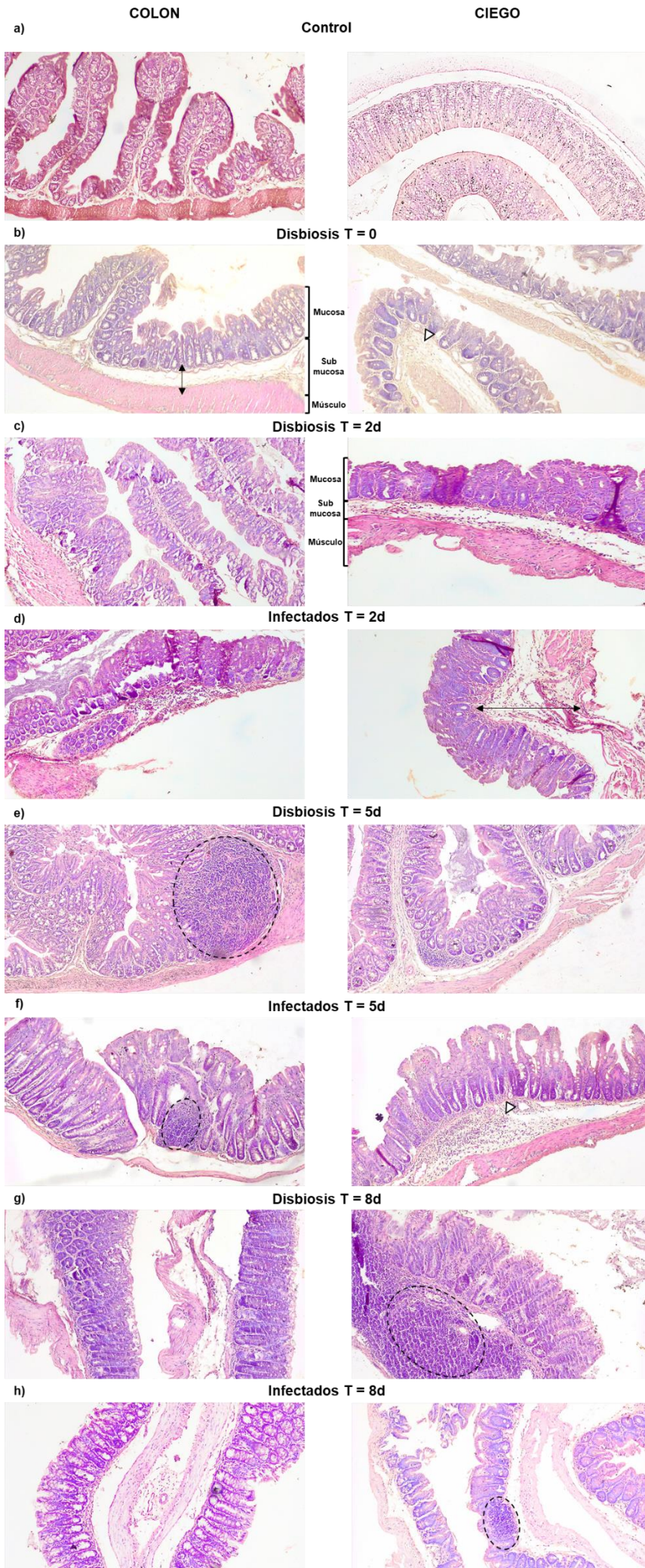


Figura 17. Micrografías representativas tomadas con un objetivo 10X de cortes de colon y ciego teñidos con H&E.

a) Control b) Disbiosis T=0 c) Disbiosis 2d d) Infectados 2d e) Disbiosis 5d f) Infectados 5d g) Disbiosis 8d h) Infectados 8d.

Las flechas negras con doble punta indican edema en la submucosa. Las flechas blancas indican infiltración celular mixta. Los círculos punteados delimitan los agregados linfoides.

La **Figura 18** muestra el score obtenido para el ciego y el colon de ratones control (sin tratamiento), ratones con disbiosis y ratones infectados por 2, 5 y 8 días. Al evaluar el impacto de la disbiosis, tanto en colon como en ciego, se observa un aumento significativo del score histopatológico luego de recibir el tratamiento antibiótico en relación a los ratones sin tratamiento (**Fig. 18 c y d**). De igual manera, el daño aumenta en el ciego y el colon de aquellos ratones que fueron infectados con *C. difficile* (**Fig. 18 e y f**). El mayor score se observó al segundo día en ambos tejidos (**Fig. 18 g**). Al comparar el estado de disbiosis y la infección, el colon de los ratones con CDI mostró un incremento significativo en el score histopatológico en relación a los ratones a los que se les indujo disbiosis pero no fueron infectados (**Fig. 18 a**). Si bien en el resto de los tiempos (5 y 8 días) no se encontraron diferencias significativas entre la disbiosis y la infección, el mayor nivel de daño se registró siempre en el ciego para cada una de las condiciones evaluadas (**Fig. 18 g**).

En conjunto, estos resultados indican que la generación de disbiosis mediada por antibióticos modifica el estado del intestino, promoviendo la infiltración de células inflamatorias, la formación de nódulos linfáticos y edema en la submucosa. La infección por *C. difficile* agrava la histopatología al segundo día de infección lo que corresponde a un estado agudo de la CDI. A tiempos más prolongados, el daño causado por la infección parece recuperarse, sin embargo, las afecciones producidas por la disbiosis permanecen hasta el día 8 sin retornar a un estado basal.

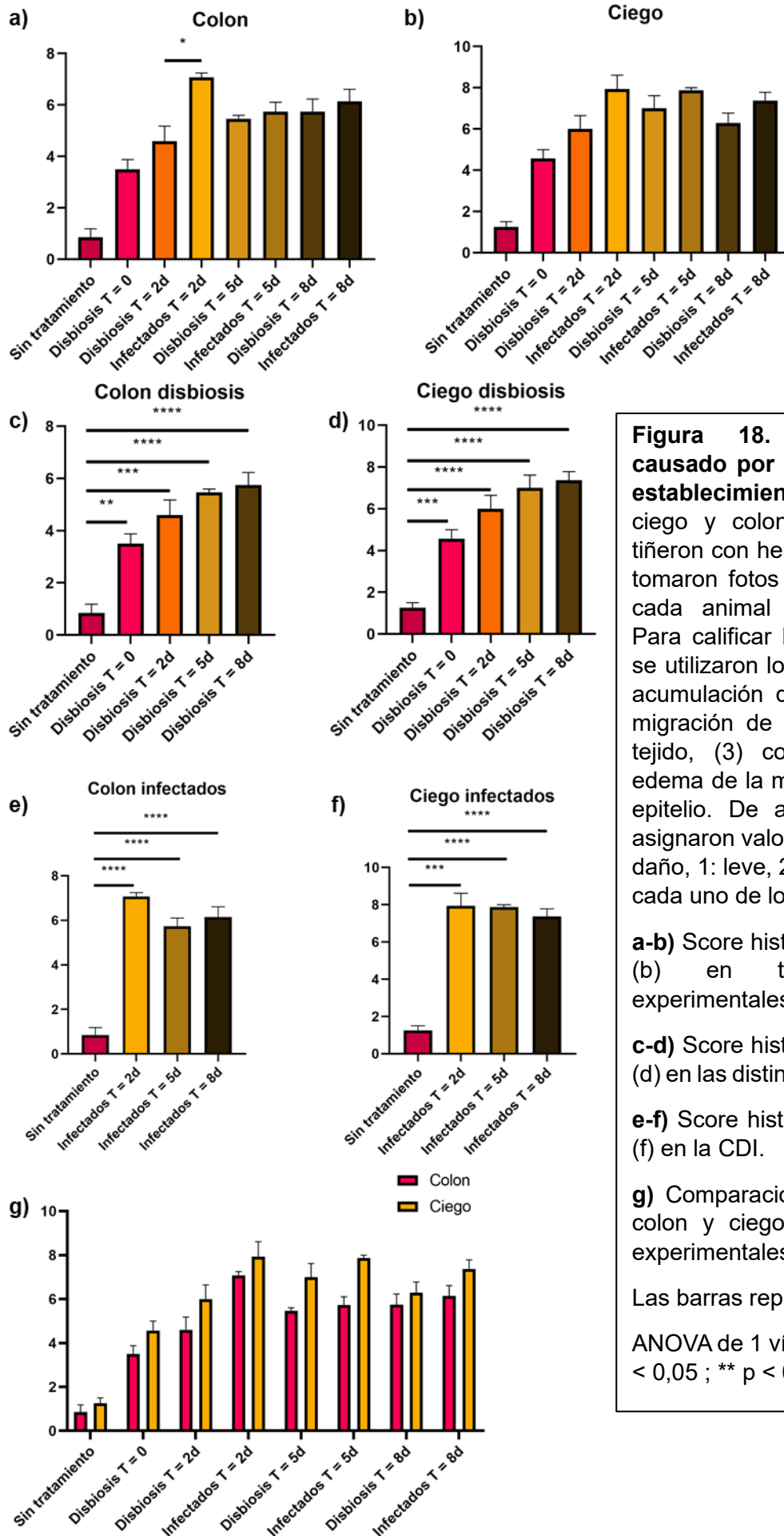


Figura 18. Score histopatológico causado por la disbiosis intestinal y el establecimiento de *C. difficile*.

Cortes de ciego y colon incluidos en parafina se tiñeron con hematoxilina-eosina (H&E). Se tomaron fotos de 5 campos aleatorios de cada animal y condición experimental. Para calificar la severidad histopatológica se utilizaron los siguientes parámetros: (1) acumulación de células inflamatorias, (2) migración de neutrófilos e infiltración del tejido, (3) congestión hemorrágica, (4) edema de la mucosa y (5) daño celular en epitelio. De acuerdo a la severidad se asignaron valores en el rango de 0-3 (0: sin daño, 1: leve, 2: moderado, 3: severo) para cada uno de los parámetros.

a-b) Score histológico del colon (a) y ciego (b) en todas las condiciones experimentales.

c-d) Score histológico del colon (c) y ciego (d) en las distintas condiciones de disbiosis.

e-f) Score histológico de colon (e) y ciego (f) en la CDI.

g) Comparación del score histológico del colon y ciego de todas las condiciones experimentales.

Las barras representan la media \pm SEM.

ANOVA de 1 vía con post-test de Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Por otro lado, con el fin de examinar el impacto de la disbiosis intestinal originada por los antibióticos y por la infección por *C. difficile* en el tejido pulmonar, analizamos las características histológicas de cortes de pulmón utilizando el macro "TWOMBLI" de ImageJ. En este caso comparamos el grupo de ratones sin tratamiento, el grupo disbiosis T = 0 y aquellos infectados por 5 días con su correspondiente control de disbiosis.

La **Figura 19** muestra micrografías representativas de las condiciones evaluadas. En la disbiosis inicial (**Fig. 19 b**), así como en el grupo de ratones infectados con *C. difficile* por 5 días (**Fig. 19 d**), se aprecian, no solo un mayor nivel de poros, sino también espacios de un mayor tamaño. Se evidencia además que, en comparación con los controles (**Fig. 19 a**), el parénquima pulmonar se ve más desorganizado y menos uniforme en el resto de condiciones. Curiosamente, en los ratones con CDI (**Fig. 19 d**), se evidencia un aumento en el grosor de los tabiques alveolares, lo que podría relacionarse con una mayor irrigación sanguínea a causa de la infección.

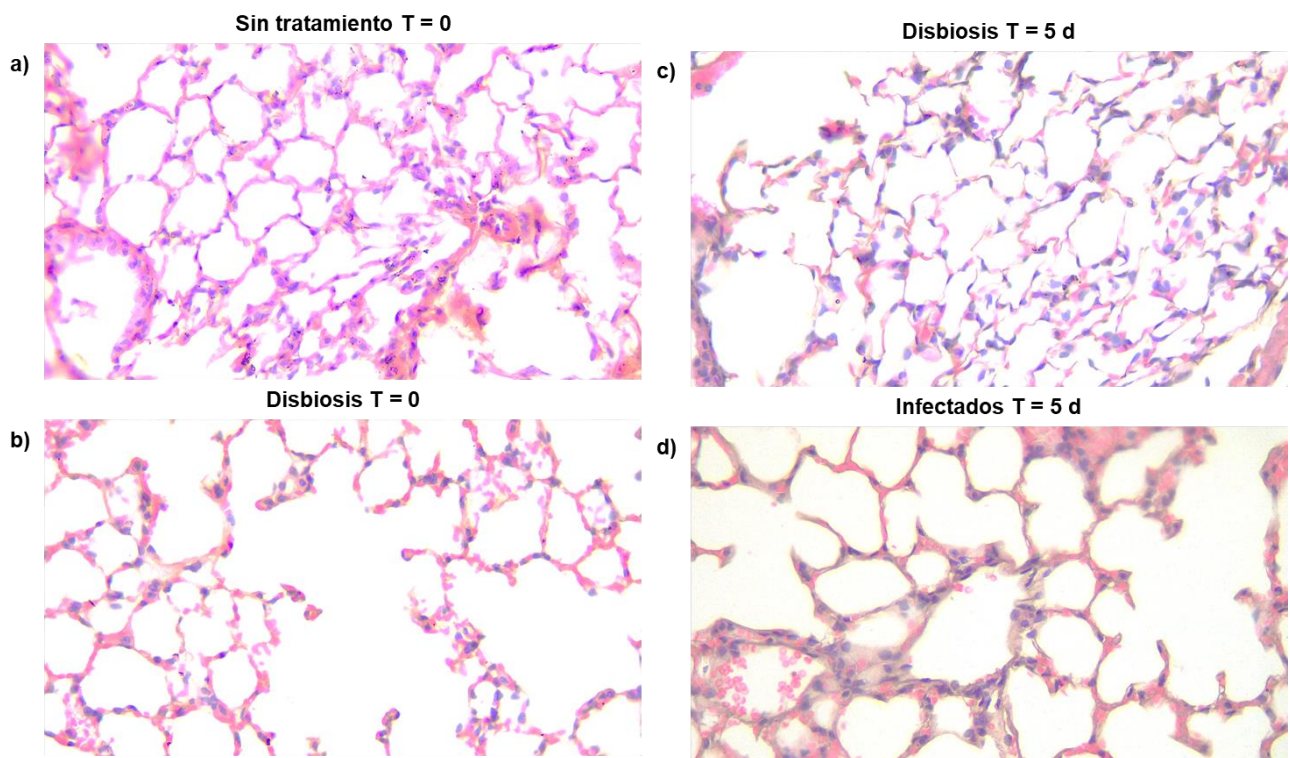


Figura 19. Micrografías representativas tomadas con un objetivo 10X de cortes de pulmón teñidos con H&E.

a) Control (sin tratamiento) b) Disbiosis T=0 c) Disbiosis 5d d) Infectados 5d.

Al evaluar y cuantificar patrones en las micrográficas del tejido pulmonar teñido con H&E, encontramos que tanto el área que ocupa el parénquima del pulmón (**Fig. 20 a**), así como la longitud del entramado que conforman los tabiques alveolares (**Fig. 20 b**), disminuyen significativamente con la generación de disbiosis intestinal en comparación al pulmón del grupo control. Mientras que, al quinto día luego de la disbiosis observamos una recuperación de la estructura pulmonar, los ratones infectados con *C. difficile* mantuvieron el compromiso estructural ocasionado por la disbiosis inicial (**Fig. 20 a y b**). El mismo comportamiento se observó para las variables *puntos de ramificación* (**Fig. 20 c**), *puntos terminales* (**Fig. 20 d**), *fractalidad* (**Fig. 20 e**) y *% de matriz de alta densidad* (**Fig. 20 f**), las cuales dan una idea de la complejidad e integridad del parénquima pulmonar.

Por último, observamos un patrón inverso en los parámetros *lacunaridad* y *porosidad* (**Fig. 20 g y h**). Los ratones con disbiosis inicial y aquellos infectados con *C. difficile* por 5 días mostraron un aumento significativo en la distribución y el número de espacios alveolares en sus pulmones, en comparación con los ratones sin tratamiento y los ratones con disbiosis intestinal al quinto día de recuperación (**Fig. 20 g y h**). Los parámetros *curvatura*, *alineación* y *HGU* no mostraron diferencias significativas entre condiciones (no mostrado).

Por lo tanto, estos resultados reflejan que los ratones experimentan un compromiso pulmonar a nivel estructural ocasionado por la disbiosis intestinal inducida por antibióticos. Estos ratones son incapaces de revertir las modificaciones pulmonares en presencia de la infección por *C. difficile*. Además, los hallazgos observados en este tiempo en particular de la infección (5 días) fortalecen los resultados obtenidos en nuestro modelo *in vitro*, donde observamos que macrófagos pre-sensibilizados con CDH por 5 días muestran cambios en la capacidad endocítica frente a *M. tuberculosis* y en la expresión de SLAMF1.

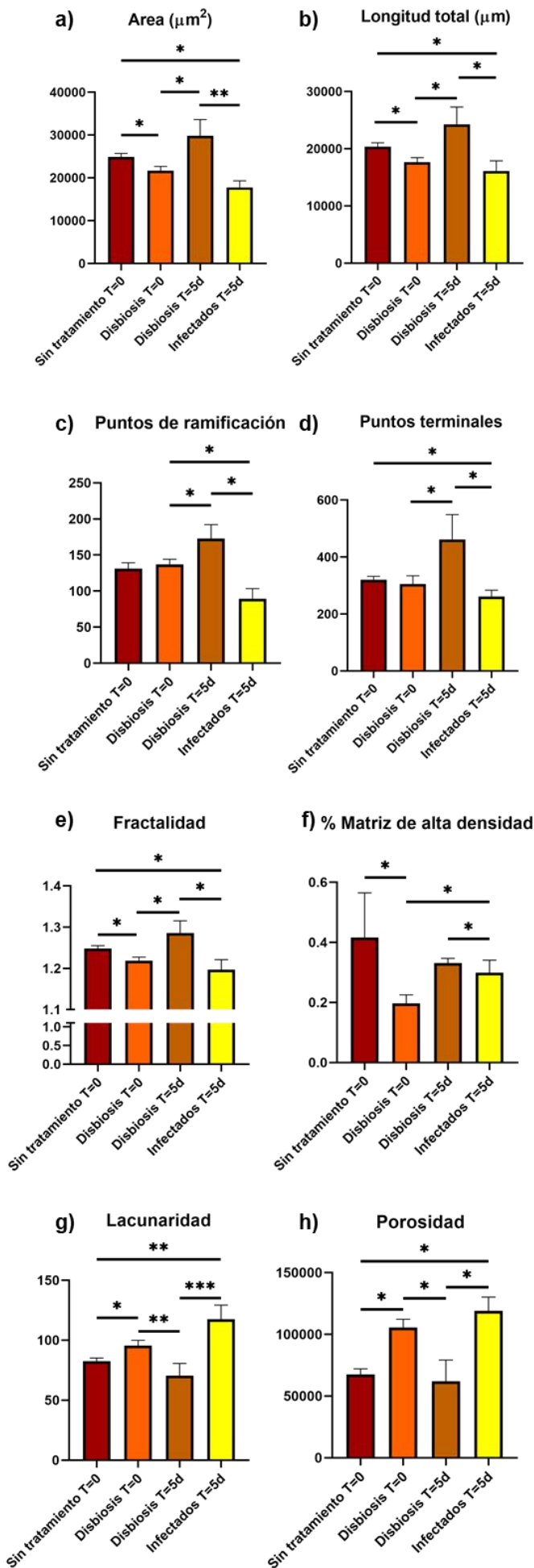


Figura 20. Análisis histológico del impacto de la disbiosis intestinal y de la infección por *C. difficile* en tejido pulmonar. Cortes de pulmón de ratones control, con disbiosis inicial, disbiosis a los 5 días post infección e infectados con *C. difficile* a los 5 días post infección fueron incluidos en parafina y se tiñeron con hematoxilina-eosina (H&E) para el análisis histológico mediante el macro TWOMBLI de ImageJ.

a) Área que ocupan los tabiques alveolares en la imagen **b)** Longitud total de los tabiques alveolares **c)** Número de puntos de ramificación en los tabiques alveolares **d)** Número de puntos extremos en los tabiques alveolares **e)** Dimensión fractal de los tabiques alveolares (medida de la auto-similitud y complejidad del tejido) **f)** Proporción de matriz de alta densidad (medida de la proporción de píxeles de una imagen que corresponden a los tabiques alveolares) **g)** Lacunaridad (medida del número y tamaño de los huecos y cómo los tabiques alveolares rellenan el espacio) **h)** Poros entre los tabiques alveolares. **i)** Micrografía representativa en donde se esquematizan los puntos de ramificación, puntos terminales y poros que interpreta el macro. Las barras representan la media \pm SEM.

ANOVA de 1 vía con post-test de Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

En conclusión, lo observado en nuestros modelos *in vitro* e *in vivo* muestra la relevancia del eje intestino-pulmón en la interacción *C. difficile*-*M. tuberculosis*, así como modificaciones a nivel tisular inducida por la disbiosis y la CDI. Aunque todavía se requieren más estudios, los resultados sugieren que *C. difficile* modula negativamente la expresión de SLAMF1 en los macrófagos, lo que podría estar implicado en la disminución de la endocitosis de *M. tuberculosis*. El estudio de la función de este receptor en el intestino podría contribuir a una mejor comprensión de los cambios observados en el pulmón. Asimismo, explorar modulaciones de metabolitos microbianos generadas por la disbiosis y la CDI y su impacto en las respuestas inmunológicas de los macrófagos podría ser un enfoque interesante para abordar la relevancia del eje intestino-pulmón en la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas para estas infecciones bacterianas.

DISCUSIÓN

Como fue mencionado previamente, si bien son numerosos los reportes acerca de la importancia de la CDI a nivel mundial, son muy poco los estudios acerca de la epidemiología de esta infección en nuestro país. Nuestros resultados mostraron que en la región del NOBA el 21,29% de los pacientes afectados por diarreas y síntomas gastrointestinales analizados entre 2019-2023 presentaban infección por *C. difficile*. Este porcentaje coincide con la incidencia reportada mundialmente, donde la CDI es la causa subyacente del 15 al 20% de diarreas asociadas al uso de antibióticos, que incluyen desde cuadros leves hasta la colitis pseudomembranosa ⁶.

Dentro de la población CDI+, el 80% de los pacientes resultó estar infectado con una cepa de carácter toxigénica. Esto es particularmente interesante, dado que la epidemiología de la CDI se ha mostrado cambiante en las últimas dos décadas, en primer lugar por la aparición de la cepa hipervirulenta NAP1/027 caracterizada por una alta producción de toxinas A y B ¹⁷⁷ y por su presencia de resistencia a las fluoroquinolonas ¹⁷⁸. La cepa 027 desató una epidemia de casos de CDI a principios de la década de los 2000, que generó una explosión en el número de casos intrahospitalarios, así como en la mortalidad, en Europa y América del Norte ¹⁷⁹. No obstante, en dichos países la incidencia de esta cepa hipervirulenta disminuyó en los últimos años ¹⁸⁰. En Estados Unidos, la implementación de test específicos de detección de ácidos nucleicos, y las medidas de prevención en entornos hospitalarios, tales como el lavado de manos o el aislamiento del paciente ¹⁸⁰, condujeron a la disminución de los casos reportados en entornos intrahospitalarios en un 6% en la última década ¹⁸¹. Asimismo, la incidencia de la cepa 027 se redujo a solo un 10% ¹⁸² dada la falta de presión selectiva por la restricción en la prescripción de fluoroquinolonas. En Europa también se ha observado un decaimiento en la incidencia de la cepa 027, debido, en parte a la reducción en el uso de las fluoroquinolonas ¹⁸³, aunado a los servicios de ribotipado nacionales que han mejorado la identificación de las cepas circulantes ¹⁸⁴.

En cuanto a las cepas de carácter no toxigénico, un estudio llevado a cabo en Corea reportó una incidencia del 19,5%, porcentaje que coincide con el obtenido en nuestro estudio. Estas cepas mostraron características clínicas diferenciales a las exhibidas por las toxigénicas, estando más relacionadas con los entornos comunitarios, pacientes diabéticos y consumo previo de antiácidos ¹⁸⁵.

Por lo tanto, es posible que en nuestra población bajo estudio, las buenas prácticas en el manejo de los pacientes con CDI en las instituciones de salud donde se realiza la detección de *C. difficile* haya derivado en que solo el 20% de los casos reportados fueran clasificados como adquiridos en ambientes intrahospitalarios.

Sin embargo, en los últimos años se ha observado un aumento de otras cepas asociadas a la comunidad y con pronósticos más reservados que la 027, reportándose a nivel mundial que los casos adquiridos en la comunidad se elevan por encima del 40% ¹⁸⁶. Por ejemplo, en Europa se ha incrementado la aparición de la cepa 078 y 014, ambas asociadas a entornos rurales y granjas de porcinos ¹⁸⁷, caracterizada por afectar a individuos jóvenes ¹⁴. Por su parte, en Estados Unidos, la cepa 106 ha ganado terreno, dado su habilidad de formar biofilms y colonizar entornos con facilidad, lo que la ha llevado a ser una de las cepas causantes de recurrencia con mayor facilidad ¹⁸⁸.

Otra de las preocupaciones que han surgido en cuanto a la epidemiología de la CDI, es el potencial de transmisión zoonótica que posee *C. difficile*. Recientemente se han encontrado los mismos ribotipos de *C. difficile* asociados con la CDI en una amplia gama de ambientes, animales y alimentos, por lo que se ha sugerido clasificarla como patógeno de transmisión alimentaria. Bolton y Marcos condujeron un meta-análisis en el que detectaron 43 ribotipos diferentes, incluyendo seis cepas hipervirulentas, en productos alimenticios cárnicos y vegetales.

Además, encontraron que existe un mayor riesgo de exposición a todos los ribotipos cuando se consumen mariscos o carne de cerdo, siendo esta última la principal vía de transmisión alimentaria para los ribotipos 027 y 078, las cepas hipervirulentas que causan la mayoría de las CDI ¹⁸⁹. En otro meta-análisis se evaluaron 17,148 muestras de comida desde 2009 hasta 2019 para evaluar la prevalencia de *C. difficile*, determinando que los mariscos presentaban el nivel más alto de contaminación (10,3%), seguido de aves de corral (6,2%) y carnes (5,6%), mientras que en los alimentos cocinados fue del 4% ¹⁹⁰.

En nuestro estudio, un 80% adquirió a *C. difficile* en un contexto comunitario, duplicando el porcentaje observado a nivel mundial. En una comunidad tan estrechamente asociada al sector agroganadero, con un sinfín de reservorios donde la bacteria puede establecerse, atendiendo al potencial zoonótico y de transmisión alimentaria de la CDI, y al hecho de que las esporas son difíciles de erradicar ya sea por medios químicos o físicos, consideramos que se debería poner especial atención en la detección de la bacteria en diversos entornos ambientales. De esta manera, se podrían evaluar los principales reservorios de *C. difficile* en la comunidad, y diseñar estrategias que minimicen el contacto de las y los pacientes potencialmente vulnerables con estas fuentes de alto riesgo.

En Sudamérica, la vigilancia epidemiológica molecular es escasa, e incluso inexistente, reportándose los ribotipos 027, 106, 012, 046, y 014/020 como los más frecuentes ¹⁴⁹. En Argentina, existe una única caracterización molecular descrita hasta el momento, en la cual se identificó a la cepa ST1 (asociada a la NAP1/027) como la de mayor circulación en los aislamientos obtenidos en entornos hospitalarios ²⁵. Si bien en nuestro estudio en particular no se llevó a cabo una identificación de las cepas que están en circulación en la región sanitaria III, sí podemos considerar que la epidemiología en el NOBA se ajusta a las tendencias globales.

Con la identificación de las cepas predominantes en la comunidad, las políticas de vigilancia de CDI se podrían enfocar con una mayor eficacia a la resolución de las necesidades locales. Por lo tanto, este será un próximo objetivo derivado del presente trabajo.

Al analizar la frecuencia de casos de CDI anualmente, encontramos que esta oscila alrededor del 20% durante los 5 años que comprenden este estudio retrospectivo, a excepción del año 2020, en el cual se duplica el porcentaje de pacientes CDI+. Durante el mencionado año se desató la pandemia por COVID-19, causada por el Coronavirus de tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2) ¹⁹¹.

Consideramos que el escenario desencadenado durante la pandemia pudo contribuir con el incremento de la frecuencia de la CDI en el NOBA. Inicialmente durante la pandemia, mientras todavía se investigaban los tratamientos potenciales, hubo un uso generalizado de antibióticos, incluso de aquellos que se relacionan con un mayor riesgo de CDI (como lincosaminas, monobactámicos y cefalosporinas), especialmente en pacientes hospitalizados ¹⁹²⁻¹⁹⁵. Adicionalmente, se ha demostrado que el número de visitas a los servicios de urgencias que condujeron a ingresos hospitalarios también se vieron aumentadas, lo que devino en unidades hospitalarias totalmente desbordadas que podían contribuir al aumento en la CDI ^{196,197}.

No obstante, datos recopilados desde finales de enero de 2019 hasta septiembre de 2021 indican una disminución en la incidencia de la CDI adquirida en entornos intrahospitalarios durante la pandemia del COVID-19 ¹⁹⁸⁻²⁰¹. Probablemente la utilización de elementos de barrera, higienización de manos, elementos de protección personal, desinfección de los entornos hospitalarios y el aislamiento de los pacientes haya contribuido indirectamente a la prevención de la transmisión de la CDI, a pesar del uso preventivo de antibióticos ^{202,203}.

Por otro lado, no hay que desechar la hipótesis de que la frecuencia de la CDI podría haberse visto impactada por la disminución en el número de testeos, hecho que se corroboró en múltiples estudios que evaluaron las primeras etapas de la pandemia ²⁰⁴⁻²⁰⁶. Asimismo, es importante considerar que la pandemia por COVID-19 pudo haber subestimado el diagnóstico de la CDI, dado que el SARS-CoV-2 causa con frecuencia síntomas gastrointestinales similares a *C. difficile* que incluyen náuseas, vómitos y diarrea ²⁰⁷. Esto podría haber generado falta de sospecha clínica de CDI en pacientes con COVID-19 ^{95,208}.

Por lo anterior, no debemos descartar que el incremento registrado durante el 2020 en los casos CDI+ en la Región Sanitaria III se debieron a un sesgo en el número de muestras enviadas por las instituciones de salud que, colapsadas por el avance de la pandemia, priorizaban testear a pacientes con un alto grado de sospecha de CDI.

Por otro lado, en cuanto a los factores de riesgo que predisponen la adquisición de la CDI en el NOBA, encontramos que la edad avanzada, con un punto de corte establecido en los 67 años; el consumo previo de antibióticos, el haber sufrido una hospitalización previa y el haberse infectado con *C. difficile* con anterioridad son factores de riesgo probables para la CDI. Ni el sexo biológico, el consumo previo de PPI o la presencia de comorbilidades arrojaron diferencias significativas entre ambas poblaciones de pacientes. Asimismo, las y los pacientes con infección por *C. difficile* presentaban un recuento leucocitario y plaquetario aumentado, así como una concentración elevada de urea; mientras que la población periférica de basófilos se encontraba disminuida. Al comparar los datos que obtuvimos con 40 estudios seleccionados mediante la metodología de meta-análisis hallamos que a nivel global la edad avanzada, el consumo previo de antibióticos y la hospitalización previa coincidían como predictores de riesgo de CDI para la población del NOBA. Además, el consumo de PPI de manera previa tampoco se posicionó como un factor de riesgo en el meta-análisis.

De igual manera que en nuestro estudio, el meta-análisis mostró que los pacientes CDI+ presentaban aumentado su recuento leucocitario, no así el plaquetario. No obstante, el meta-análisis determinó que a nivel global la presencia de comorbilidades tales como enfermedades cardíacas y enfermedad renal crónica, podrían ser posibles predictores de riesgo de la CDI, a diferencia de lo observado en el NOBA. Curiosamente, se dio la aparición del sexo femenino como predictor de riesgo a nivel global. Por último, si bien haber tenido CDI es un factor de riesgo notablemente reportado a nivel mundial, como se confirmó en la población de pacientes del NOBA; en el meta-análisis no se reportó como un factor de riesgo significativo.

En cuanto a la edad avanzada como factor de riesgo, los pacientes añosos cuentan con una probabilidad mayor de recibir antibióticos de amplio espectro, de ser hospitalizados y permanecer más tiempo en el entorno hospitalario en parte por la presencia de comorbilidades ^{209,210}. Además, estos pacientes tienen una mayor incidencia de infección inicial y recurrente, con una probabilidad aumentada de agravamiento del pronóstico, y una tasa de mortalidad mayor ²¹¹⁻²¹³. Asimismo, en los pacientes de edad avanzada hospitalizados, la incidencia de CDI es de 5 a 10 veces más alta que la incidencia en pacientes más jóvenes ²¹¹. Además, se ha descrito que los pacientes de edad avanzada en UTI tienen un 68% más de probabilidades de experimentar mortalidad a 30 días que los pacientes más jóvenes ²¹⁴. Más aun, los residentes de instituciones de salud para el cuidado del adulto mayor corren un mayor riesgo, dado que comparten habitaciones y baños cercanos, además de la dificultad de aislar a los infectados en habitaciones privadas ²¹¹. En nuestro estudio, el 15% de los pacientes CDI positivos provenían de este tipo de establecimientos. También es necesario considerar que con la edad el sistema inmune disminuye sus funciones, lo que podría impactar en la resolución de la CDI. Se ha observado que neutrófilos de pacientes de edad avanzada ven reducida su capacidad para eliminar a *C. difficile*, en comparación con pacientes jóvenes ²¹⁵.

Asimismo se ha sugerido que la IgG sérica contra las toxinas de *C. difficile* parece disminuir su eficacia como así también el suero para la neutralización de las toxinas de *C. difficile* ²¹⁵.

En cuanto al sexo biológico, dentro de los estudios incluidos en nuestro meta-análisis, solo 6 de 40 se mostraron asociados al sexo femenino como predictor de riesgo ^{153,154,172,174,176,216}. No obstante, existen algunos breves reportes que mencionan que las pacientes femeninas constituyen una población de riesgo para la CDI. En un estudio retrospectivo llevado a cabo en Alemania entre 2013 y 2019, se encontró que durante esos 5 años, la incidencia de la CDI era mayor en pacientes femeninas ²¹⁷. Por otra parte, en pacientes que se recuperaban de una cistectomía y se infectaron con *C. difficile*, el sexo femenino surgió como uno de los factores de riesgo con mayor OR (1,752) ²¹⁸. Asimismo, existen reportes que mencionan al género femenino como un factor asociado a la recurrencia de la CDI ²¹⁹. Así, en lo que respecta al sexo biológico es claro que no existe un consenso establecido y que se necesitan más estudios.

El consumo previo de antibióticos se relaciona directamente con el estado de disbiosis que posibilita la colonización de *C. difficile*, siendo el principal factor de riesgo para la CDI ^{220,221}. Si bien todos los antibióticos tienen el potencial de promover la CDI, algunos alteran el microbioma intestinal en mayor medida que otros ²²²; tales como la clindamicina, las penicilinas de amplio espectro (principalmente amoxicilina/clavulánico o la piperacilina/tazobactam), las cefalosporinas y las fluoroquinolonas ^{220,223}. Al desglosar el consumo de antibióticos, observamos que las penicilinas (amoxicilina/clavulánico, piperacilina/tazobactam, ampicilina/sulbactam) habían sido consumidas previamente por un 56,52% de los pacientes CDI+ del NOBA. También se ha reportado que cuanto mayor es la duración de la terapia antibiótica y el número de antibióticos administrados, mayor será la probabilidad de adquirir una infección por *C. difficile* ²²³.

Seguendo esta línea, se ha estimado que el riesgo de adquirir la CDI es de 8 a 10 veces mayor durante la terapia antibiótica, e incluso luego de tres meses de la culminación de la misma, siendo el primer mes el de mayor riesgo ²²⁴.

Existe una ardua discusión en cuanto a considerar o no los PPI como factores de riesgo. Ciertos estudios apoyan la hipótesis de que la terapia con PPI podría ocasionar cambios en la composición del microbioma intestinal, desencadenando efectos adversos en el largo plazo ^{225,226}. Esta hipótesis plantea que los pacientes que consumieron PPI tienen alterada su microbiota al suprimir la producción de ácido gástrico, lo que ocasionaría la disminución de esta barrera en la eliminación de patógenos en el estómago, permitiendo el establecimiento de *C. difficile* que, además, puede sobrevivir a la exposición al contenido gástrico ²²⁷. Un meta-análisis informó un aumento del 65% en la incidencia de la CDI entre los pacientes que tomaban PPI ²²⁸ y, en otro estudio, se halló un OR de 1,74 para la aparición de CDI en quienes utilizaron previamente PPI ²²⁹. Además, existen pruebas que indican que los PPI disminuyen la producción de oxígeno reactivo y la actividad bactericida de los neutrófilos ²³⁰ reduciendo la expresión de citoquinas proinflamatorias ²³¹. Por último, algunos estudios muestran que, entre los pacientes hospitalizados, alrededor del 40-71,4%, recibe terapia con PPI durante la hospitalización ²³²⁻²³⁴.

Si bien los estudios que analizan la microbiota en el contexto del consumo de PPI son interesantes, se basan principalmente en la evaluación del microbioma en la saliva, el jugo gástrico o las heces. Por lo tanto, no reflejan necesariamente lo que ocurre en el intestino. Teniendo en cuenta los efectos de los PPI reportados a nivel del microbioma e incluso de la respuesta inmune, se podría especular que el impacto de los mismos podría estar a nivel de la resolución de la CDI. De esta manera, es posible que en el NOBA el consumo previo de PPI no sea un factor de riesgo predisponente a considerar, lo que también se sustenta por la tendencia global obtenida mediante el meta-análisis, donde se demostró que no existiría asociación entre la CDI y el consumo previo de estos fármacos.

Por su parte, el haber tenido contacto con el ambiente hospitalario se asoció con una mayor probabilidad de adquirir CDI. Pacientes con estancias prolongadas en los hospitales o que son frecuentemente hospitalizados constituyen una población de riesgo para la CDI. Dada su capacidad de esporulación, y su resistencia ambiental a la resequedad, temperatura y a la mayoría de los desinfectantes, *C. difficile* puede persistir en las superficies por meses, y los pacientes hospitalizados pueden infectarse directamente o indirectamente por las manos del personal de salud que mantuvo contacto con pacientes portadores de CDI ^{235,236}.

El haberse infectado con *C. difficile* con anterioridad es un factor de riesgo que predispone a contraer nuevamente la infección por este patógeno. Si bien los datos sobre episodios previos de CDI como factor de riesgo fueron inconsistentes, según la Sociedad Europea de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas ²³⁷, dos estudios de carácter prospectivo de mayor calidad reportaron una clara asociación entre la infección previa y un episodio posterior de CDI ^{238,239}. Además, ensayos realizados con fidaxomicina (antibiótico macrocíclico) y bezlotoxuman (anticuerpo monoclonal) muestran tasas mayores de recurrencias en pacientes con un episodio previo de CDI ²³⁷. Consideramos que en nuestra población de estudio los datos sobre episodios previos pueden estar sub-representados, dado que no es habitual el testeo de *C. difficile* hasta no sospechar la presencia del patógeno o haber descartado antes otras causas probables. Además, dicho testeo tampoco se encuentra estandarizado ni se realiza de manera rutinaria en las instituciones de salud del país. En nuestro meta-análisis, la CDI previa no fue un parámetro significativo; lo que podría atribuirse a que solo 4 de los 40 estudios incluidos aportaban este tipo de datos ^{153,160,173,184}. No obstante, al observar con detalle el Forest Plot para esta variable, los trabajos mantienen la misma tendencia al considerar la CDI previa como factor de riesgo que la observada en nuestro estudio epidemiológico.

Por otro lado, presentar múltiples comorbilidades ha sido extensamente reportado como una condición que facilita la colonización e infección por parte de *C. difficile* ²³⁷. Existen enfoques de meta-análisis que han investigado cuáles comorbilidades confieren un mayor riesgo y se encontró que la enfermedad inflamatoria intestinal, diabetes, leucemia o linfoma, insuficiencia renal y cáncer sólidos ²⁴⁰, entre una amplia gama de otras comorbilidades, están implicadas como afecciones de mayor riesgo.

Consideramos que en nuestro estudio la ausencia de significancia estadística en el parámetro comorbilidades previas entre las dos poblaciones de pacientes (CDI+ vs. CDI-) puede estar mayormente relacionada al hecho de que un 65,71% de los pacientes CDI+ adquirieron la infección en la comunidad.

Podría llamar la atención el hecho de no incluir a la TB como predictor de riesgo de la CDI en nuestro meta-análisis, más aún siendo que el enfoque de este TFG se enmarca en el contexto del eje intestino pulmón frente a la CDI y la TB. Sin embargo, la existencia de TB previa solo se reportó en 1 de los 40 estudios seleccionados para el meta-análisis. Rajabally y col. (2013) determinaron que la TB era un factor de riesgo para la CDI, siendo dos veces mayor la probabilidad de infectarse con *C. difficile* para los pacientes con TB en Sudáfrica ¹⁶⁷. Además, en nuestra cohorte, solo contamos con 2 pacientes que presentaron TB previa, ambos con resultado negativo para la CDI.

Como han destacado ciertos estudios, un recuento elevado de glóbulos blancos (GB) se observa con frecuencia en el contexto de la CDI. En una cohorte de 60 pacientes con leucocitosis, 35 (58%) tuvieron pruebas positivas para la toxina B de *C. difficile*, a pesar de la ausencia de diarrea o de presentar síntomas leves ²⁴¹. En otro estudio con 400 pacientes hospitalizados, se identificó a la CDI en 34 (8%) pacientes que tenían un recuento de glóbulos blancos superior a 15 000/ μ L y una proporción mayor (25%) de pacientes con un recuento de glóbulos blancos superior a 30 000/ μ L ²⁴².

Por otra parte, una comparación de 35 pacientes hospitalizados con diarrea identificó una media significativamente mayor de GB (15 800 vs 7700/ μ L) en pacientes con pruebas de laboratorio positivas para *C. difficile* ²⁴³. Sin embargo, poco se ha explorado el utilizar el recuento leucocitario elevado como predictor de la CDI. En este sentido, coincidimos con el trabajo de Vargas y col. 2017 ²⁴⁴ en que el recuento total de leucocitos por sí solo no es un indicador específico para la infección por *C. difficile*. Por otra parte, hasta el momento no existen reportes acerca del rol de los basófilos en la CDI. En nuestra cohorte hemos observado que los pacientes tienen la población de basófilos disminuida, por lo cual sería interesante indagar el rol que cumplen estas células frente a *C. difficile*.

Las plaquetas han despertado un gran interés en los últimos años al mostrarse como participantes clave en numerosos procesos inmunológicos. Más allá de sus funciones centrales en la trombosis y la hemostasia, las plaquetas desempeñan múltiples papeles en la defensa del hospedador contra las infecciones, interactuando con diferentes microorganismos y mostrando a su vez propiedades antimicrobianas ²⁴⁵⁻²⁴⁷. Trabajos previos que evaluaron el recuento plaquetario en episodios de CDI informaron resultados controvertidos, asignándoles tanto un papel beneficioso como perjudicial en relación con los síntomas clínicos ²⁴⁸⁻²⁵⁷. En la población de pacientes del NOBA encontramos que los pacientes CDI positivos presentaron un elevado recuento plaquetario. Si bien en el meta-análisis no se obtuvo significancia estadística que apoye a la trombocitosis como factor de riesgo para la CDI, consideramos que el número de estudios que reportaban esta información no fue suficiente (solo 2 a nivel global) ^{166,258}. Estos trabajos muestran una tendencia similar a la de nuestra población de estudio en lo que al recuento de plaquetas se refiere. Más aun, recientemente nuestro grupo ha demostrado que *C. difficile* induce el establecimiento de complejos monocitos-plaquetas ⁶⁷ y que las plaquetas también favorecen la captación de *C. difficile* mediada por macrófagos humanos.

Por lo tanto, consideramos que el rol de las plaquetas en la CDI podría ser importante para la resolución de la infección, y que los resultados obtenidos a nivel local y global, nos instan a seguir ahondando en los mecanismos que subyacen la relación plaquetas - *C. difficile*.

Teniendo en cuenta todos nuestros resultados, además de los factores de riesgo típicamente asociados a las CDI, consideramos que sería interesante indagar la utilización del recuento leucocitario, plaquetario y de basófilos como posibles predictores de riesgo a nivel periférico. De esta manera, además, se podría tener un panorama más preciso de la respuesta inmune generada por los pacientes frente a *C. difficile*.

Por otro lado, en este trabajo evaluamos el eje intestino-pulmón y la interacción entre *C. difficile* y *M. tuberculosis*, en lo que respecta específicamente a la respuesta de los MΦ. Al estudiar las características morfológicas y la capacidad endocítica de los MΦ entrenados con *C. difficile* (CDH) frente a *M. tuberculosis* (WCMtb), logramos determinar en primera instancia la supervivencia de los MΦ durante 7 días de cultivo sin la necesidad de renovar el medio de cultivo o añadir factores de crecimiento adicionales, cinética que no se había realizado hasta el momento en el laboratorio. Si bien confirmamos que la viabilidad de los MΦ a los siete días se mantenía en un 90%, no descartamos que el número de células muertas fuera en aumento con el correr de los días, y estas fueran eliminadas con los posteriores lavados durante el procesamiento o fagocitadas por los MΦ restantes. Asimismo, debemos mencionar que a partir del día 7 los MΦ muestran evidentes cambios citoplasmáticos y una ligera acidificación del medio de cultivo; por lo que tiempos más extendidos tal vez requieran renovaciones de nutrientes. Uno de los interrogantes que aún nos queda por resolver, es la caracterización de los MΦ de acuerdo al perfil (proinflamatorio, antiinflamatorio o regulatorio) que adoptan en este modelo de cultivo *in vitro*.

Seguidamente, y considerando la relevancia de los MΦ en la TB, analizamos la capacidad endocítica de los fagocitos frente a *M. tuberculosis* luego de que hayan sido entrenados o no con *C. difficile*. Según la cinética evaluada, la endocitosis frente a WCMtb disminuye hacia el segundo día, y a partir de ese momento aumenta, hecho que pudimos comprobar tanto por citometría de flujo como por microscopia de fluorescencia. Dado que esta aparente disminución sucedió tanto en ausencia o presencia de *C. difficile*, es probable que los MΦ experimenten un periodo de “hermetismo” a la endocitosis de WCMtb a las 48 h debido a algún mecanismo de diferenciación y/o perfilación de las células. Además, los altos niveles de endocitosis observados al primer día podrían relacionarse a la reciente transición monocito-macrófago. Los monocitos son altamente receptivos a los patógenos y presentan altas tasas de endocitosis, la cual disminuye a medida que se diferencian a MΦ.

A su vez, pudimos confirmar que la presencia extracelular o no de *C. difficile* no modula la internalización de *M. tuberculosis*, al menos durante 1 h de estímulo con WCMtb. Sin embargo, mediante microscopia de fluorescencia, observamos que con un estímulo prolongado de WCMtb por 24 h, *C. difficile* es capaz de inhibir la endocitosis de *M. tuberculosis* por parte de los MΦ.

Por otro lado, al observar el porcentaje de MΦ que internalizaron CDH, determinamos que se mantiene estable y alrededor de un 50% en todos los tiempos evaluados. Es decir que una mayor exposición de los MΦ a *C. difficile* no se traduce en un aumento del potencial endocítico. No obstante, al evaluar las células estimuladas por 5 días, detectamos una mayor intensidad de fluorescencia en comparación al resto de los tiempos, indicando un incremento en la capacidad individual de cada MΦ para internalizar a *C. difficile*.

Al evaluar el porcentaje de MΦ que endocitaron ambas bacterias, observamos que se mantuvo entre un 10 a 20%. Esto podría indicar que los MΦ presentan “preferencias” por alguno de los bacilos o algún mecanismo excluyente que favorezca la internalización de *M. tuberculosis* o de *C. difficile* en particular. Cuando establecimos la relación de MΦ que prefirieron endocitar únicamente a *M. tuberculosis*, notamos que con el avance de los días las células prefieren endocitar exclusivamente a *M. tuberculosis*. Al día 1, ¼ del total de MΦ que endocitaron WCMtb fueron exclusivos para *M. tuberculosis*, mientras que al séptimo día este porcentaje había aumentado a casi un 80%.

Teniendo en cuenta todos los resultados anteriores, consideramos que los MΦ sufrirían un periodo endocítico de “letargo” a las 48 h y que transcurrido ese tiempo se perfilan hacia la internalización de un tipo en particular de bacteria. Por ende, aquellos MΦ que interaccionaron durante tiempos prolongados y lograron endocitar a *C. difficile*, restringieron su capacidad endocítica para *M. tuberculosis*. El remanente de MΦ que no internalizó al bacilo Gram positivo se especializó en la captación de *M. tuberculosis*.

Una particularidad que observamos en los ensayos de microscopía es que *C. difficile* permanece en el interior de los MΦ sin degradarse incluso luego de 7 días de cultivo. Este es un dato que no había sido reportado hasta el momento y que nos permite pensar en mecanismos de evasión por parte de la bacteria vegetativa. En línea con nuestros resultados, la resistencia intracelular de las esporas de *C. difficile* ha sido demostrada en la línea celular macrofágica Raw 264.7⁶⁵, así como también en células epiteliales intestinales²⁵⁹. Esto también nos permite pensar que los MΦ que han endocitado a CDH evitan la internalización de WCMtb con el fin de enfocarse en promover mecanismos que permitan la eliminación de *C. difficile*. Un hecho que apoya esta idea se observa en las micrografías, donde los MΦ que endocitaron a *C. difficile* se muestran aislados del resto de células. No obstante, más estudios son requeridos para confirmar esta hipótesis.

Otro hecho que observamos fue que los MΦ expuestos a *M. tuberculosis* y que interaccionaron con esta bacteria tendieron a aglomerarse entre sí, presentando uniones entre sus filopodios. Este agrupamiento de células podría asemejarse a lo que sucede fisiológicamente durante la formación del granuloma. De hecho, existen numerosos estudios que reportan la formación de granulomas *in vitro*. Crouser y col., desarrollaron un modelo *in vitro* utilizando células mononucleares de pacientes con TB latente o dadores sanos y un derivado proteico purificado de tuberculina ²⁶⁰. Berry y col., demostraron la formación de granulomas *in vitro* utilizando también células mononucleares y BCG dentro una solución con colágeno, el cual validaron funcionalmente ²⁶¹. A su vez, las interconexiones citoplasmáticas que observamos podrían constituir nanotúbulos de tunelización (TNT), los cuales son proyecciones transitorias de membrana que facilitan la comunicación intercelular para permitir la transferencia de vesículas, flujos de calcio y patógenos ^{262–265}. Estos se dividen en TNT “finos”, formados principalmente por F-Actina y microtúbulos ²⁶⁶, y TNT “gruesos”, que se distinguen por la transferencia de orgánulos, tales como lisosomas y mitocondrias ^{264,267,268}. Se ha demostrado que los micro-ambientes asociados a la TB estimulan la formación de estos TNT, y que esto depende del eje IL-10/STAT3 ²⁶⁶. Además, en el contexto tuberculoso, Souriant y col., demostraron a través de la utilización de transwells, que los macrófagos asociados a micro-ambientes tuberculosos eran capaces de infectar con VIH a macrófagos no infectados, mediante un mecanismo en el que participaban los TNT ²⁶⁶. Un objetivo futuro que se desprende de este TFG es determinar la funcionalidad de estas estructuras e indagar el motivo por el cual *C. difficile* impediría la formación de los mismos interrumpiendo la comunicación entre MΦ.

En cuanto a la expresión del receptor SLAMF1 (que es capaz de reconocer a *M. tuberculosis*), logramos determinar que existe un pico de expresión en la superficie de los MΦ al quinto día, que disminuye en presencia de *C. difficile*. Asimismo, nuestros resultados indican que al segundo día se obtiene el menor nivel de expresión de este receptor; curiosamente al mismo tiempo en que detectamos la menor endocitosis de WCMtb.

Anteriormente nuestro grupo había demostrado que la expresión SLAMF1 no era modulada por CDH (datos no publicados), a diferencia del sonicado de *M. tuberculosis* que sí es capaz de inducir la expresión en la superficie e intracelular del receptor con 24 h de estimulación. En el presente trabajo se demostró por primera vez que WCMtb también es capaz de aumentar la expresión en superficie de SLAMF1 en MΦ humanos. Además, al pre-entrenar o no a los MΦ durante 5 días, y luego enfrentarlos durante 24 h a WCMtb, confirmamos que la presencia de *C. difficile* inhibe la expresión de SLAMF1. La elección de 5 días de entrenamiento previo con *C. difficile* se debió a que observamos que a ese tiempo se obtenía la mayor expresión de SLAMF1.

Mediante microscopia de fluorescencia pudimos confirmar que efectivamente WCMtb co-localiza con SLAMF1, mientras que no interacciona con *C. difficile*. Además, pudimos observar que en las células que habían internalizado a WCMtb, SLAMF1 se encontraba expresado de manera perinuclear en grandes focos. La concentración perinuclear podría deberse en parte a que, al ser una molécula destinada a la superficie celular, necesita ser sintetizada en el retículo endoplasmático rugoso, organela contigua al núcleo.

En cuanto al mecanismo de inhibición *per se* de SLAMF1 mediado por *C. difficile*, debemos recordar que SLAMF1 tiene la capacidad de sintetizarse y almacenarse en vesículas de reciclaje²⁶⁹, por lo tanto, uno de los interrogantes que nos restan por dilucidar es si *C. difficile* inhibe directamente la expresión de SLAMF1 o si por el contrario inhibe el tráfico de estas vesículas.

No obstante, creemos que la opción más plausible es que algún componente de *C. difficile* inhiba directamente la expresión de SLAMF1 ya que la disminución de SLAMF1 se dio tanto a nivel de la membrana (citometría de flujo) como a nivel del citoplasma (microscopia de fluorescencia). Además, la inhibición de SLAMF1 por *C. difficile* podría explicar el por qué las células que endocitaron dicha bacteria vieron reducida su capacidad de endocitar a *M. tuberculosis*.

El hecho de que *C. difficile* sea capaz de inhibir la expresión de SLAMF1 no solo impacta en su rol inmunoprotector frente a *M. tuberculosis*, sino que también podría tener un efecto a nivel local en el intestino. Como fue mencionado, esta molécula activadora de señales es importante para el establecimiento de la respuesta inmune frente a diversos patógenos y se ha mostrado su relevancia en patologías intestinales. Al respecto, pacientes con enfermedad de Crohn presentan un elevado número de monocitos, macrófagos y otras células SLAMF1+ ¹³², mientras que por otra parte, Van Driel y colaboradores han sugerido que SLAMF1 podría regular la homeostasis de los macrófagos durante episodios de enterocolitis crónica o aguda ¹³³. Además, Wang y colaboradores han reportado que SLAMF1, junto con SLAMF8, modulan la migración de células dendríticas (CDs) y macrófagos hacia el intestino inflamado ¹³⁴. Sin embargo, el rol de SLAMF1 en el contexto de la CDI permanece inexplorado. Para desentrañar la importancia de esta molécula en el sitio primario de infección, futuros ensayos serán llevados a cabo en un modelo *in vivo*.

Finalmente, queremos destacar que en este trabajo pudimos explorar un modelo *in vitro* para el estudio de la relación *C. difficile*-*M. tuberculosis*-MΦ en el contexto eje intestino pulmón. El eje intestino pulmón plantea una vía de comunicación bidireccional, en donde lo que esté ocurriendo a nivel intestino impacta a nivel pulmón, y viceversa. Se ha demostrado que durante la infección por *C. difficile*, las toxinas A y B pueden translocarse a la circulación, y actuar a nivel periférico, generando un considerable compendio de síntomas sistémicos mortales ²⁷⁰.

A nivel respiratorio, existen reportes de que la CDI es capaz de ocasionar desde derrames pleurales hasta el síndrome de dificultad respiratoria aguda ^{271,272}. Dado que nuestros experimentos se realizaron con CDH, consideramos que el/los mecanismo/s que desencadena *C. difficile* que impiden la expresión de SLAMF1 así como la endocitosis de *M. tuberculosis* son independientes de la presencia de toxinas. Probablemente, estas modulaciones sean inducidas por antígenos que se expresan tanto en bacterias vivas como muertas, que además tengan la capacidad de translocarse a la circulación sistémica e impactar en sitios distales, modificando así la respuesta efectuada por los monocitos circulantes y los MΦ que se enfrenten a *M. tuberculosis*. Estas hipótesis aún deben ser comprobadas y es por ello que también pretendemos utilizar un modelo *in vivo* de CDI.

Para comenzar con los estudios *in vivo*, en primer lugar, decidimos evaluar cómo la disbiosis y posterior colonización del intestino por *C. difficile* impactan a nivel tisular, tanto en el foco de infección como en los pulmones. Para ello utilizamos un modelo murino de disbiosis mediante un *cocktail* de antibióticos e infección por *C. difficile* puesto a punto previamente en nuestro laboratorio.

En primer lugar, confirmamos que la disbiosis genera un mayor score histopatológico en el intestino en todos los tiempos evaluados (T = 0, T = 2d, T = 5d y T = 8d) en comparación con el grupo control (ratones sin tratamiento). Este daño se agudiza particularmente en el colon en presencia de *C. difficile* al día 2 post-infección, tiempo en el cual se detecta el mayor nivel de deterioro. Si bien el score histopatológico permanece elevado en los días 5 y 8, no presenta diferencias respecto a las condiciones pareadas de disbiosis, lo cual sugiere que los ratones comienzan a recuperarse de la infección hacia el día 8. Esto además indica que la disbiosis inducida por los antibióticos genera modificaciones en la estructura del ciego y del colon que se mantienen hasta, al menos, el día 8.

Interesantemente, además del daño caracterizado por la infiltración de células inflamatorias y el edema de la submucosa, también observamos la presencia de nódulos linfáticos; los cuales comenzaron a formarse en el segundo día post-infección, y continuaron aumentando no solo en número sino también en tamaño con el correr de los días.

Algunos estudios concuerdan con nuestros resultados. Wolfe y col. observaron que los ratones que experimentaban CDI desarrollaron scores clínicos considerablemente altos después del primer día post-infección, manteniendo un puntaje máximo hasta los días 3 y 4 días post-infección. Además, al segundo día mostraron puntajes clínicos significativamente más altos que los ratones control y los ratones tratados con antibióticos²⁷³. Por otra parte, Zhou y col. hallaron que al tercer día post-infección con *C. difficile* los ratones empezaban a recuperarse de la pérdida de peso y de la sintomatología clínica, mientras que sus tejidos aún mostraban una inflamación de leve a moderada²⁷⁴. Asimismo, Pawlowski y col., determinaron que los ratones infectados con la cepa BI/NAP1 de *C. difficile* presentaban scores histológicos superiores que los ratones controles, evidenciado por la ulceración en ciego y colon, así como por la pérdida de la arquitectura mucosa, exfoliación epitelial, infiltración de células inflamatorias, edema y hemorragia en la lámina propia²⁷⁵.

En cuanto al análisis de los pulmones, encontramos diferencias estructurales ocasionadas por la disbiosis intestinal y por la infección por *C. difficile*. Cabe destacar que es la primera vez que se utiliza el macro TWOMBLI para detectar patrones de tejido en nuestro laboratorio, habiéndose realizado su puesta a punta íntegramente en el presente TFG. Se compararon, además de la condición control (sin tratamiento), dos momentos en específico: la disbiosis al tiempo 0 (post-inyección de clindamicina) y el quinto día post-infección y post-disbiosis.

Teniendo en cuenta la cinética observada en el intestino, comenzamos con los estudios del pulmón al quinto día dado que consideramos que sería un tiempo prudencial en el cual pudieran observarse efectos en sitios distantes al foco de infección. En próximos ensayos incluiremos los tiempos restantes evaluados para el intestino (2 y 8 días).

Según nuestros resultados, la disbiosis intestinal inicial (T = 0) altera la estructura pulmonar, generando un parénquima desorganizado, con mayor espacio alveolar, y con presumible daño en las paredes alveolares que interrumpe la conexión entre los mismos. Estos cambios estructurales se revierten hacia el día 5 post-disbiosis, sugiriendo la aparición de mecanismos de reparación que favorecerían la recuperación del parénquima pulmonar. Sin embargo, esta recuperación no ocurre en presencia de la infección por *C. difficile*, sino que los pulmones mantienen el nivel de daño tisular causado por la disbiosis inicial. Los mecanismos subyacentes que regulan las modificaciones a nivel pulmonar requieren más y nuevos estudios. En este sentido, las toxinas A y B de *C. difficile* pueden diseminarse sistémicamente ²⁷⁶. Además, ha sido postulado que las toxinas pueden actuar a nivel periférico causando el síndrome fatal de disfunción multiorgánica ²⁷⁰ y a nivel respiratorio induciendo derrames pleurales o el síndrome de dificultad respiratoria aguda ^{271,272}. Estos reportes refuerzan nuestra hipótesis acerca del accionar de la disbiosis y de la CDI sobre la modulación de la respuesta inmune en el pulmón.

Por otro lado, los mecanismos que impactan sobre el pulmón podrían estar inducidos por las modificaciones en la composición de la microbiota. De hecho, Wypych y col. propusieron dos formas de comunicación del eje intestino pulmón: I) efectos directos de la microbiota intestinal, como por ejemplo la presencia de peptidoglicano y LPS como potenciadores de la respuesta inmunitaria del hospedador, II) efectos indirectos de la microbiota intestinal, como por ejemplo mediante la circulación de AGCC no metabolizados que afectan el desarrollo de las células inmunes o la migración de estas células desde el intestino al pulmón donde influirían en la actividad pulmonar ²⁷⁷.

Los AGCC son considerados inmunomoduladores ya que pueden prevenir la transcripción de mediadores proinflamatorios. En particular, el butirato es una fuente de energía para las células epiteliales intestinales, promoviendo así la integridad de la barrera intestinal ²⁷⁸. Interesantemente, una disminución de las bacterias productoras de butirato es una característica de la disbiosis intestinal en la IBD ²⁷⁹. El rol modulador de los AGCC también ha quedado demostrado en estudios como el de Liu y col. ²⁸⁰, donde observaron que metabolitos derivados del intestino existen en cantidades variables dentro del tejido pulmonar humano y, utilizando ratones libres de gérmenes, confirmaron que los niveles de AGCC en el pulmón dependían de un microbioma intestinal funcionalmente intacto. Más aun, demostraron que el LPS y el propionato reprogramaban profundamente el metabolismo de los macrófagos alveolares pulmonares, especialmente en el contexto de estrés metabólico. Por otra parte, demostraron también que los receptores de AGCC, específicamente el FFAR2 y FFAR3, se expresaban tanto *in vitro* como *in vivo* en los macrófagos alveolares, y en las células epiteliales de tipo 2 alveolares humanas y murinas. Por último, definieron el concepto de tono inmune dinámico en los pulmones, el cual se define por factores clave que incluyen la expresión basal del ARNm de IL-1 β , los niveles de LPS y AGCC en el pulmón, y la expresión de receptores de estos metabolitos como el FFAR2 y el FFAR3 ²⁸¹. Dado que estos metabolitos están fuertemente influenciados por la composición del microbioma intestinal, podrían ser uno de los mecanismos responsables de los cambios en la organización tisular pulmonar observados en nuestro modelo. A futuro sería interesante indagar el rol de los AGCC y sus receptores en los macrófagos, no solo en el contexto de la disbiosis ocasionada por antibióticos y la CDI, sino también en respuesta a *M. tuberculosis*.

Por otra parte, los microorganismos de un intestino en estado de disbiosis, así como los metabolitos derivados, inducen citoquinas inflamatorias como TNF- α , IL-5, IL-6, IL-1 β , IL-13, IL-17, IL-18 e IL-33 y quimioquinas inflamatorias como IL-8, CCL 2, 3, 4, 7, 20, CXCL 5, CXCL8 y CXCL10 ²⁸². Estas citoquinas y quimioquinas sensibilizan a células inmunes, tales como neutrófilos y linfocitos T, que posteriormente ingresan a circulación sanguínea e infiltran distintos órganos, incluido el parénquima pulmonar ²⁸³. Además, los vasos linfáticos mesentéricos también presentan la capacidad de transportar factores proinflamatorios derivados del intestino, que conducen a una activación de las células endoteliales pulmonares y células inmunes, resultando en el daño de la barrera alveolar ²⁸⁴. Por lo tanto, un microbioma desregulado podría alterar los mecanismos de migración celular, desencadenando un direccionamiento erróneo de las células inmunitarias activadas hacia distintos órganos, ejerciendo así efectos proinflamatorios que perturben la homeostasis tisular local ²⁸⁵.

Se ha observado que linfocitos T que expresan la integrina $\alpha 4\beta 7$ y que son reclutados al intestino inflamado pueden también infiltrar los pulmones y causar bronquiectasias (afección que daña las vías respiratorias de los pulmones y dificulta la expulsión de mucosidad) y bronquitis crónica ²⁸⁶. Por otro lado, en un estudio clínico con pacientes con IBD, también se demostró que los neutrófilos activados ingresaban al parénquima pulmonar y liberaban diversos mediadores proinflamatorios ²⁸⁶. De manera similar a lo observado para los linfocitos T, los neutrófilos marginales pulmonares sensibilizados producían una cantidad excesiva de mieloperoxidasa, elastasa y lactotransferrina, lo que llevaba a lesiones en el pulmón ²⁸⁷. Esta infiltración e inflamación no deseada por parte de los neutrófilos evita los mecanismos de protección endógenos y provoca daño tisular ²⁸⁸. Este mecanismo de mal direccionamiento de células inmunitarias se observó también en pacientes con enfermedad de Crohn, los cuales presentaron alveolitis neutrofilica y linfocítica y fuga alveolar ²⁸⁹.

Por lo tanto, esta migración alterada de células inmunes que inducen lesiones tisulares, podría considerarse como una de las causas que expliquen los cambios estructurales causados por la disbiosis y mantenidos por la CDI observados en el parénquima pulmonar en nuestro trabajo.

En resumen, todos nuestros resultados ponen de manifiesto la importancia de estudiar el eje intestino pulmón en el contexto de infecciones bacterianas. Con este trabajo pudimos establecer fundamentos que nos permitirán adentrarnos en diversas funciones del linaje monocítico/macrofágico tanto en la disbiosis intestinal como en la infección causada por *C. difficile* y su impacto sobre la Tuberculosis. La utilización de muestras humanas y modelos murinos nos ayudará a fortalecer nuestros hallazgos iniciales. La dirección del eje intestino-pulmón evaluada en el presente trabajo busca responder cómo patologías intestinales (disbiosis y CDI) impactan sobre el sistema inmune cuando éste debe enfrentar a una segunda infección pulmonar (Tuberculosis). En un futuro, continuaremos con el estudio de la portación de *C. difficile* y la caracterización de la microbiota en individuos con Tuberculosis activa (antes y durante el tratamiento) y con Tuberculosis latente; así como también la respuesta macrofágica de los mismos en la periferia. Consideramos que identificar los mecanismos que llevan a la generación de una respuesta inmune protectora o que conducen a la inmunopatogénesis es fundamental para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas que modulen la respuesta del hospedador y permitan controlar las infecciones.

CONCLUSIONES

En este trabajo final de grado hemos caracterizado una población de pacientes con CDI en nuestra región, evaluado la estructura intestinal y pulmonar en un modelo experimental, así como la función endocítica de los macrófagos humanos frente a *M. tuberculosis* en el contexto de la disbiosis intestinal generada por la administración de antibióticos y de la infección por *C. difficile*.

En cuanto a la población de pacientes, logramos caracterizar 249 individuos con diarrea provenientes de la región del NOBA. Encontramos que 1 de cada 5 pacientes presentaron a *C. difficile* como agente etiológico de la diarrea y que el 80% de los casos de CDI+ portaban cepas toxigénicas, que en su mayoría habían sido adquiridas en la comunidad. También determinamos diversos factores de riesgo, siendo la edad avanzada (con un punto de corte de 67 años), el consumo previo de antibióticos, la hospitalización previa y el haberse infectado anteriormente con *C. difficile* factores predisponentes para la CDI. Más aun, los pacientes CDI+ mostraron un recuento leucocitario y plaquetario y una concentración de urea elevados mientras que evidenciaron una disminución en la población de basófilos. Nuestro estudio epidemiológico representa la primera caracterización clínico-demográfica de pacientes con CDI en la Región Sanitaria III. Esta información es crucial para la toma de decisiones sanitarias y facilita la implementación de medidas sólidas de prevención y control de la CDI. También realizamos una revisión sistémica y un meta-análisis donde contrastamos nuestro trabajo con 40 estudios seleccionados de diferentes países del mundo, determinando que varios de nuestros hallazgos coinciden con lo reportado a nivel mundial. Teniendo en cuenta el contexto global, postulamos que la edad avanzada, el sexo biológico femenino, el consumo previo de antibióticos, la internación previa y la presencia de cardiopatías y nefropatías, así como un recuento leucocitario elevado, constituyen factores de riesgo que predisponen a la adquisición de *C. difficile*.

Por otra parte, pusimos a punto un modelo *in vitro* de entrenamiento con *C. difficile* (tiempos cortos y prolongados) y analizamos la capacidad endocítica de macrófagos obtenidos de dadores sanos frente a *M. tuberculosis*. La endocitosis de *C. difficile* se mantiene estable a través del tiempo. Sin embargo, la exposición por tiempos prolongados a *C. difficile* afecta la capacidad de los macrófagos para endocitar a *M. tuberculosis*, de manera tal que aquellos que internalizaron a *C. difficile* pierden la capacidad para endocitar a *M. tuberculosis*. Mientras que, por el lado opuesto, la internalización exclusiva de *M. tuberculosis* aumenta en los macrófagos que no endocitaron a *C. difficile*, lo que sugiere una especialización de la función endocítica. Asimismo, logramos evaluar el rol de SLAMF1 como sensor microbiológico de *M. tuberculosis* en este modelo. *C. difficile* es capaz de inhibir la expresión de SLAMF1 en la superficie de los macrófagos, lo que podría estar implicado en la reducción de la endocitosis de *M. tuberculosis* en presencia de *C. difficile*. Más aún, observamos que el entrenamiento con *C. difficile* interrumpe la formación de puentes citoplasmáticos y agrupaciones de macrófagos que se forman en presencia de *M. tuberculosis*.

Por último, evaluamos el impacto de la disbiosis intestinal y de la CDI a nivel tisular en un modelo *in vivo*. La disbiosis inducida por antibióticos modifica la integridad del intestino, promoviendo la infiltración celular mixta, la formación de nódulos linfáticos y la edematización de la submucosa tanto en el ciego como en el colon. Si bien el mayor daño siempre se observa en el ciego, *C. difficile* agrava la histopatología del colon al segundo día de infección (infección aguda). El daño causado por la CDI parece recuperarse a tiempos más prolongados, aunque las afecciones producidas por la disbiosis permanecen hasta el octavo día sin retornar a la homeostasis tisular. Por otra parte, los ratones experimentan un compromiso pulmonar a nivel de alveolos y tabiques ocasionado por la disbiosis intestinal, y son incapaces de revertir las modificaciones del parénquima en presencia de la infección por *C. difficile*.

En conclusión, nuestros hallazgos resaltan la necesidad de investigar el eje intestino-pulmón en el contexto de las infecciones bacterianas. Además, dada la creciente amenaza de la resistencia a los antibióticos, es crucial identificar los mecanismos que rigen la respuesta inmune, ya sea protectora o patogénica, con el fin de desarrollar estrategias terapéuticas innovadoras que modulen la respuesta del hospedador y permitan un control efectivo de las infecciones. Este estudio ha establecido los cimientos para explorar las diversas funciones del linaje monocítico/macrofágico así como la implicancia de ciertos metabolitos microbianos y sus receptores tanto en la disbiosis intestinal como en la infección causada por *C. difficile*, y su influencia en la Tuberculosis. Comprender que el estado del microbioma podría ser un factor determinante de la respuesta inmune y, como consecuencia, de la resolución de la infección por *M. tuberculosis* es clave en la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Brazier, J. S. The epidemiology and typing of *Clostridium difficile*. 47–57 (1998).
2. Lawson, P. A., Citron, D. M., Tyrrell, K. L. & Finegold, S. M. Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O'Toole 1935) Prévot 1938. *Anaerobe* **40**, 95–99 (2016).
3. Alam., P. K. M. M. U. *Clostridioides difficile Infection*. (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023).
4. Ananthakrishnan, A. N. *Clostridium difficile* infection: Epidemiology, risk factors and management. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* vol. 8 17–26 at <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2010.190> (2011).
5. Owens, R. C., Donskey, C. J., Gaynes, R. P., Loo, V. G. & Muto, C. A. Antimicrobial-associated risk factors for *Clostridium difficile* infection. *Clinical Infectious Diseases* vol. 46 at <https://doi.org/10.1086/521859> (2008).
6. Bartlett, J. G. & Gerding, D. N. Clinical recognition and diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *Clinical Infectious Diseases* vol. 46 at <https://doi.org/10.1086/521863> (2008).
7. Shakov, R., Salazar, R. S., Kagunye, S. K., Baddoura, W. J. & DeBari, V. A. Diabetes mellitus as a risk factor for recurrence of *Clostridium difficile* infection in the acute care hospital setting. *Am. J. Infect. Control* **39**, 194–198 (2011).
8. Lin, H. J. *et al.* Risk factors for *Clostridium difficile*-associated diarrhea among hospitalized adults with fecal toxigenic *C. difficile* colonization. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **48**, 183–189 (2015).
9. Diggs, N. G. & Surawicz, C. M. Evolving Concepts in *Clostridium difficile* Colitis. *Curr. Gastroenterol. Rep.* **11**, 400–405 (2009).

10. Dial, S., Delaney, J. A. C., Barkun, A. N. & Suissa, S. *Use of Gastric Acid-Suppressive Agents and the Risk of Community-Acquired Clostridium difficile-Associated Disease*. www.jama.com.
11. Dicks, L. M. T. Biofilm Formation of Clostridioides difficile, Toxin Production and Alternatives to Conventional Antibiotics in the Treatment of CDI. *Microorganisms* **11**, (2023).
12. Burke, K. E. & Lamont, J. T. Clostridium difficile Infection : A Worldwide Disease. **8**, 1–6 (2014).
13. Freeman, J. *et al.* The changing epidemiology of Clostridium difficile infections. *Clinical Microbiology Reviews* vol. 23 529–549 at <https://doi.org/10.1128/CMR.00082-09> (2010).
14. Goorhuis, A. *et al.* Emergence of Clostridium difficile Infection Due to a New Hypervirulent Strain, Polymerase Chain Reaction Ribotype 078. *Clin. Infect. Dis.* **47**, 1162–1170 (2008).
15. Liu, C., Monaghan, T., Yadegar, A., Louie, T. & Kao, D. Insights into the Evolving Epidemiology of Clostridioides difficile Infection and Treatment: A Global Perspective. *Antibiotics* **12**, 1141 (2023).
16. Chitnis, A. S. *et al.* Epidemiology of community-associated Clostridium difficile infection, 2009 through 2011. *JAMA Intern. Med.* **173**, 1359–1367 (2013).
17. Ruitter-Liget, J., Vincent, S., Czuzoj-Shulman, N. & Abenhaim, H. A. Risk factors, incidence, and morbidity associated with obstetric clostridium difficile infection. *Obstet. Gynecol.* **131**, 387–391 (2018).
18. Gupta, A. & Khanna, S. Community-acquired clostridium difficile infection: An increasing public health threat. *Infect. Drug Resist.* **7**, 63–72 (2014).

19. *Antibiotic resistance threats in the United States, 2019*.
<https://stacks.cdc.gov/view/cdc/82532> (2019) doi:10.15620/cdc:82532.
20. Fernandez Canigia, L. *et al.* [Clostridium difficile diarrhea: frequency of detection in a medical center in Buenos Aires, Argentina]. *Rev. Argent. Microbiol.* **33**, 101–107 (2001).
21. Legaria, M. C., Lumelsky, G. & Rosetti, S. Clostridium difficile-associated diarrhea from a general hospital in Argentina. *Anaerobe* **9**, 113–116 (2003).
22. Litterio, M. *et al.* Actividad 'in vitro' de 10 antimicrobianos frente a bacterias anaerobias. Estudio multicéntrico, 1999-2002. *Rev. Argent. Microbiol.* **36**, 130–135 (2004).
23. Goorhuis, A. *et al.* Application of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis to determine clonal spread of toxin A-negative Clostridium difficile in a general hospital in Buenos Aires, Argentina. *Clin. Microbiol. Infect.* **15**, 1080–1086 (2009).
24. Lopardo, G. *et al.* Epidemiology of Clostridium difficile: A hospital-based descriptive study in Argentina and Mexico. *Brazilian J. Infect. Dis.* **19**, 8–14 (2015).
25. Cejas, D. *et al.* Detection and molecular characterization of Clostridium difficile ST 1 in Buenos Aires, Argentina. *Anaerobe* **49**, 14–17 (2018).
26. Crivaro, A. N. *et al.* Clostridioides difficile: Characterization of the circulating toxinotypes in an Argentinean public hospital. *Rev. Argent. Microbiol.* **55**, 73–82 (2023).
27. Smits, W. K., Lyras, D., Lacy, D. B., Wilcox, M. H. & Kuijper, E. J. Clostridium difficile infection. doi:10.1038/nrdp.2016.20.
28. Abt, M. C., Mckenney, P. T. & Pamer, E. G. Clostridium difficile colitis: pathogenesis

- and host defence. *Nat. Publ. Gr.* (2016) doi:10.1038/nrmicro.2016.108.
29. Buonomo, E. L. & Petri, W. A. Anaerobe The microbiota and immune response during *Clostridium difficile* infection. 1–6 (2016) doi:10.1016/j.anaerobe.2016.05.009.
 30. Chen, S., Sun, C., Wang, H. & Wang, J. The Role of Rho GTPases in Toxicity of *Clostridium difficile* Toxins. 5254–5267 (2015) doi:10.3390/toxins7124874.
 31. Carroll, K. C. & Bartlett, J. G. Biology of *Clostridium difficile* : Implications for Epidemiology and Diagnosis. *Annu. Rev. Microbiol.* **65**, 501–521 (2011).
 32. Rodríguez-pardo, D., Mirelis, B. & Navarro, F. Infecciones producidas por *Clostridium difficile*. *Med. Clin. (Barc).* **31**, 254–263 (2013).
 33. Quesada-Gómez, C. *et al.* Emergence of *Clostridium difficile* NAP1 in Latin America. *J. Clin. Microbiol.* **48**, 669–670 (2010).
 34. Vohra, P. & Poxton, I. R. Induction of cytokines in a macrophage cell line by proteins of *Clostridium difficile*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **65**, 96–104 (2012).
 35. Pechine, S. & Anne Collignon. Immune responses induced by *Clostridium difficile*. *Ana* 1–11 (2016) doi:10.1016/j.anaerobe.2016.04.014.
 36. Mathur, H., Rea, M. C., Cotter, P. D., Hill, C. & Ross, R. P. The efficacy of thuricin CD, tigecycline, vancomycin, teicoplanin, rifampicin and nitazoxanide, independently and in paired combinations against *Clostridium difficile* biofilms and planktonic cells. *Gut Pathog.* **8**, 1–10 (2016).
 37. Awad, M. M., Johanesen, P. A., Carter, G. P., Rose, E. & Lyras, D. *Clostridium difficile* virulence factors : Insights into an anaerobic spore-forming pathogen. 579–593 (2014).

38. Hernández Del Pino, R. E., Barbero, A. M., Español, L. Á., Morro, L. S. & Pasquinelli, V. The adaptive immune response to *Clostridioides difficile* : A tricky balance between immunoprotection and immunopathogenesis. *J. Leukoc. Biol.* **109**, 195–210 (2021).
39. Lim, S. C., Knight, D. R. & Riley, T. V. *Clostridium difficile* and One Health. *Clin. Microbiol. Infect.* **26**, 857–863 (2020).
40. Rodriguez, C. *et al.* *Clostridium difficile* beyond stools: dog nasal discharge as a possible new vector of bacterial transmission. *Heliyon* **5**, e01629 (2019).
41. Hensgens, M. P. M. *et al.* *Clostridium difficile* infection in the community: A zoonotic disease? *Clin. Microbiol. Infect.* **18**, 635–645 (2012).
42. Weese, J. S., Salgado-Bierman, F., Rupnik, M., Smith, D. A. & van Coeverden de Groot, P. *Clostridium (Clostridioides) difficile* shedding by polar bears (*Ursus maritimus*) in the Canadian Arctic. *Anaerobe* **57**, 35–38 (2019).
43. Semon, A. K., Keenan, O. & Zackular, J. P. *Clostridioides difficile* and the microbiota early in life. *J. Pediatric Infect. Dis. Soc.* **10**, S3–S7 (2021).
44. Cheng, S., Zhu, L. & Faden, H. S. Interactions of bile acids and the gut microbiota: Learning from the differences in *Clostridium difficile* infection between children and adults. *Physiol. Genomics* **51**, 218–223 (2019).
45. World Health Organization. *Tuberculosis report 2023. January vol. t/malaria/* (2023).
46. World Health Organization. *Global tuberculosis report 2020.* (World Health Organization, 2020).
47. Narasimhan, P., Wood, J., Macintyre, C. R. & Mathai, D. Risk factors for tuberculosis. *Pulm. Med.* **2013**, 828939 (2013).

48. Teo, A. K. J., Singh, S. R., Prem, K., Hsu, L. Y. & Yi, S. Duration and determinants of delayed tuberculosis diagnosis and treatment in high-burden countries: a mixed-methods systematic review and meta-analysis. *Respir. Res.* **22**, (2021).
49. Shi, W. *et al.* Alterations of gut microbiota in patients with active pulmonary tuberculosis in China: a pilot study. *Int. J. Infect. Dis.* **111**, 313–321 (2021).
50. Hogan, C. A., Puri, L., Gore, G. & Pai, M. Impact of fluoroquinolone treatment on delay of tuberculosis diagnosis: A systematic review and meta-analysis. *J. Clin. Tuberc. Other Mycobact. Dis.* **6**, 1–7 (2017).
51. Ministerio de Salud de la Nación. *Boletín n° 6. Tuberculosis y lepra en la Argentina.* file:///C:/Users/Lore/Documents/Trabajo maestria biotecnologia-infecciosas/Material de lectura- libros, boletines, papers/Boletines epidemiologicos y situaciones legales en Argentina/boletin_n_5_tuberculosis_y_lepra_en_argentina_28-3-2022.pdf (2023).
52. Cole, S. T. *et al.* Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **394**, 651–653 (1998).
53. Brennan, P. J. Structure of mycobacteria: recent developments in defining cell wall carbohydrates and proteins. *Rev. Infect. Dis.* **11**, 420–430 (1989).
54. Jackson, M. The mycobacterial cell envelope-lipids. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **4**, (2014).
55. Garcia-Vilanova, A., Chan, J. & Torrelles, J. B. Underestimated Manipulative Roles of *Mycobacterium tuberculosis* Cell Envelope Glycolipids During Infection. *Front. Immunol.* **10**, 2909 (2019).
56. Chatterjee, D., Lowell, K., Rivoire, B., McNeil, M. R. & Brennan, P. J. Lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis*. Capping with mannosyl residues in some strains. *J. Biol. Chem.* **267**, 6234–6239 (1992).

57. Churchyard, G. *et al.* What We Know about Tuberculosis Transmission: An Overview. *J. Infect. Dis.* **216**, S629–S635 (2017).
58. Kumar, A. *et al.* Redox homeostasis in mycobacteria: the key to tuberculosis control? *Expert Rev. Mol. Med.* **13**, (2011).
59. Bain, C. C. & Mowat, A. M. Macrophages in intestinal homeostasis and inflammation. *Immunol. Rev.* **260**, 102–117 (2014).
60. Na, Y. R., Stakenborg, M., Seok, S. H. & Matteoli, G. Macrophages in intestinal inflammation and resolution: a potential therapeutic target in IBD. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **16**, 531–543 (2019).
61. Collins, L. E. *et al.* Surface layer proteins isolated from *Clostridium difficile* induce clearance responses in macrophages. *Microbes Infect.* **16**, 391–400 (2014).
62. Ng, J. *et al.* *Clostridium difficile* toxin-induced inflammation and intestinal injury are mediated by the inflammasome. *Gastroenterology* **139**, 542-552.e3 (2010).
63. Liu, Y. H. *et al.* The ATP-P2X7 signaling axis is an essential sentinel for intracellular *Clostridium difficile* pathogen-induced inflammasome activation. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **8**, 1–14 (2018).
64. Saad, G. *et al.* The effect of different *C. difficile* MLST strains on viability and activity of macrophages. *Heliyon* **9**, e13846 (2023).
65. Paredes-Sabja, D., Cofre-Araneda, G., Brito-Silva, C., Pizarro-Guajardo, M. & Sarker, M. R. *Clostridium difficile* Spore-Macrophage Interactions: Spore Survival. *PLoS One* **7**, e43635 (2012).
66. Modi, N. *et al.* Differential Binding and Internalization of *Clostridium difficile* Toxin A by Human Peripheral Blood Monocytes, Neutrophils and Lymphocytes. *Basic Immunol.* **74**, 264–271 (2011).

67. Barbero, A. M., Hernández Del Pino, R. E., Fuentes, F., Barrionuevo, P. & Pasquinelli, V. Platelets promote human macropinocytosis of *Clostridioides difficile*. 1–14 (2024) doi:10.3389/fcimb.2023.1252509.
68. Yu, X. *et al.* The Cytokine TGF- β Promotes the Development and Homeostasis of Alveolar Macrophages. *Immunity* **47**, 903-912.e4 (2017).
69. Khan, N. *et al.* M. tuberculosis Reprograms Hematopoietic Stem Cells to Limit Myelopoiesis and Impair Trained Immunity. *Cell* **183**, 752-770.e22 (2020).
70. Mahamed, D. *et al.* Intracellular growth of *Mycobacterium tuberculosis* after macrophage cell death leads to serial killing of host cells. *Elife* **6**, (2017).
71. Cohen, S. B. *et al.* Alveolar Macrophages Provide an Early *Mycobacterium tuberculosis* Niche and Initiate Dissemination. *Cell Host Microbe* **24**, 439-446.e4 (2018).
72. Pisu, D. *et al.* Single cell analysis of M. tuberculosis phenotype and macrophage lineages in the infected lung. *J. Exp. Med.* **218**, (2021).
73. Huang, L., Nazarova, E. V, Tan, S., Liu, Y. & Russell, D. G. Growth of *Mycobacterium tuberculosis* in vivo segregates with host macrophage metabolism and ontogeny. *J. Exp. Med.* **215**, 1135–1152 (2018).
74. Ahmad, F. *et al.* Macrophage: A Cell With Many Faces and Functions in Tuberculosis. *Front. Immunol.* **13**, 747799 (2022).
75. Rothchild, A. C. *et al.* Alveolar macrophages generate a noncanonical NRF2-driven transcriptional response to *Mycobacterium tuberculosis* in vivo. *Sci. Immunol.* **4**, (2019).
76. Khan, A., Singh, V. K., Hunter, R. L. & Jagannath, C. Macrophage heterogeneity and plasticity in tuberculosis. *J. Leukoc. Biol.* **106**, 275–282 (2019).

77. Pagán, A. J. & Ramakrishnan, L. Immunity and Immunopathology in the Tuberculous Granuloma. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **5**, (2014).
78. Guirado, E., Schlesinger, L. S. & Kaplan, G. Macrophages in tuberculosis: friend or foe. *Semin. Immunopathol.* **35**, 563–583 (2013).
79. Kaufmann, E. *et al.* BCG Educates Hematopoietic Stem Cells to Generate Protective Innate Immunity against Tuberculosis. *Cell* **172**, 176-190.e19 (2018).
80. de Araujo, A. C. V. S. C., Mambelli, F., Sanches, R. O., Marinho, F. V. & Oliveira, S. C. Current Understanding of Bacillus Calmette-Guérin-Mediated Trained Immunity and Its Perspectives for Controlling Intracellular Infections. *Pathogens* **12**, (2023).
81. Turnbaugh, P. J. *et al.* The Human Microbiome Project. *Nature* **449**, 804–810 (2007).
82. Giulio, P. The intestinal microbiota: Towards a multifactorial integrative model. Eubiosis and dysbiosis in morbid physical and psychological conditions. *Arch. Clin. Gastroenterol.* 024–035 (2021) doi:10.17352/2455-2283.000094.
83. Barbosa-Amezcuca, M., Galeana-Cadena, D., Alvarado-Peña, N. & Silva-Herzog, E. The Microbiome as Part of the Contemporary View of Tuberculosis Disease. *Pathog. (Basel, Switzerland)* **11**, (2022).
84. Hufnagl, K., Pali-Schöll, I., Roth-Walter, F. & Jensen-Jarolim, E. Dysbiosis of the gut and lung microbiome has a role in asthma. *Semin. Immunopathol.* **42**, 75–93 (2020).
85. Budden, K. F. *et al.* Emerging pathogenic links between microbiota and the gut-lung axis. *Nat. Rev. Microbiol.* **15**, 55–63 (2017).
86. McGhee, J. R. & Fujihashi, K. Inside the mucosal immune system. *PLoS Biol.* **10**, e1001397 (2012).
87. Zhao, M. *et al.* Maturation and specialization of group 2 innate lymphoid cells

- through the lung-gut axis. *Nat. Commun.* **13**, 7600 (2022).
88. Agus, A., Planchais, J. & Sokol, H. Gut Microbiota Regulation of Tryptophan Metabolism in Health and Disease. *Cell Host Microbe* **23**, 716–724 (2018).
 89. Ashique, S. *et al.* Short Chain Fatty Acids: Fundamental mediators of the gut-lung axis and their involvement in pulmonary diseases. *Chem. Biol. Interact.* **368**, 110231 (2022).
 90. Sun, M., Wu, W., Liu, Z. & Cong, Y. Microbiota metabolite short chain fatty acids, GPCR, and inflammatory bowel diseases. *J. Gastroenterol.* **52**, 1–8 (2017).
 91. Sencio, V., Machado, M. G. & Trottein, F. The lung-gut axis during viral respiratory infections: the impact of gut dysbiosis on secondary disease outcomes. *Mucosal Immunol.* **14**, 296–304 (2021).
 92. Tarashi, S. *et al.* The human microbiota in pulmonary tuberculosis: Not so innocent bystanders. *Tuberculosis* **113**, 215–221 (2018).
 93. Zhang, K. *et al.* Sirtuin-dependent metabolic and epigenetic regulation of macrophages during tuberculosis. *Frontiers in Immunology* vol. 14 at <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1121495> (2023).
 94. Hu, Y. *et al.* The Gut Microbiome Signatures Discriminate Healthy From Pulmonary Tuberculosis Patients. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **9**, 1–8 (2019).
 95. Luo, M. *et al.* Alternation of Gut Microbiota in Patients with Pulmonary Tuberculosis. **8**, (2017).
 96. Hu, Y. *et al.* Gut microbiota associated with pulmonary tuberculosis and dysbiosis caused by anti-tuberculosis drugs. *J. Infect.* (2018) doi:10.1016/j.jinf.2018.08.006.
 97. Arnold, I. C. *et al.* Helicobacter hepaticus infection in BALB/c mice abolishes

- subunit-vaccine-induced protection against *M. tuberculosis*. *Vaccine* **33**, 1808–1814 (2015).
98. Khan, N. *et al.* Intestinal dysbiosis compromises alveolar macrophage immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Mucosal Immunol.* **12**, 772–783 (2019).
99. Comberiati, P. *et al.* The role of gut and lung microbiota in susceptibility to tuberculosis. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **18**, 1–20 (2021).
100. Scriba, T. J. *et al.* Differential Recognition of *Mycobacterium tuberculosis* – Specific Epitopes as a Function of Tuberculosis Disease History. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **196**, 772–781 (2017).
101. Croswell, A., Amir, E., Tegatz, P., Barman, M. & Salzman, N. H. Prolonged impact of antibiotics on intestinal microbial ecology and susceptibility to enteric *Salmonella* infection. *Infect. Immun.* **77**, 2741–2753 (2009).
102. Wang, J. *et al.* Long-Term Effects of Multi-Drug-Resistant Tuberculosis Treatment on Gut Microbiota and Its Health Consequences. *Front. Microbiol.* **11**, 53 (2020).
103. Quigley, J. & Lewis, K. Noise in a Metabolic Pathway Leads to Persister Formation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol. Spectr.* **10**, (2022).
104. Zhang, Y., Yew, W. W. & Barer, M. R. Targeting persisters for tuberculosis control. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 2223–2230 (2012).
105. KIM, Y. S. *et al.* Incidence and clinical features of *Clostridium difficile* infection in Korea : a nationwide study. 189–194 (2020) doi:10.1017/S0950268812000581.
106. Obuch-woszczaty, P., Dubiel, G. & Harmanus, C. Emergence of *Clostridium difficile* infection in tuberculosis patients due to a highly rifampicin-resistant PCR ribotype 046 clone in Poland. 1027–1030 (2013) doi:10.1007/s10096-013-1845-5.

107. Lee, Y. M. *et al.* Incidence and Clinical Outcomes of Clostridium difficile Infection after Treatment with Tuberculosis Medication. **10**, 250–254 (2016).
108. Legenza, L. *et al.* Epidemiology and outcomes of Clostridium difficile infection among hospitalised patients: Results of a multicentre retrospective study in South Africa. *BMJ Glob. Heal.* **3**, (2018).
109. Kullin, B. R., Reid, S. & Abratt, V. Clostridium difficile in patients attending tuberculosis hospitals in Cape Town , South Africa , 2014 – 2015. *Afr. J. Lab. Med.* (2018).
110. Gerson, D. S. *et al.* Colitis por Clostridium difficile durante el tratamiento de tuberculosis. *An Med* **63**, 122–124 (2018).
111. Stevenson, E. C., Major, G. A., Spiller, R. C., Kuehne, S. A. & Minton, P. Coinfection and Emergence of Rifamycin Resistance during a Recurrent Clostridium difficile Infection. *J. Clin. Microbiol.* **54**, 2689–2694 (2016).
112. Palmer, C. D. *et al.* Diminished Macrophage Apoptosis and Reactive Oxygen Species Generation after Phorbol Ester Stimulation in Crohn ' s Disease. **4**, (2009).
113. Caradonna, L. *et al.* Phagocytosis , Killing , Lymphocyte-Mediated Antibacterial Activity , Serum Autoantibodies , and Plasma Endotoxins in Inflammatory Bowel Disease. **95**, (2000).
114. Smith, A. M. *et al.* Disordered macrophage cytokine secretion underlies impaired acute inflammation and bacterial clearance in Crohn ' s disease. **206**, 1883–1897 (2009).
115. Mori, G., Morrison, M. & Blumenthal, A. *Microbiome-immune interactions in tuberculosis.* (2021) doi:10.1371/journal.ppat.1009377.
116. Dragovich, M. & Mor, A. The SLAM family receptors: potential therapeutic targets for

- inflammatory and autoimmune diseases. *Autoimmun. Rev.* **17**, 2–4 (2007).
117. Wu, N. & Veillette, A. SLAM family receptors in normal immunity and immune pathologies. *Curr. Opin. Immunol.* **38**, 45–51 (2016).
118. Veillette, A. & Latour, S. The SLAM family of immune-cell receptors. *Curr. Opin. Immunol.* **15**, 277–285 (2003).
119. Tatsuo, H., Ono, N., Tanaka, K. & Yanagi, Y. Slam (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature* **406**, 893–897 (2000).
120. Tatsuo, H. & Yanagi, Y. The morbillivirus receptor SLAM (CD150). *Microbiol. Immunol.* **46**, 135–142 (2002).
121. Poveda, C. *et al.* Interaction of Signaling Lymphocytic Activation Molecule Family 1 (SLAMF1) receptor with Trypanosoma cruzi is strain- dependent and affects NADPH oxidase expression and activity. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **1**, 1–22 (2020).
122. Driel, B. van *et al.* The cell surface receptor Slamf6 modulates innate immune responses during Citrobacter rodentium-induced colitis. *Int. Immunol.* **27**, 447–457 (2015).
123. Berger, S. B. *et al.* SLAM is a microbial sensor that regulates bacterial phagosome functions in macrophages. *Nat. Immunol.* **11**, 920–927 (2010).
124. Degos, C. *et al.* Omp25-dependent engagement of SLAMF1 by Brucella abortus in dendritic cells limits acute inflammation and favours bacterial persistence in vivo. *Cell. Microbiol.* **22**, 1–16 (2020).
125. Pasquinelli, V. *et al.* Expression of Signaling Lymphocytic Activation Molecule-Associated Protein Interrupts IFN- γ Production in Human Tuberculosis. *J. Immunol.* **172**, 1177–1185 (2004).

126. Nau, G. J. *et al.* Human macrophage activation programs induced by bacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 1503–1508 (2002).
127. Silver, R. F. *et al.* Human Alveolar Macrophage Gene Responses to Mycobacterium tuberculosis Strains H37Ra and H37Rv. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **40**, 491–504 (2009).
128. Fan, L. *et al.* MptpB promotes mycobacteria survival by inhibiting the expression of inflammatory mediators and cell apoptosis in macrophages. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **8**, 1–10 (2018).
129. Pellegrini, J. M. *et al.* Neutrophil autophagy during human active tuberculosis is modulated by SLAMF1. *Autophagy* (2020) doi:10.1080/15548627.2020.1825273.
130. Barbero, A. M. *et al.* SLAMF1 signaling induces Mycobacterium tuberculosis uptake leading to endolysosomal maturation in human macrophages. *J. Leukoc. Biol.* **109**, 257–273 (2021).
131. Wang, N. *et al.* The Cell Surface Receptor SLAM Controls T Cell and Macrophage Functions. *J. Exp. Med.* **199**, 1255–1264 (2004).
132. 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 [1]. *J. Clin. Pathol.* **58**, 110–111 (2005).
133. DRIEL, B. VAN *et al.* Signaling Lymphocyte Activation Molecule Regulates Development of Colitis in Mice. *Gastroenterology* **143**, 1544-1554.e7 (2012).
134. Wang, G. *et al.* Migration of myeloid cells during inflammation is differentially regulated by the cell surface receptors Slamf1 and Slamf8. *PLoS One* **10**, 1–18 (2015).
135. Johnson, S. *et al.* Clinical Practice Guideline by the Infectious Diseases Society of

America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA): 2021 Focused Update Guidelines on Management of *Clostridioides difficile* Infection in Adults. *Clin. Infect. Dis.* **73**, e1029–e1044 (2021).

136. Buonomo, E. L. *et al.* Microbiota-Regulated IL-25 Increases Eosinophil Number to Provide Protection during *Clostridium difficile* Infection. *Cell Rep.* **16**, 432–443 (2016).
137. Perez, J., Springthorpe, V. S. & Sattar, S. A. Clospore: a liquid medium for producing high titers of semi-purified spores of *Clostridium difficile*. *J. AOAC Int.* **94**, 618–26 (2011).
138. Pramoongjago, P. & Jr, W. A. P. Microbiota-regulated IL-25 increases eosinophil number to provide 1 protection during *Clostridium difficile* infection Erica. *Cell Rep.* **16**, 432–443 (2016).
139. Morton, J. & Snider, T. A. Guidelines for collection and processing of lungs from aged mice for histological studies. *Pathobiol. Aging Age-related Dis.* **7**, 1313676 (2017).
140. Wershof, E. *et al.* A FIJI macro for quantifying pattern in extracellular matrix. *Life Sci. Alliance* **4**, 1–11 (2021).
141. Lopes Cançado, G. G. *et al.* Clinical epidemiology of *Clostridium difficile* infection among hospitalized patients with antibiotic-associated diarrhea in a university hospital of Brazil. *Anaerobe* **54**, 65–71 (2018).
142. Lowe, D. O., Mamdani, M. M., Kopp, A., Low, D. E. & Juurlink, D. N. *Proton Pump Inhibitors and Hospitalization for Clostridium Difficile-Associated Disease: A Population-Based Study*. <http://cid.oxfordjournals.org/>.
143. Zhou, F. F., Wu, S., Klena, J. D. & Huang, H. H. Clinical characteristics of

- Clostridium difficile infection in hospitalized patients with antibiotic-associated diarrhea in a university hospital in China. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **33**, 1773–1779 (2014).
144. Lv, Z., Peng, G. L. & Su, J. R. Factors associated with Clostridium difficile diarrhea in a hospital in Beijing, China. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **47**, 1085–1090 (2014).
145. Dai, W. *et al.* Characteristics of Clostridium difficile isolates and the burden of hospital-acquired Clostridium difficile infection in a tertiary teaching hospital in Chongqing, Southwest China. *BMC Infect. Dis.* **20**, (2020).
146. Li, Y., Huang, Y., Li, Y. & Nie, Y. Clinical characteristics of Clostridium difficile-associated diarrhea among patients in a tertiary care center in China. *Pakistan J. Med. Sci.* **32**, 736–741 (2016).
147. Tang, C. *et al.* Epidemiology and risk factors for Clostridium difficile-associated diarrhea in adult inpatients in a university hospital in China. *Am. J. Infect. Control* **46**, 285–290 (2018).
148. Carvajal, C., Pacheco, C. & Jaimes, F. Perfil clínico y demográfico y factores de riesgo frente a la infección por Clostridium difficile. *Biomedica* **37**, 53–61 (2017).
149. Salazar, C. L. *et al.* Molecular, microbiological and clinical characterization of Clostridium difficile isolates from tertiary care hospitals in Colombia. *PLoS One* **12**, (2017).
150. Han, S. H. *et al.* Epidemiology and clinical features of toxigenic culture-confirmed hospital-onset Clostridium difficile infection: A multicentre prospective study in tertiary hospitals of South Korea. *J. Med. Microbiol.* **63**, 1542–1551 (2014).
151. Soes, L. M. *et al.* Risk factors for Clostridium difficile infection in the community: A case-control study in patients in general practice, Denmark, 2009-2011. *Epidemiol.*

- Infect.* **142**, 1437–1448 (2014).
152. Baxter, R., Ray, G. T. & Fireman, B. H. Case-Control Study of Antibiotic Use and Subsequent *Clostridium difficile*–Associated Diarrhea in Hospitalized Patients . *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **29**, 44–50 (2008).
153. Haddad, F. G. *et al.* An insight into *Clostridium * difficile* infection: A single-center retrospective case-control study. *Z. Gastroenterol.* **57**, 1183–1195 (2019).
154. Kuntz, J. L., Chrischilles, E. A., Pendergast, J. F., Herwaldt, L. A. & Polgreen, P. M. Incidence of and risk factors for community-associated *Clostridium difficile* infection: A nested case-control study. *BMC Infect. Dis.* **11**, (2011).
155. Kutty, P. K. *et al.* Risk factors for and estimated incidence of community-associated *Clostridium difficile* infection, North Carolina, USA. *Emerg. Infect. Dis.* **16**, 197–204 (2010).
156. Naggie, S. *et al.* A case-control study of community-associated *clostridium difficile* infection: No role for proton pump inhibitors. *Am. J. Med.* **124**, (2011).
157. Tartof, S. Y. *et al.* A comprehensive assessment across the healthcare continuum: Risk of hospital-associated *Clostridium difficile* infection due to outpatient and inpatient antibiotic exposure. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **36**, 1409–1416 (2015).
158. Tabak, Y. P., Johannes, R. S., Sun, X., Nunez, C. M. & McDonald, L. C. Predicting the Risk for Hospital-Onset *Clostridium difficile* Infection (HO-CDI) at the Time of Inpatient Admission: HO-CDI Risk Score. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **36**, 695–701 (2015).
159. Le Monnier, A. *et al.* One-day prevalence of asymptomatic carriage of toxigenic and non-toxigenic *Clostridioides difficile* in 10 French hospitals. *J. Hosp. Infect.* **129**, 65–74 (2022).

160. Kurti, Z. *et al.* Burden of Clostridium difficile infection between 2010 and 2013: Trends and outcomes from an academic center in Eastern Europe. *World J. Gastroenterol.* **21**, 6728–6735 (2015).
161. Ingle, M. *et al.* Clostridium difficile as a cause of acute diarrhea: A prospective study in a tertiary care center. *Indian J. Gastroenterol.* **32**, 179–183 (2013).
162. Ingle, M. *et al.* Prevalence and clinical course of Clostridium difficile infection in a tertiary-care hospital: A retrospective analysis. *Indian J. Gastroenterol.* **30**, 89–93 (2011).
163. Vestreinsdottir, I. *et al.* Risk factors for clostridium difficile toxin-positive diarrhea: A population-based prospective case-control study. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **31**, 2601–2610 (2012).
164. Mori, N. & Aoki, Y. Clinical characteristics and risk factors for community-acquired Clostridium difficile infection: A retrospective, case-control study in a tertiary care hospital in Japan. *J. Infect. Chemother.* **21**, 864–867 (2015).
165. Morfin-Otero, R. *et al.* Clostridium difficile outbreak caused by NAP1/BI/027 strain and non-027 strains in a Mexican hospital. *Brazilian J. Infect. Dis.* **20**, 8–13 (2016).
166. Czepiel, J. *et al.* The role of local and systemic cytokines in patients infected with Clostridium difficile. *J. Physiol. Pharmacol. an Off. J. Polish Physiol. Soc.* **65**, 695–703 (2014).
167. Rajabally, N. *et al.* The Clostridium difficile problem: A South African tertiary institution's prospective perspective. *South African Med. J.* **103**, 168–172 (2013).
168. Thipmontree, W., Kiratisin, P., Manatsathit, S. & Thamlikitkul, V. *Epidemiology of Suspected Clostridium difficile-Associated Hospital-Acquired Diarrhea in Hospitalized Patients at Siriraj Hospital.* *J Med Assoc Thai* vol. 94

<http://www.mat.or.th/journal> (2011).

169. Lee, Y. C. *et al.* Changing incidence and clinical manifestations of *Clostridium difficile*-associated diarrhea detected by combination of glutamate dehydrogenase and toxin assay in Northern Taiwan. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **45**, 287–295 (2012).
170. Lin, C.-Y. *et al.* Proton Pump Inhibitor-Induced Gut Dysbiosis Increases Mortality Rates for Patients with *Clostridioides difficile* Infection. *Microbiol. Spectr.* **10**, (2022).
171. Ergen, E. K. *et al.* Nosocomial diarrhea and *Clostridium Difficile* associated diarrhea in a Turkish University Hospital. *Med. Mal. Infect.* **39**, 382–387 (2009).
172. Dial, S., Kezouh, A., Dascal, A., Barkun, A. & Suissa, S. Patterns of antibiotic use and risk of hospital admission because of *Clostridium difficile* infection. *C. Can. Med. Assoc. J.* **179**, 767–772 (2008).
173. Suissa, D., Delaney, J. A. C., Dial, S. & Brassard, P. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and the risk of *Clostridium difficile*-associated disease. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **74**, 370–375 (2012).
174. Dial, S., Delaney, J. A. C., Barkun, A. N. & Suissa, S. Use of gastric acid-suppressive agents and the risk of community-acquired *Clostridium difficile*-associated disease. *JAMA* **294**, 2989–2995 (2005).
175. Wilcox, M. H., Mooney, L., Bendall, R., Settle, C. D. & Fawley, W. N. A case-control study of community-associated *Clostridium difficile* infection. *J. Antimicrob. Chemother.* **62**, 388–396 (2008).
176. Marwick, C. A. *et al.* Community-associated *Clostridium difficile* infection among older people in Tayside, Scotland, is associated with antibiotic exposure and care home residence: Cohort study with nested case-control. *J. Antimicrob. Chemother.*

- 68**, 2927–2933 (2013).
177. McDonald, L. C. *et al.* An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. *N. Engl. J. Med.* **353**, 2433–2441 (2005).
178. He, M. *et al.* Emergence and global spread of epidemic healthcare-associated *Clostridium difficile*. *Nat. Genet.* **45**, 109–113 (2013).
179. Louie, T. J. *et al.* Fidaxomicin preserves the intestinal microbiome during and after treatment of *Clostridium difficile* infection (CDI) and reduces both toxin reexpression and recurrence of CDI. *Clin. Infect. Dis. an Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **55 Suppl 2**, S132-42 (2012).
180. Guh, A. Y. *et al.* Trends in U.S. Burden of *Clostridioides difficile* Infection and Outcomes. *N. Engl. J. Med.* **382**, 1320–1330 (2020).
181. Gentry, C. A., Williams, R. J. 2nd & Campbell, D. Continued decline in the prevalence of the *Clostridioides difficile* BI/NAP1/027 strain across the United States Veterans Health Administration. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **100**, 115308 (2021).
182. McDermott, L. A. *et al.* 1669. A US Based National Surveillance Study for the Susceptibility and Epidemiology of *Clostridioides difficile* Associated Diarrheal Isolates with Special Reference to Ridinilazole: 2020-2021. *Open Forum Infect. Dis.* **9**, ofac492.1299 (2022).
183. Dingle, K. E. *et al.* Effects of control interventions on *Clostridium difficile* infection in England: an observational study. *Lancet Infect. Dis.* **17**, 411–421 (2017).
184. Wilcox, M. H. *et al.* Changing Epidemiology of *Clostridium difficile* Infection Following the Introduction of a National Ribotyping-Based Surveillance Scheme in England. *Clin. Infect. Dis.* **55**, 1056–1063 (2012).

185. Jeon, C. H., Kim, S. H. & Wi, Y. M. Prevalence of Non-Toxigenic *Clostridioides difficile* in Diarrhoea Patients and Their Clinical Characteristics. *Antibiotics* **12**, (2023).
186. Khanna, S. *et al.* The Epidemiology of Community-Acquired *Clostridium difficile* Infection: A Population-Based Study. *Off. J. Am. Coll. Gastroenterol. | ACG* **107**, (2012).
187. European Centre for Disease Prevention and Control. *Clostridioides (Clostridium) difficile* infections. Annual epidemiological report for 2016-2017. Stockholm: ECDC; 2022. *Annu. Epidemiol. Rep. Commun. Dis. Eur.* **40**, 335–348 (2016).
188. Carlson, T. J., Blasingame, D., Gonzales-Luna, A. J., Alnezary, F. & Garey, K. W. *Clostridioides difficile* ribotype 106: A systematic review of the antimicrobial susceptibility, genetics, and clinical outcomes of this common worldwide strain. *Anaerobe* **62**, 102142 (2020).
189. Bolton, D. & Marcos, P. The Environment, Farm Animals and Foods as Sources of *Clostridioides difficile* Infection in Humans. *Foods* **12**, (2023).
190. Borji, S. *et al.* Global prevalence of *Clostridioides difficile* in 17,148 food samples from 2009 to 2019: a systematic review and meta-analysis. *J. Heal. Popul. Nutr.* **42**, 1–17 (2023).
191. Zhu, N. *et al.* A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* **382**, 727–733 (2020).
192. Pan, L. *et al.* Clinical Characteristics of COVID-19 Patients With Digestive Symptoms in Hubei, China: A Descriptive, Cross-Sectional, Multicenter Study. *Am. J. Gastroenterol.* **115**, 766–773 (2020).
193. Granata, G. *et al.* The burden of *Clostridioides difficile* infection in COVID-19

- patients: A systematic review and meta-analysis. *Anaerobe* **74**, 102484 (2022).
194. Huttner, B. D., Catho, G., Pano-Pardo, J. R., Pulcini, C. & Schouten, J. COVID-19: don't neglect antimicrobial stewardship principles! *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **26**, 808–810 (2020).
195. Chen, N. *et al.* Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet (London, England)* **395**, 507–513 (2020).
196. Ghaderi, H. *et al.* Impact of COVID-19 Pandemic on Emergency Department Visits: A Regional Case Study of Informatics Challenges and Opportunities. *AMIA ... Annu. Symp. proceedings. AMIA Symp.* **2021**, 496–505 (2021).
197. Jeffery, M. M. *et al.* Trends in Emergency Department Visits and Hospital Admissions in Health Care Systems in 5 States in the First Months of the COVID-19 Pandemic in the US. *JAMA Intern. Med.* **180**, 1328–1333 (2020).
198. Bentivegna, E. *et al.* Impact of COVID-19 prevention measures on risk of health care-associated Clostridium difficile infection. *Am. J. Infect. Control* **49**, 640–642 (2021).
199. Ochoa-Hein, E. *et al.* Substantial reduction of healthcare facility-onset Clostridioides difficile infection (HO-CDI) rates after conversion of a hospital for exclusive treatment of COVID-19 patients. *Am. J. Infect. Control* **49**, 966–968 (2021).
200. Dudeck, M. A. *et al.* The impact of coronavirus disease 2019 (COVID-19) on healthcare-associated infections in 2020: A summary of data reported to the National Healthcare Safety Network. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **43**, 12–25 (2022).
201. Sheikh, A. A. E. *et al.* COVID-19 and fulminant clostridium difficile colitis co-infection. *Eur. J. Case Reports Intern. Med.* **8**, (2021).

202. Knight, G. M. *et al.* Antimicrobial resistance and COVID-19: Intersections and implications. *Elife* **10**, e64139 (2021).
203. Langford, B. J. *et al.* Antibiotic prescribing in patients with COVID-19: rapid review and meta-analysis. *Clin. Microbiol. Infect.* **27**, 520–531 (2021).
204. Adams-Sommer, V. *et al.* Hospital-onset Clostridioides difficile infections during the COVID-19 pandemic. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **42**, 1165–1166 (2021).
205. Laszkowska, M. *et al.* Prevalence of Clostridioides difficile and Other Gastrointestinal Pathogens in Patients with COVID-19. *Dig. Dis. Sci.* **66**, 4398–4405 (2021).
206. Hawes, A. M., Desai, A. & Patel, P. K. Did Clostridioides difficile testing and infection rates change during the COVID-19 pandemic? *Anaerobe* **70**, 102384 (2021).
207. Tariq, R. *et al.* Prevalence and Mortality of COVID-19 Patients With Gastrointestinal Symptoms: A Systematic Review and Meta-analysis. *Mayo Clin. Proc.* **95**, 1632–1648 (2020).
208. Khanna, S. & Kraft, C. S. The interplay of SARS-CoV-2 and Clostridioides difficile infection. *Future Microbiol.* **16**, 439–443 (2021).
209. Kincaid, S. E. Clostridium difficile-associated disease: impact of the updated SHEA/IDSA guidelines. *Consult. Pharm. J. Am. Soc. Consult. Pharm.* **25**, 834–836 (2010).
210. Owens, R. C. Clostridium difficile-associated disease: changing epidemiology and implications for management. *Drugs* **67**, 487–502 (2007).
211. Simor, A. E. Diagnosis, management, and prevention of Clostridium difficile infection in long-term care facilities: a review. *J. Am. Geriatr. Soc.* **58**, 1556–1564 (2010).

212. Khanna, S. & Pardi, D. S. The growing incidence and severity of *Clostridium difficile* infection in inpatient and outpatient settings. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **4**, 409–416 (2010).
213. Garborg, K., Waagsbø, B., Stallemo, A., Matre, J. & Sundøy, A. Results of faecal donor instillation therapy for recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhoea. *Scand. J. Infect. Dis.* **42**, 857–861 (2010).
214. Zilberberg, M. D., Shorr, A. F., Micek, S. T., Doherty, J. A. & Kollef, M. H. *Clostridium difficile*-associated disease and mortality among the elderly critically ill. *Crit. Care Med.* **37**, 2583–2589 (2009).
215. Simor, A. E., Bradley, S. F., Strausbaugh, L. J., Crossley, K. & Nicolle, L. E. *Clostridium difficile* in long-term-care facilities for the elderly. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **23**, 696–703 (2002).
216. Kwon, S. S. *et al.* Clinical and molecular characteristics of community-acquired *Clostridium difficile* infections in comparison with those of hospital-acquired *C. difficile*. *Anaerobe* **48**, 42–46 (2017).
217. Weinke, T. *et al.* Epidemiology and Risk Factors of *Clostridioides difficile* Infections in Germany: A Health Claims Data Analysis. *Infect. Dis. Ther.* **12**, 1299–1317 (2023).
218. Prunty, M., Bukavina, L. & Mahran, A. Female Gender as a Risk Factor for Post-Operative *Clostridium difficile* Infection in Cystectomy Patients. (2017).
219. UK Health Security Agency. *Clostridioides difficile* infection: updated guidance on management and treatment. (2022).
220. Clark, T. & Wiselka, M. *Clostridium difficile* infection. *Clin. Med.* **8**, 544–547 (2008).
221. Schroeder, M. S. *Clostridium difficile*--associated diarrhea. *Am. Fam. Physician* **71**, 921–928 (2005).

222. Dubberke, E. R. & Wertheimer, A. I. Review of current literature on the economic burden of *Clostridium difficile* infection. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **30**, 57–66 (2009).
223. Hsien, M. T. In the clinic. *Clostridium difficile* Infection. *Ann. Intern. Med.* **153**, ITC41-15; quiz ITC416 (2010).
224. Hensgens, M. P. M., Goorhuis, A., Dekkers, O. M. & Kuijper, E. J. Time interval of increased risk for *Clostridium difficile* infection after exposure to antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* **67**, 742–748 (2012).
225. Freedberg, D. E., Lebwohl, B. & Abrams, J. A. The impact of proton pump inhibitors on the human gastrointestinal microbiome. *Clin. Lab. Med.* **34**, 771–785 (2014).
226. Singh, A., Cresci, G. A. & Kirby, D. F. Proton Pump Inhibitors: Risks and Rewards and Emerging Consequences to the Gut Microbiome. *Nutr. Clin. Pract. Off. Publ. Am. Soc. Parenter. Enter. Nutr.* **33**, 614–624 (2018).
227. Savarino, V., Di Mario, F. & Scarpignato, C. Proton pump inhibitors in GORD An overview of their pharmacology, efficacy and safety. *Pharmacol. Res.* **59**, 135–153 (2009).
228. Janarthanan, S., Ditah, I., Adler, D. G. & Ehrinpreis, M. N. *Clostridium difficile*-associated diarrhea and proton pump inhibitor therapy: a meta-analysis. *Am. J. Gastroenterol.* **107**, 1001–1010 (2012).
229. Kwok, C. S. *et al.* Risk of *Clostridium difficile* Infection With Acid Suppressing Drugs and Antibiotics: Meta-Analysis. *Off. J. Am. Coll. Gastroenterol. | ACG* **107**, (2012).
230. Wandall, J. H. Effects of omeprazole on neutrophil chemotaxis, super oxide production, degranulation, and translocation of cytochrome b-245. *Gut* **33**, 617–621 (1992).

231. Hung, Y.-P. *et al.* Proton-Pump Inhibitor Exposure Aggravates Clostridium difficile-Associated Colitis: Evidence From a Mouse Model. *J. Infect. Dis.* **212**, 654–663 (2015).
232. Nardino, R. J., Vender, R. J. & Herbert, P. N. Overuse of acid-suppressive therapy in hospitalized patients. *Am. J. Gastroenterol.* **95**, 3118–3122 (2000).
233. Herzig, S. J., Howell, M. D., Ngo, L. H. & Marcantonio, E. R. Acid-suppressive medication use and the risk for hospital-acquired pneumonia. *JAMA* **301**, 2120–2128 (2009).
234. Pham, C. Q. D., Regal, R. E., Bostwick, T. R. & Knauf, K. S. Acid suppressive therapy use on an inpatient internal medicine service. *Ann. Pharmacother.* **40**, 1261–1266 (2006).
235. Guerrero, D. M. *et al.* Acquisition of spores on gloved hands after contact with the skin of patients with Clostridium difficile infection and with environmental surfaces in their rooms. *Am. J. Infect. Control* **40**, 556–558 (2012).
236. Edwards, A. N. *et al.* Chemical and Stress Resistances of Clostridium difficile Spores and Vegetative Cells. *Front. Microbiol.* **7**, 1698 (2016).
237. van Prehn, J. *et al.* European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: 2021 update on the treatment guidance document for Clostridioides difficile infection in adults. *Clin. Microbiol. Infect.* **27**, S1–S21 (2021).
238. Bauer, M. P. *et al.* Clostridium difficile infection in Europe: a hospital-based survey. *Lancet (London, England)* **377**, 63–73 (2011).
239. Elmer, G. W. *et al.* Recurrent Clostridium Difficile Disease: Epidemiology and Clinical Characteristics. *Infect. Control & Hosp. Epidemiol.* **20**, 43–50 (1999).
240. Furuya-Kanamori, L. *et al.* Comorbidities, exposure to medications, and the risk of

- community-acquired clostridium difficile infection: A systematic review and meta-analysis. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **36**, 132–141 (2015).
241. Wanahita, A., Goldsmith, E. A., Marino, B. J. & Musher, D. M. Clostridium difficile infection in patients with unexplained leukocytosis. *Am. J. Med.* **115**, 543–546 (2003).
242. Wanahita, A., Goldsmith, E. A. & Musher, D. M. Conditions associated with leukocytosis in a tertiary care hospital, with particular attention to the role of infection caused by clostridium difficile. *Clin. Infect. Dis. an Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **34**, 1585–1592 (2002).
243. Bulusu, M., Narayan, S., Shetler, K. & Triadafilopoulos, G. Leukocytosis as a harbinger and surrogate marker of Clostridium difficile infection in hospitalized patients with diarrhea. *Am. J. Gastroenterol.* **95**, 3137–3141 (2000).
244. Vargas, E., Apewokin, S. & Madan, R. Role of the leukocyte response in normal and immunocompromised host after Clostridium difficile infection. *Anaerobe* **45**, 101–105 (2017).
245. Yeaman, M. R. The Role of Platelets in Antimicrobial Host Defense Michael. *Clin. Infect. Dis.* **25**, 951–968 (1997).
246. Klinger, M. H. F. Platelets and their interactions with other immune cells. *Anat Embryol* 1–11 (1997).
247. Lam, F. W. *et al.* Platelets and their interactions with other immune cells Fong. *Compr. Physiol.* **5**, 1265–1280 (2015).
248. Mihăilă, R. G. *et al.* Thrombin generation is increased in patients with Clostridium difficile colitis—a pilot study. *Biomarkers* **24**, 389–393 (2019).
249. Buchrits, S. *et al.* The importance of abnormal platelet count in patients with

- clostridioides difficile infection. *J. Clin. Med.* **10**, (2021).
250. Lee, D. Y. *et al.* Predictors of mortality after emergency colectomy for *Clostridium difficile* colitis: An analysis of ACS-NSQIP. *Ann. Surg.* **259**, 148–156 (2014).
251. Byrn, J. C. *et al.* Predictors of Mortality After Colectomy for Fulminant *Clostridium difficile* Colitis. *Med. Hist.* **143**, 150–154 (2012).
252. Nseir, W., Khamisy-Farah, R., Amara, A. & Farah, R. The prognostic value of inflammatory markers in *clostridium difficile*-associated diarrhea. *Isr. Med. Assoc. J.* **21**, 658–661 (2019).
253. Allegretti, J. R. *et al.* Clinical Predictors of Recurrence After Primary *Clostridioides difficile* Infection: A Prospective Cohort Study. *Dig. Dis. Sci.* **65**, 1761–1766 (2020).
254. Zhao, L. *et al.* High-level resistance of toxigenic *clostridioides difficile* genotype to macrolide-lincosamide-streptogramin B in community acquired patients in Eastern China. *Infect. Drug Resist.* **13**, 171–181 (2020).
255. Pant, C., Madonia, P. N., Jordan, P., Manas, K. & Bass, P. Harbingers for *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *J. Investig. Med.* **57**, 40–42 (2009).
256. Yan, D. *et al.* *Clostridium difficile* colonization and infection in patients with hepatic cirrhosis. *J. Med. Microbiol.* **66**, 1483–1488 (2017).
257. Phanchana, M. *et al.* Repurposing a platelet aggregation inhibitor ticagrelor as an antimicrobial against *Clostridioides difficile*. *Sci. Rep.* **10**, 1–8 (2020).
258. Lin, H. J. *et al.* Risk factors for *Clostridium difficile*-associated diarrhea among hospitalized adults with fecal toxigenic *C. difficile* colonization. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **48**, 183–189 (2015).
259. Castro-Córdova, P. *et al.* Entry of spores into intestinal epithelial cells contributes to

- recurrence of *Clostridioides difficile* infection. *Nat. Commun.* **12**, 1140 (2021).
260. Crouser, E. D. *et al.* A novel in vitro human granuloma model of sarcoidosis and latent tuberculosis infection. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **57**, 487–498 (2017).
261. Berry, S. B., Gower, M. S., Su, X., Seshadri, C. & Theberge, A. B. A Modular Microscale Granuloma Model for Immune-Microenvironment Signaling Studies in vitro. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **8**, 1–13 (2020).
262. Davis, D. M. & Sowinski, S. Membrane nanotubes: dynamic long-distance connections between animal cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 431–436 (2008).
263. Sherer, N. M. & Mothes, W. Cytonemes and tunneling nanotubules in cell-cell communication and viral pathogenesis. *Trends Cell Biol.* **18**, 414–420 (2008).
264. Dupont, M., Souriant, S., Lugo-Villarino, G., Maridonneau-Parini, I. & V erollet, C. Tunneling Nanotubes: Intimate Communication between Myeloid Cells. *Front. Immunol.* **9**, 43 (2018).
265. Malik, S. & Eugenin, E. A. Mechanisms of HIV Neuropathogenesis: Role of Cellular Communication Systems. *Curr. HIV Res.* **14**, 400–411 (2016).
266. Souriant, S. *et al.* Tuberculosis Exacerbates HIV-1 Infection through IL-10/STAT3-Dependent Tunneling Nanotube Formation in Macrophages. *Cell Rep.* **26**, 3586-3599.e7 (2019).
267. Hashimoto, M. *et al.* Potential Role of the Formation of Tunneling Nanotubes in HIV-1 Spread in Macrophages. *J. Immunol.* **196**, 1832–1841 (2016).
268. Eugenin, E. A., Gaskill, P. J. & Berman, J. W. Tunneling nanotubes (TNT) are induced by HIV-infection of macrophages: A potential mechanism for intercellular HIV trafficking. *Cell. Immunol.* **254**, 142–148 (2009).

269. Yurchenko, M. *et al.* SLAMF1 is required for TLR4-mediated TRAM-TRIF-dependent signaling in human macrophages. *J. Cell Biol.* **217**, 1411–1429 (2018).
270. Carter, G. P. *et al.* Defining the roles of TcdA and TcdB in localized gastrointestinal disease, systemic organ damage, and the host response during *Clostridium difficile* infections. *MBio* **6**, 1–10 (2015).
271. Jacob, S. S., Sebastian, J. C., Hiorns, D., Jacob, S. & Mukerjee, P. K. *Clostridium difficile* and acute respiratory distress syndrome. *Hear. Lung J. Acute Crit. Care* **33**, 265–268 (2004).
272. ZWIENER, R. J., BELKNAP, W. M. & QUAN, R. Severe pseudomembranous enterocolitis in a child. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **8**, 876–882 (1989).
273. De Wolfe, T. J., Kates, A. E., Barko, L., Darien, B. J. & Safdar, N. Modified Mouse Model of *Clostridioides difficile* Infection as a Platform for Probiotic Efficacy Studies. *Antimicrob. Agents Chemother.* **63**, 1–16 (2019).
274. Zhou, F. *et al.* Mice with inflammatory bowel disease are susceptible to *clostridium difficile* infection with severe disease outcomes. *Inflamm. Bowel Dis.* **24**, 573–582 (2018).
275. Pawlowski, S. W. *et al.* Murine model of *Clostridium difficile* infection with aged gnotobiotic C57BL/6 mice and a BI/NAP1 strain. *J. Infect. Dis.* **202**, 1708–1712 (2010).
276. Steele, J. *et al.* Systemic Dissemination of *Clostridium difficile* Toxins A and B Is Associated With Severe, Fatal Disease in Animal Models. *J. Infect. Dis.* **205**, 384–391 (2012).
277. Wypych, T. P., Wickramasinghe, L. C. & Marsland, B. J. The influence of the microbiome on respiratory health. *Nat. Immunol.* **20**, 1279–1290 (2019).

278. Roberts, C. L. *et al.* Translocation of Crohn's disease & Escherichia coli; across M-cells: contrasting effects of soluble plant fibres and emulsifiers. *Gut* **59**, 1331 LP – 1339 (2010).
279. Machiels, K. *et al.* A decrease of the butyrate-producing species & Roseburia hominis & Faecalibacterium prausnitzii; defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut* **63**, 1275 LP – 1283 (2014).
280. Liu, Q., Tian, X., Maruyama, D., Arjomandi, M. & Prakash, A. Lung immune tone via gut-lung axis: Gut-derived LPS and short-chain fatty acids' immunometabolic regulation of lung IL-1 β , FFAR2, and FFAR3 expression. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **321**, L65–L78 (2021).
281. Liu, Q., Tian, X., Maruyama, D., Arjomandi, M. & Prakash, A. Lung immune tone via gut-lung axis: Gut-derived LPS and short-chain fatty acids' immunometabolic regulation of lung IL-1 β , FFAR2, and FFAR3 expression. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **321**, L65–L78 (2021).
282. Lee, S. H., Kwon, J. eun & Cho, M.-L. Immunological pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Intest Res* **16**, 26–42 (2018).
283. Birring, S. S. *et al.* Idiopathic chronic cough: association with organ specific autoimmune disease and bronchoalveolar lymphocytosis. *Thorax* **58**, 1066 LP – 1070 (2003).
284. Deitch, E. A. Gut lymph and lymphatics: a source of factors leading to organ injury and dysfunction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1207**, E103–E111 (2010).
285. Mateer, S. W. *et al.* Potential mechanisms regulating pulmonary pathology in inflammatory bowel disease. *J. Leukoc. Biol.* **98**, 727–737 (2015).

286. Hart, A. L. *et al.* Homing of immune cells: Role in homeostasis and intestinal inflammation. *Inflamm. Bowel Dis.* **16**, 1969–1977 (2010).
287. Wypych, T. P., Marsland, B. J. & Ubags, N. D. J. The impact of diet on immunity and respiratory diseases. *Ann. Am. Thorac. Soc.* **14**, S339–S347 (2017).
288. Gadek, J. E., Fells, G. A., Zimmerman, R. L., Rennard, S. I. & Crystal, R. G. Antielastases of the human alveolar structures. Implications for the protease-antiprotease theory of emphysema. *J. Clin. Invest.* **68**, 889–898 (1981).
289. Adenis, A. *et al.* Increased pulmonary and intestinal permeability in Crohn's disease. *Gut* **33**, 678 LP – 682 (1992).