



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

PROGRAMA EDUCATIVO:

LICENCIATURA EN BIOMEDICINA

TESIS PROFESIONAL

“Análisis metagenómico de la microbiota intestinal mexicana y su relación con la infección de *Clostridioides difficile* (ICD) y el estado de portador asintomático”

PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIATURA EN BIOMEDICINA

PRESENTA

ARANZAZU DEL PILAR ROMANO VALERIO

DIRECTOR EXPERTO:

DC. CLUADIA FABIOLA MARTÍNEZ DE LA PEÑA

FECHA TESIS:

NOVIEMBRE 2023

**CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS
MICROBIOLÓGICAS ICUAP**

PUEBLA DE ZARAGOZA



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

**FACULTAD DE MEDICINA
LICENCIATURA EN BIOMEDICINA**

TESIS PROFESIONAL

**“ANÁLISIS METAGENÓMICO DE LA MICROBIOTA INTESTINAL MEXICANA Y
SU RELACIÓN CON LA INFECCIÓN DE *CLOSTRIDIODES DIFFICILE* (ICD) Y
EL ESTADO DE PORTADOR ASINTOMÁTICO”**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIADA EN BIOMEDICINA

PRESENTA:

ARANZAZU DEL PILAR ROMANO VALERIO


**ASESORA EXPERTA Y
METODOLÓGICA:**

DC. CLUADIA FABIOLA MARTÍNEZ DE LA PEÑA 

REVISOR:

DC. MARGARITA MARÍA DE LA PAZ ARENAS HERNÁNDEZ 

REVISOR:

DC. PATRICIA LOZANO ZARAIN 

FECHA TESIS:

NOVIEMBRE 2023

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS, ICUAP



BUAP

Of.No. CICM-289/2023
Asunto: Aprobación de tesis

D.C. Lis Rosales Báez

Secretaría de investigación y Estudios de Posgrado
Facultad de Medicina
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
Presente:

Por medio de la presente le envió un cordial saludo, y al mismo tiempo le informo que el proyecto de tesis Experimental de la Licenciatura Titulada: **“Análisis Metagenómico de la microbiota intestinal mexicana y su relación con la infección de Clostridioides difficile (ICD) y el estado de portador asintomático”**, del alumno **Romano Valerio Aranzazu del Pilar** con número de matrícula **201608561**, bajo la dirección de la **Dra. Claudia Fabiola Martínez de la Peña**, ha concluido obteniéndose el trabajo final de tesis. Por lo que solicito de la manera más atenta se brinden las facilidades administrativas correspondientes a la continuación del proceso de titulación.

Sin otro particular por el momento y agradeciendo de antemano una respuesta favorable, me despido y quedo de Usted.

Atentamente

“Pensar Bien, Para vivir Mejor”

H. Puebla de Z., a 07 de diciembre de 2023

Comité revisor del Protocolo de Tesis:

Dra. Margarita María de la Paz Arenas Hernández

Dra. Patricia Lozano Zarain

D.C. Liliana López Pliego

Profesor-Investigador
Laboratorio de Genética Molecular y Microbiana
CICM-ICUAP-BUAP



c.c.p. Archivo

Centro de Investigaciones en
Ciencias Microbiológicas
Instituto de Ciencias (ICUAP)

Edificio IC11
Ciudad Universitaria
Col. San Manuel, Puebla, Pue. C.P. 72570
Tel. 222 229 55 00 Ext. 2521

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por siempre creer en mí, apoyarme desde pequeña en mi sueño de ser una científica comprándome mis juegos de química y mi microscopio y por darnos a mi hermana y a mí una educación basada en el amor a la familia, el respeto, la confianza y la responsabilidad.

A mi hermana Pilita por ser una inspiración para mí, por ser mi mejor amiga, por sus regaños y consejos siempre para ser una mejor persona, pero sobre todo por su apoyo incondicional.

A toda mi familia por su amor, por las palabras de ánimo en todo momento y por siempre estar cuando los necesito.

A la Dra. Claudia por recibirme con los brazos abiertos desde mi rotación y cuando decidí integrarme a su laboratorio, por la confianza en mí para el desarrollo de este proyecto, por sus enseñanzas y su calidad humana que la caracteriza.

A Israel por integrarme al laboratorio virtual del INMEGEN, por los curso y manuales que me brindo para aprender a programar y por la paciencia para resolver mis dudas durante el proceso.

A mis compañeros de laboratorio Dulce y Charlen por la bonita amistad que creamos y todo el apoyo me dieron.

A mis amigas Angélica, Dulce, Tania y Gabriela por todos estos años de hermandad, risas, apoyo en las buenas y en las malas, deseo siempre tenerlas en mi vida.

A todos los docentes que fueron parte de mi camino en la universidad por transmitirme los conocimientos necesarios para por llegar a ser una profesionista y por el apoyo que me brindaron en su momento para poder terminar de la mejor manera.

ÍNDICE

1. RESUMEN

2. INTRODUCCIÓN

2.1. *Clostridioides difficile*. Modelo de estudio

2.2. Factores de virulencia

2.2.1. Toxigénicos

2.2.2. No toxigénicos

2.3. Infección por *C. difficile* (ICD)

2.4. Factores de riesgo

2.5. Fisiopatología

2.6. Diagnóstico

2.6.1. Pruebas de detección rápida

2.6.2. Otras pruebas de detección

2.7. Tratamiento

2.7.1. Antibioterapia

2.7.2. Terapia alternativa

2.7.3. Trasplante de microbiota fecal (FMT)

2.8. Colonización asintomática por *C. difficile*

2.8.1. Estado de colonización asintomática por *C. difficile*

2.8.2. Mecanismo de colonización asintomática por *C. difficile*

2.9. Microbiota intestinal

2.9.1. La microbiota intestinal y su relación con el estado de salud

2.9.2. Métodos de estudio de la microbiota intestinal. Secuenciación metagenómica

2.9.3. Gen 16S

3. ANTECEDENTES

3.1. Antecedentes generales

3.1.1. Epidemiología de *C. difficile* y la ICD

3.2. Antecedentes específicos

3.2.1. Mecanismos de resistencia a la colonización de *C. difficile* y el desarrollo de ICD en la microbiota intestinal

3.2.2. Alteraciones de la microbiota intestinal en pacientes con ICD

3.2.3. Alteraciones de la microbiota intestinal en pacientes portadores de *C. difficile*

4. JUSTIFICACIÓN

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

6. HIPÓTESIS CIENTÍFICA

7. OBJETIVOS

7.1. Objetivo general

7.2. Objetivos específicos

8. MATERIAL Y MÉTODOS

8.1. Estrategia de trabajo

8.2. Técnicas y procedimientos

8.2.1. Selección de muestras fecales y definición de condiciones

8.2.2. Extracción de ADN metagenómico de muestras

8.2.3. Medición de calidad y cantidad de ADN extraído

8.2.4. Amplificación y secuenciación de ADN

8.2.5. Análisis Bioinformático de las secuencias del gen 16S, asignación taxonómica y creación de gráficos

9. RESULTADOS

9.1. Selección de población de estudio

9.2. Extracción de ADN metagenómico de muestras seleccionadas

9.3. Comparación taxonómica microbiana entre pacientes sintomáticos a ICD (S) y portadores asintomáticos de *C. difficile* (A)

9.3.1. Diferencias a nivel de phylum entre los grupos S y A

9.3.2. Diferencias a nivel de familia entre los grupos S y A

9.3.3. Diferencias a nivel de género entre los grupos S y A

9.4. Diversidad beta de la microbiota intestinal

9.5. Relación contrastante entre el grupo de controles negativos (C) y portadores asintomáticos de *C. difficile* (A)

9.5.1. Diferencias a nivel de phylum entre los grupos C y A

9.5.2. Diferencias a nivel de familia entre los grupos C y A

9.5.3. Diferencias a nivel de género entre los grupos C y A

10. DISCUSIÓN

11. CONCLUSIONES

12. BIBLIOGRAFÍA

13. ANEXOS

13.1. Diagrama de trabajo para QIIME2

13.2. Scrip para análisis metagenómico y asignación taxonómica a microbiota intestinal en QIIME2

13.3. Scrip para generar gráficos de barra de abundancia relativa de “x” taxon en RStudio

13.4. Tabla 10 y 13 COMPLETA. Cálculo de media de las abundancias relativas y número de muestras de familias presentes en los grupos Control, S, A y suma de los grupos S y A.

13.5. Tabla 11 y 13 COMPLETA. Cálculo de media de las abundancias relativas y número de muestras de géneros presentes en los grupos Control, S, A y suma de los grupos S y A.

ABREVIATURAS

Símbolo	Definición
<i>tcdA</i>	Gen de la toxina A
<i>tcdB</i>	Gen de la toxina B
PacLoc	Locus de patogenicidad de las toxinas A y B
<i>tcdR</i>	Gen regulador positivo
<i>tcdE</i>	Gen de Holina
<i>tcdC</i>	Gen regulador negativo
GTPasas	Guanosin trifosfatas
CDT	Toxina binaria
CdtLoc	Locus de patogenicidad de CDT
<i>cdtR</i>	Gen regulador positivo
S-layers	Capas superficiales celulares
FbpA	Proteína fijadora de fibronectina
di-GMP	di-guanosínmonofosfato cíclico
<i>flgB</i>	Operón para la expresión del flagelo
mm ³	Milímetro cúbico
gr/dl	Gramos por decilitro
mmol/l	Miles moles sobre litro
EII	Enfermedad inflamatoria intestinal
IBP	Inhibidores de la bomba de protones
CspC	Receptor germinativo
EIA	Inmunoensayo enzimático
ICT	Inmunocromatografía
GDH	Glutamato deshidrogenasa
AAN	Amplificación de ácidos nucleicos
CCFA	Agar clicloserina, cefoxitina y fructosa
CCEY	Agar yema de huevo, cicloserina y cefoxitina
Tpi	Triosa fosfato isomerasa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
VO	Vía oral
EV	Vía endovenosa

FMT	Trasplante de microbiota fecal
FDA	Administración de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos
IgG, M, A	Inmunoglobulina G, M, A
ROS	Especies reactivas de oxígeno
AP-1	Proteína activadora 1
MAPK	mitogen-activated protein kinases
IL-1 β , 8, 12, 13	Interleucina 1 beta, 8, 12, 13
ICL	Células linfoides innatas
IFN γ	Interferón gamma
AGCC	Ácidos grasos de cadena corta
GPR41 y GP43	Receptores para la estimulación de hormonas endocrinas
GLP-1	Péptido similar al glucagón tipo 1/glucagon-like peptide-1
PYY	Péptido con dos residuos de tirosina (Y)
GABA	Neurotransmisor ácido γ -aminobutírico
NGS	Secuenciación de nueva generación
CDCA	Ácido quenodesoxicólico
DHPL	Cromatografía líquida desnaturalizante de alto rendimiento
S	Grupo de sintomáticos a ICD
A	Grupo de portadores asintomáticos a <i>C. difficile</i>
C	Grupo control negativo

1. RESUMEN

Clostridioides difficile es un bacilo Gram positivo, anaerobio estricto, formador de esporas, de transmisión vía fecal-oral, su principal factor de virulencia es la producción de sus toxinas A y B, y es el causante principal de la diarrea infecciosa asociada a la exposición de antibióticos. La infección por *C. difficile* (ICD) es una enfermedad mediada por las toxinas y caracterizada por episodios de diarrea de leves a severos con una colitis pseudomembranosa, megacolon tóxico o provocar la muerte del paciente.

La epidemiología de *C. difficile* y de la ICD ha cambiado mucho en los últimos años, provocando cambios en la presencia de casos de ICD, en su sintomatología, la respuesta al tratamiento y las recurrencias de la ICD. También se ha alertado el aumento de casos de la colonización de *C. difficile* y de la ICD adquirida en la comunidad y los nuevos posibles factores de riesgo como los supresores de ácido gástrico o el uso de agentes de higiene de manos a base de alcohol. Los pacientes colonizados por *C. difficile* pueden estar protegidos del desarrollo de la ICD por una respuesta inmune humoral a las toxinas, bacterias protectoras en su microbiota intestinal entre otros mecanismos propuestos que aún no están del todo claros pero que frenan la transición de la colonización al desarrollo de la patogenia, evitando el desarrollo de la sintomatología clínica manteniendo a estos pacientes como asintomáticos a *C. difficile*.

La microbiota es indispensable para el correcto funcionamiento corporal, el desarrollo de la inmunidad y la nutrición, su desequilibrio tiene un gran impacto en el desarrollo de enfermedades metabólicas, gastrointestinales y en los últimos años se ha reportado que también tienen repercusiones en la salud mental. El avance y la creación de nuevas técnicas de secuenciación, así como el desarrollo de herramientas bioinformáticas han permitido no sólo describir la composición de la microbiota intestinal, sino también las funciones metabólicas de las que proveen al huésped. Con la metagenómica se puede analizar la diversidad de genomas microbianos para la comprensión de su complejidad y su papel en la salud y la enfermedad.

El objetivo de este estudio fue la caracterización de la microbiota intestinal a partir de muestras de heces por medio de la secuenciación de la región V3-V4 del gel 16S ARNr de 3 grupos de individuos, pacientes sintomáticos a ICD (S, n=6), pacientes portadores

asintomático de *C. difficile* (A, n=7) y pacientes clínicamente sanos controles negativos (C, n=2) y a través de un análisis bioinformático empleando los software QIIME2 y RStudio. Con estos dos programas se identificó la diversidad y riqueza bacteriana de las muestras en los niveles taxonómico filo, familia y género para hacer una comparación en la composición de la microbiota intestinal entre los tres grupos de estudio. Esta caracterización también nos ayudó a identificar el patrón de disbiosis de la microbiota intestinal para describir los posibles mecanismos de bacterias protectoras o predisponentes al desarrollo de la ICD. Así también nos permitió describir la importancia de las bacterias comensales y los posibles mecanismos que usan para inhibir la colonización de *C. difficile* y el desarrollo de la ICD.

Palabras clave: *Clostridium difficile*, Infección por *Clostridium difficile*, colonización asintomática, microbiota intestinal, México

2. INTRODUCCIÓN

2.1. *Clostridioides difficile*. Modelo de estudio

Clostridioides difficile es un bacilo Gram positivo, de transmisión vía fecal-oral, anaerobio estricto y esporulado, pertenece al *phylum* Firmicutes, clase *Clostridia*, orden *Clostridiales*, familia *Clostridiaceae* (Peptococcaceae) y al género *Clostridium* (*Peptoclostridium*, *Clostridioides*) (Figura 1). Fue descrito por primera vez en 1935 por Hall y O'Toole al aislarla de heces de recién nacidos, el nombre dado a la especie refleja la dificultad de su aislamiento de otras bacterias fecales anaerobias facultativas; sin embargo, fue hasta 1977 que se identificó como una bacteria patógena causante de colitis asociada a antibióticos. Actualmente es la causa más común de la enfermedad/diarrea asociada a *C. difficile* o el término más reciente infección por *C. difficile* o ICD. Es un patógeno nosocomial muy importante en América del Norte y Europa debido al aumento de casos graves de ICD en los últimos años. La sintomatología presentada en la infección por *C. difficile* va desde episodios leves-severos de diarrea hasta colitis pseudomembranosa y megacolon tóxico causando la muerte del paciente (Rodríguez Pardo *et al.*, 2013; Curry, 2017; Benoit Guery *et al.*, 2019).

Una característica en particular de esta especie de *Clostridioides* es su capacidad de descarboxilar el ácido parahidroxifenilacético para producir p-cresol dándole así un olor característico en los cultivos de esta bacteria a alquitrán o cerdo. En los aislamientos las colonias de *C. difficile* tienen un ancho de 2 a 5 mm de color blanco o amarillento, en algunos casos son difíciles de distinguir debido a que cuando pasa a su estado vegetativo sus colonias suelen ser incoloras y en ambos casos emiten fluorescencia bajo iluminación ultravioleta (Figura 1) (Wiep Klaas Smits *et al.*, 2016; Curry, 2017).

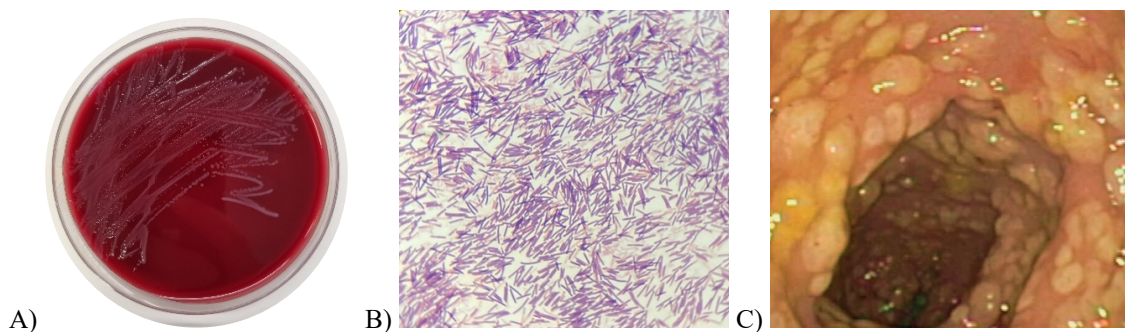


Figura 1. Microbiología de *C. difficile* A) Colonias de cultivo de *C. difficile* en medio agar sangre; B) Tinción Gram positiva de bacilos de *C. difficile*; C) Endoscopia de colitis pseudomembranosa por *C. difficile* (Kuipers & Surawicz, 2008).

2.2. Factores de virulencia

2.2.1. Toxigénicos

- **Toxina A (TcdA) y Toxina B (TcdB)**

Los principales y más importantes factores de virulencia de *C. difficile* son sus toxinas A y B codificadas por los genes *tcdA* (308 kb) y *tcdB* (270 kb) localizados dentro de un locus de patogenicidad llamado PaLoc (19,6 kb) en el que también se encuentran otros tres genes reguladores de estas toxinas; *tcdR* codifica para un factor sigma de ARN polimerasa con un papel de regulador positivo para la expresión de los genes *tcdA* y *tcdB* de las toxinas; *tcdE* codifica una holina con papel en la liberación extracelular de las toxinas a través de poros en la membrana en cepas toxigénicas; por último *tcdC* se ha identificado como un factor anti-sigma con un papel de regulador negativo de la síntesis de las toxinas interfiriendo con la capacidad de unión de *tcdR* a la ARN polimerasa para el reconocimiento de los promotores *tcdA* y *tcdB*, sin embargo el papel de este gen aún no es del todo claro (Figura 2A) (Janoir, 2016).

TcdA es una enterotoxina mientras que TcdB es una citotoxina, sin embargo, ambas tienen actividad glucosiltransferasa inactivando las Rho CGTPasas de las células dianas. Por su mecanismo de acción es parecido ya que en conjunto ambas las toxinas afectan la actina del citoesqueleto provocando muerte celular, la producción del factor de necrosis tumoral alfa e interleucinas proinflamatorias. Estas interleucinas/toda esta respuesta desencadenando la respuesta inflamatoria asociada a la formación de pseudomembranas. El mecanismo de acción de las toxinas en general es el aumento de la permeabilidad del epitelio intestinal e inhibición de la síntesis de proteínas, dañan las puntas de las vellosidades y las membranas del borde llegando a causar una erosión completa de la mucosa. (Poxton *et al.*, 2001; Awad *et al.*, 2014).

De igual forma ambas toxinas tienen una similitud del 66% en su secuencia genética de aminoácidos y comparten dominios conservados, entre ellos está un dominio catalítico glucosiltransferasa en el extremo N-terminal, un dominio de cisteína proteasa necesario para

su autoproceso y liberación del dominio catalítico al citosol de las células infectadas. Además, tienen un dominio hidrofóbico para la formación del poro y la introducción de las toxinas en endosomas previo a su salida al citosol y por último un dominio C-terminal de unión al receptor en la célula diana (Jank & Klaus Aktories, 2008). Toxinas tipo AB donde la región catalítica es liberada al citosol y se incorpora glucosa a las GTPasas como las proteínas Rho y Rac para la regularización de los procesos de señalización implicados en el mantenimiento de la barrera epitelial Las toxinas una vez unidas a sus receptores son introducidos a las células diana por endocitosis ocurriendo la digestión autoproteolítica provocado por la separación de la extremo N-terminal de la toxina, y las interacciones intracelulares, estas proteínas también participan en la fagocitosis y la producción de citocinas provocando la apoptosis de las células epiteliales y la alteración de uniones estrechas facilitando la migración de neutrófilos hacia el colón provocando la respuesta inflamatoria característica de la colitis (Voth & Ballard, 2005).

Por mucho tiempo se definió a TcdA como el factor de virulencia principal de *C. difficile*, sin embargo, actuales estudios han demostrado de TcdA potencializa la actividad de TcdB, demostrando que ambas toxinas actúan de manera sinérgica, ya que los efectos provocados por TcdB ocurren previos a que TcdA provoque daño en el epitelio intestinal. En otro estudio se encontró que no todas las cepas de *C. difficile* producen TcdA y solo se vio una expresión de TcdB, estas cepas causaron una ICD más grave que las cepas que producen ambas toxinas por lo que se concluyó que TcdB tiene un papel más importante en el desarrollo de la enfermedad (Lyerly *et al.*, 1985; Savidge *et al.*, 2003; Drudy *et al.*, 2007). No hay un consenso en la actividad pero se ha visto

MAS RESUMIDO

- **Toxina binaria (CDT)**

Es una transferasa de *C. difficile* (CDT) o también llamada toxina binaria, forma parte de las toxinas clostridiales de tipo ADP ribosilantes y se compone de dos subunidades una subunidad catalítica CDTa con actividad ADP ribosiltransferasa específica de actina y su componente de unión CDTb que permite el paso de la subunidad catalítica al citosol, por último, los genes que codifican estas dos subunidades *cdtA* y *cdtB* están dentro del locus *Cdt*

(CdtLoc 6.2 kb) junto con el gen *cdtR* que codifica una proteína reguladora positiva (Figura 2B) (Awad *et al.*, 2014).

La CDT se encuentra en el 20% de las cepas de *C. difficile* no causante de brotes, sin embargo, sus genes codificantes siempre están presentes en los ribotipos epidémicos como las cepas 027 y 078 lo que la hace ser un factor de virulencia importante de estudio ya que su mecanismo en la patogénesis no está descrito del todo y se encuentra en debate. Un estudio reportó que a bajas dosis de esta toxina se producen unas protuberancias en la superficie de las células epiteliales que aumentan la adherencia de *C. difficile*, debido, a esto se supone que la producción de esta toxina en las cepas se relaciona con resultados graves de la ICD potencializando la toxicidad de las *tcdA* y *tcdB*. (Janoir, 2016).

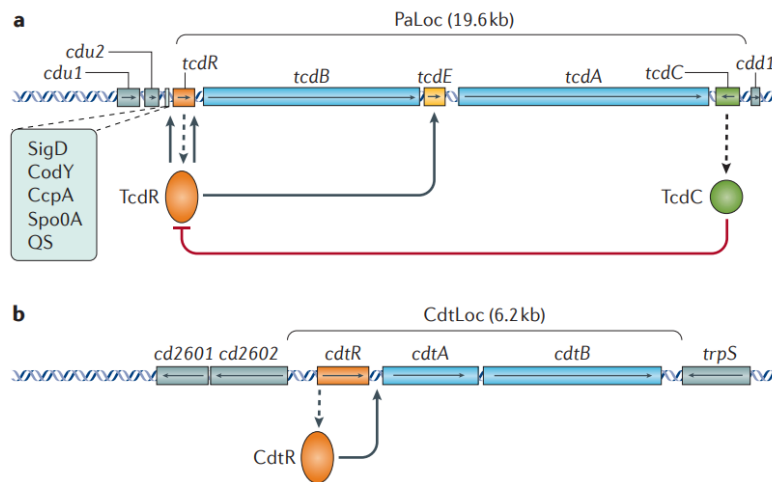


Figura 2. Locus de patogenicidad y genes reguladores de las toxinas A, B y toxina binaria de *C. difficile*. a) Representación del locus de patogenicidad PaLoc donde se encuentra el gen para la expresión de la toxina A, (*tcdA*) y el gen para la toxina B, (*tcdB*) ambos en color azul con sus genes reguladores positivo al costado izquierdo *tcdR* y negativo al costado derecho *tcdC*, los genes en color gris se encuentran fuera el locus PaLoc; b) Representación del locus de patogenicidad CdtLoc donde se encuentran los genes de las toxinas A y B en azul y el gen regulador *cdtR*, los genes en color gris se encuentran fuera del locus CdtLoc (Wiep Klaas Smits *et al.*, 2016).

- **Endoesporas**

La espora es la partícula infecciosa para la transmisión de *C. difficile* y establecimiento de la ICD. *C. difficile* produce esporas en condiciones de estrés siendo una forma latente de esta bacteria, se encuentran en el medio ambiente comunitario y hospitalario, se

excretan en las heces de los humanos y de los animales. Las esporas son muy difíciles de eliminar ya que son resistentes a muchos factores como el calor, la radiación y desinfectantes químicos; esto debido a su estructura ya que cada spora tiene dos capas, una capa gruesa de peptidoglicano que rodea al núcleo el cual contiene una copia completa del genoma y una capa externa llamada exosporium. La esporulación en el intestino durante el ciclo biológico de *C. difficile* conlleva a que la subpoblación de esta bacteria persista por periodos prolongados incluso en un ambiente aeróbico hostil facilitando la transmisión del microorganismo (Awad *et al.*, 2014)

2.2.2. No toxigénicos

- **Proteínas de la capa S de la pared celular**

La adherencia de *C. difficile* a las células del epitelio intestinal es un factor de virulencia muy importante para la colonización de esta bacteria y posteriormente el desarrollo de la ICD. Las capas superficiales celulares también llamadas S-layers son monómeros de glicoproteínas con capacidad inmunogénica encontradas en la superficie de muchas bacterias, estas capas en especial para *C. difficile* están constituidas por 2 subunidades proteicas llamadas HMW (siglas en inglés de alto peso molecular) y LMW (siglas en inglés de bajo peso molecular) ambas derivadas del precursor polipeptídico SlpA por la acción de la proteasa Cwp84, estas subunidades son igual de importantes para la adherencia a las células epiteliales (Awad *et al.*, 2014).

Cwp34 es una cisteína proteasa de la pared celular de *C. difficil* que participa en el mantenimiento de las S-layers y con capacidad de degradar la matriz celular interviniendo en el proceso de diseminación durante el desarrollo de la ICD. Otra proteína importante de la pared celular y en la adherencia celular es Cwp66 propuesta como una proteína de choque térmico y CwpV proteína que ayuda a la formación de biofilms en el colon de hospedador (Janoir *et al.*, 2007; Reynolds *et al.*, 2011).

- **Proteína de unión a fibronectina (FbpA)**

La fibronectina es una glicoproteína importante en la adhesión de *C. difficile*, este microorganismo se une a ella mediante la proteína fijadora de fibronectina FbpA. Esta

proteína se encuentra en la mayoría de las cepas ya que su gen codificante es conservado en los aislados estudiados, sin embargo, su papel aún no es del todo claro (Dapa *et al.*, 2013).

- **Flagelos y pilis**

Son pocas las cepas de *C. difficile* a las que se les ha descrito que presentan movilidad a través de la presencia de flagelos, estos ayudan a que la adherencia sea más efectiva a las células epiteliales del colon y en cepas donde se ha observado la falta de expresión de flagelos han mostrado una deficiencia en la adherencia de la bacteria a las células.

La expresión del flagelo de *C. difficile* está regulada por di-guanosín monofosfato cíclico (di-GMPc) actuando como un ligando específico y se une a un riboswitch río arriba del operón *flgB* para la formación temprana del flagelo, al mismo tiempo di-GMPc activa un segundo riboswitch para iniciar la expresión del pili tipo IV que va a interactuar con el epitelio del colon y ayudar a la formación de biofilms; de esta forma el Di-GMPc actúa como un regulador ya que a niveles adecuados intracelular *C. difficile* puede estar en un estado móvil y productor de toxinas o a niveles altos intracelular se reprime la expresión del flagelo por lo tanto se pierde la movilidad de la bacteria (Tasteyre *et al.*, 2001; Bordeleau *et al.*, 2015).

Las dos proteínas flagelares mejor caracterizadas son la flagelina FliC y la proteína flagelar caperuza FliD. Hasta hace poco los flagelos de *C. difficile* había estado relacionado solo en el proceso de colonización en el huésped, sin embargo, el estudio de esta estructura sugiere que tienen un papel más directo en la virulencia a través de la modulación de la expresión de las toxinas de *C. difficile* en lugar de solo proporcionar motilidad hacia los nutrientes disponibles en el colon (Soza *et al.*, 2013; Stevensoon *et al.*, 2015).

El pili tipo IV es un tipo de apéndice de la superficie bacteriana que está involucrado en la unión a la superficie de las células, la motilidad contractil basada en la superficie, la formación de biofilms, las interacciones célula-célula y la transferencia de ADN. Se ha caracterizado mejor en bacterias Gram negativas que en Gram positivas, en estas últimas se identificaron por primera vez en *Ruminococcus albus*, posteriormente se observaron en *Clostridium perfringens* y se identificaron genes para este tipo de pili en el genoma de *C. difficile* el cual codifica para 4 formas de pilis de este tipo. Las subunidades estructurales del pili tipo IV en *C. difficile* se denominan pilinas y se componen principalmente de pilina PilA1

siendo esta la principal subunidad de su estructura y también es muy importante para la autoasociación de la bacteria previo al desarrollo de biofilms. (Maldarelli *et al.*, 2016).

2.3. Infección por *C. difficile* (ICD)

Por definición la infección por *C. difficile* (ICD) es una enfermedad mediada por las toxinas de este patógeno y caracterizada por episodios de diarrea de leves a severas (Donskey *et al.*, 2015). El cuadro clínico de la ICD es muy variado ya que va desde la colonización asintomática, diarrea leve o moderada, hasta colitis pseudomembranosa y megacolon tóxico provocando la muerte del paciente. Dentro de las características clínicas además de la diarrea están el dolor abdominal, fiebre, náuseas y vómitos, debilidad y pérdida del apetito (Figura 3). En los casos severos de la ICD los síntomas suelen ser potencialmente mortales como una severa deshidratación, distensión abdominal, hipoalbuminemia con edema periférico y shock circulatorio posterior. Además, entre otras complicaciones graves están perforación de colon, parálisis intestinal, megacolon tóxico y sepsis (Leffler & Lamont, 2015; Yu *et al.*, 2015; Czepiel *et al.*, 2019)

La ICD se clasifica de acuerdo con su severidad tomando en cuenta la sintomatología y parámetros de resultados de laboratorios que tenga el paciente, es importante ubicar la severidad de la enfermedad para una correcta elección del tratamiento. Para una ICD leve a moderada se considera que el paciente haya tenido menos de 6 deposiciones al día con una carga de leucocitosis $<15000/\text{mm}^3$; ICD severa se consideran más de 6 deposiciones al día, leucocitosis $>15000/\text{mm}^3$ e hipoalbuminemia (albúmina $<3 \text{ gr/dl}$); por último en una ICD severa a complicada se consideran el ingreso a unidad de cuidados intensivos, hipotensión con o sin drogas vasoactivas, fiebre $>35^\circ\text{C}$, íleo (interrupción transitoria/aguda del peristaltismo intestinal), leucocitosis $>35000/\text{mm}^3$ o $<200/\text{mm}^3$, lactato $>2.2\text{mmol/l}$ y evidencia de falla de órgano (L. Clifford McDonald *et al.*, 2018).



Figura 3. Endoscopia de pseudomembras blanca-amarillentas en el colon características de ICD (Gil & Vázquez, 2010).

2.4. Factores de riesgo

Los factores de riesgo para el desarrollo de ICD más importantes son: la exposición a antibióticos, edad avanzada, estancia prolongada en hospitalización y enfermedades crónico-degenerativas subyacentes del paciente (Menéndez *et al.*, 2016).

Los antibióticos relacionados como factor de riesgo para la ICD son el metronidazol y la vancomicina que son utilizados para su tratamiento. Además de estos se encuentran las penicilinas y cefalosporinas de amplio espectro, sin embargo, la clindamicina y las fluoroquinolonas son los que presentan un mayor riesgo al desarrollo de ICD (Tabla 1). Ante una mayor exposición a antibióticos, mayor es el riesgo de desarrollo de ICD, este riesgo es de 8 a 10 veces mayor si esta exposición llega a ser de 4 semanas y se eleva el riesgo 3 veces si esta supera los 2 meses (Hensgens *et al.*, 2011).

Tabla 1. Antibióticos relacionados a la infección por *C. difficile*.

MUY FRECUENTES	FRECUENTES	POCO FRECUENTES
Ampicilina	Quinolonas	Vancomicina
Amoxicilina	Macrólidos	Metronidazol
Cefalosporinas	Tetraciclinas	Aminoglucósidos
Clindamicina	Cloranfenicol	Rifampicina
	Trimetoprim	Teicoplanina

(S. Lital Meyer *et al.*, 2014)

La edad del paciente también tiene un papel muy importante, se ha reportado que a partir de los 65 en adelante el riesgo de desarrollo de ICD aumenta de 5 a 10 veces en comparación con los pacientes menores de 65 años, sin embargo, se han reportado un número significativo de casos de ICD en pacientes jóvenes adquirida en la comunidad (Czepiel *et al.*, 2015).

Durante la estancia hospitalaria la incidencia de ICD se encuentra entre el 2,1% y el 20%, este porcentaje va en aumento cuando la estancia es más prolongada, sumando las enfermedades crónico-degenerativas que pudiera tener el paciente con una respuesta inmunológica debilitada como VIH SIDA, cáncer o pacientes con algún trasplante y/o que estén tomando inmunosupresores (Czepiel *et al.*, 2019).

Otros factores de riesgo son pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (EII) debido a su disbiosis intestinal que se genera en esta enfermedad, aumentando el riesgo de desarrollar ICD y una colitis ulcerosa. Otros factores son la cirugía digestiva, sondas nasogástricas y el uso de inhibidores de la bomba de protones (IBP), este último se ha asociado a dos veces más el riesgo del desarrollo de ICD ya que al suprimir la acidez gástrica se favorece el paso de *C. difficile* en su forma vegetativa para su llegada al colon (S. Lital Meyer *et al.*, 2014).

2.5. Fisiopatología

La transmisión de *C. difficile* es por vía oral-fecal, las esporas y células vegetativas de este patógeno son ingeridas por la boca llegando al estómago donde el ambiente ácido elimina la mayoría de las células vegetativas. Las esporas al llegar al duodeno germinan para posteriormente colonizar el colon y comenzar la producción de toxinas, nuevas esporas y células vegetativas, las cuales son excretadas en las heces del paciente (Figura 4) (Smits *et al.*, 2016).

Las esporas de *C. difficile* se consideran como vehículo infeccioso ya que son células latentes muy resistentes a las condiciones ambientales, el calor, desinfectantes y a una gran variedad de antimicrobianos a diferencia de las células vegetativas. Las esporas al llegar al intestino necesitan de los ácidos biliares primarios del hígado que se encuentran en él para la inducción de su germinación como el taurocolato por parte del receptor de ácidos biliares CspC, sin embargo, este receptor es inhibido por los ácidos biliares secundarios como el ácido litocólico o el ácido desoxicólico (Abt *et al.*, 2016).

En cuanto al crecimiento de las células vegetativas de *C. difficile* este se da debido a la cascada proteolítica que provoca la liberación del peptidoglicano de la espora y del dipicolinato de calcio. Estas células producen enzimas mucolíticas como la proteína de pared celular Cwp84, que degrada la mucosa del colon y ayuda a la adherencia de la bacteria a las células epiteliales, de igual forma la acción de las toxinas A y B provocan el aumento de la permeabilidad de las membranas provocando la apertura de las uniones estrechas de las células para la invasión de la bacteria, activan la producción del factor de necrosis tumoral alfa e interleucinas proinflamatorias para la activación de la respuesta inflamatoria y el inicio de la formación de las pseudomembranas características de la ICD que están compuestas por neutrófilos, fibrina y restos de las células epiteliales muertas (Czepiel *et al.*, 2019).

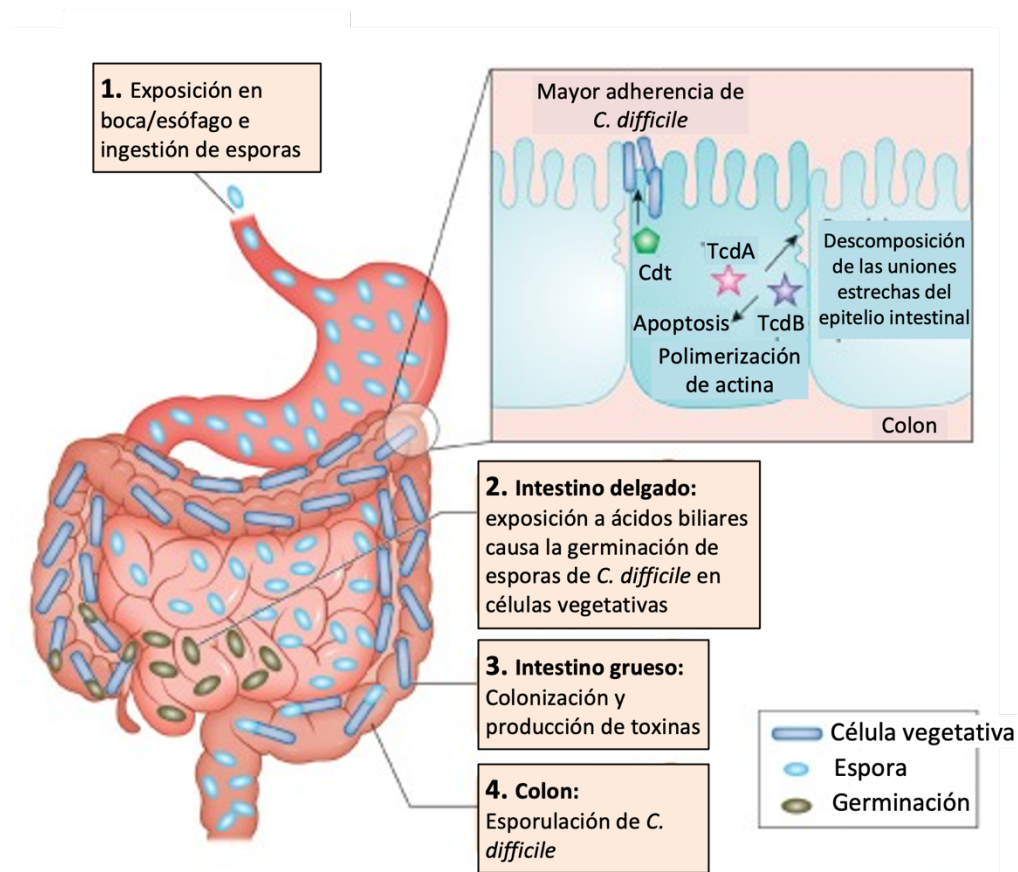


Figura 4. Ciclo de infección por *C. difficile* en el tracto gastrointestinal del humano y su mecanismo de invasión a las células epiteliales del colon (Modificado de Sandhu & McBride, 2018).

2.6. Diagnóstico

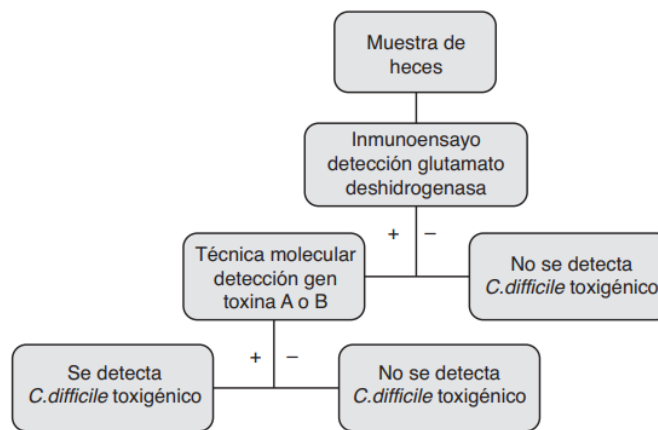
El diagnóstico de la ICD se realiza en función al cuadro clínico ante una sospecha de la colonización del microorganismo, aquellos pacientes con más de 3 deposiciones de diarrea sin causa aparente y de aparición reciente en 24 horas junto con una reciente exposición a antibióticos. La selección del método de diagnóstico es importante para que en la interpretación del resultado poder diferenciar entre los pacientes con ICD y los pacientes portadores asintomáticos. Las pruebas que detectan las toxinas son específicas para el diagnóstico de ICD, mientras que si solo se detecta algún componente de la bacteria, es indicador de colonización y no de enfermedad, por lo que se recomienda la combinación de una prueba de detección microbiológica de las toxinas y/o el aislamiento de *C. difficile* productor de toxinas en muestra fecal y/o la evidencia colonoscópica o histopatológica de colitis pseudomembranosa o la existencia de íleo o megacolon tóxico (Alcalá Hernández *et al.*, 2015).

A continuación, se muestran algoritmos que se ha creado para la mejora del diagnóstico oportuno de ICD basado en las cualidades de cada uno de los diferentes métodos (Figura 5).

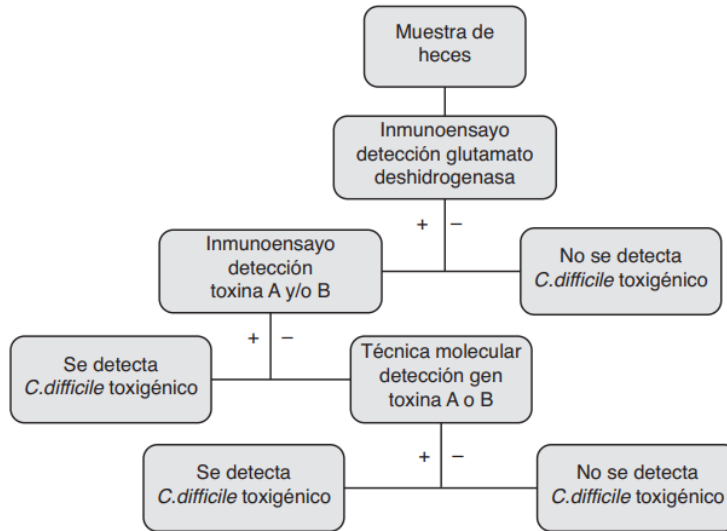
En la actualidad no existe un método ni algoritmo de diagnóstico universalmente aceptado para el diagnóstico de *C. difficile*, sin embargo, algo importante para optimizar el diagnóstico de CDI, en el algoritmo de dos pasos es que la primera prueba debe tener una alta sensibilidad y que clasifique de manera confiable a los pacientes con ICD o sin ICD (detección por la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH) o por amplificación de ácidos nucleicos (AAN)). En caso de un resultado positivo, se debe utilizar una segunda prueba con un alto valor de especificidad (detección de las toxinas A y B por medio de inmunoensayo enzimático (EIA)). Los pacientes con una segunda prueba positiva pueden clasificarse de manera confiable como CDI, y aquellos pacientes con una segunda prueba negativa para toxinas deben ser evaluados clínicamente ya que pueden estar verdaderamente infectados teniendo un nivel de toxina por debajo del umbral de detección del ensayo EIA de toxina o incluso clasificar como portadores de una cepa toxigénica. Si la prueba inicial fue GDH, entonces se puede realizar un tercer paso opcional mediante TC o NAAT para distinguir las cepas toxigénicas de las no toxigénicas. (Gateau *et al.*, 2018; Shin *et al.*, 2016).

La Sociedad de Epidemiología Sanitaria de América (SHEA, por sus siglas en inglés) y la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América (IDSA, por sus siglas en inglés)

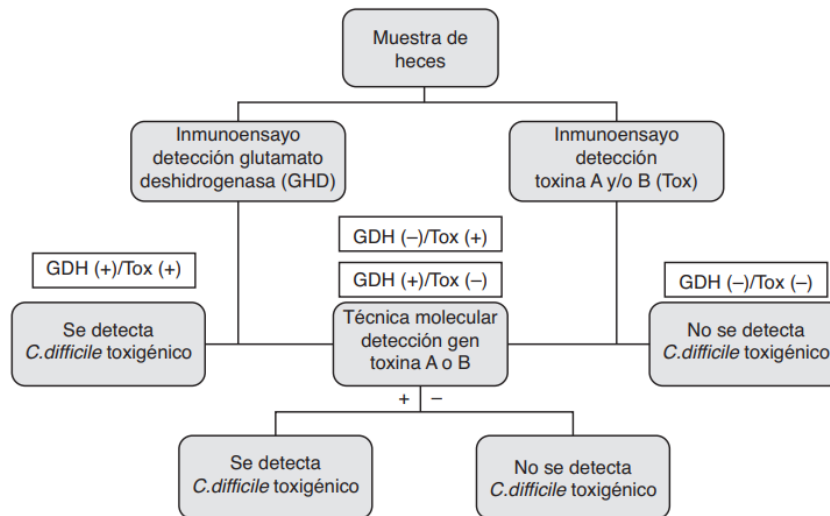
recomiendan el uso del algoritmo diagnóstico de dos pasos en muestras de heces usando la detección de la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH) seguido de un cultivo toxigénico (CT) o PCR para la detección de *C. difficile* productora de toxinas. Por otro lado, la Sociedad Europea de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas (ESCMID, por sus siglas en inglés) sugiere el diagnóstico con dos resultados de las pruebas de inmunoensayo enzimático (EIA), ensayo glutamato deshidrogenasa (GDH) o detección de genes de toxinas por PCR y contar con un método de referencia como tercer paso como el cultivo celular, ensayo de neutralización (CCNA), cultivo toxigénico (TC) y detección de genes de toxinas por PCR.



a. Algoritmo diagnóstico de 2 pasos



b. Algoritmo diagnóstico de 3 pasos



c. Algoritmo diagnóstico multipaso con inmunoensayos que detectan simultáneamente glutamato deshidrogenasa y toxina A y/o B

Figura 5. Algoritmos diagnósticos de la infección por *C. difficile*. (Alcalá Hernández *et al.*, 2016).

2.6.1. Pruebas de detección rápida

- **Detección de las toxinas A y B por medio de inmunoensayo enzimático (EIA)**

Los inmunoensayos enzimáticos para *C. difficile* son el método más utilizado para la detección de este microorganismo debido a su alta sensibilidad del 47 a 98.7 y especificidad del 80 a 100% a través de técnicas de enzimoimmunoanálisis (EIA) y de inmunocromatografía

(ICT) con anticuerpos monoclonales. Actualmente existen pruebas comerciales que solo detectan la toxina B al ser esta el factor de virulencia principal del microorganismo, en el caso de la toxina A en algunas cepas patógenas puede que no esté presente por lo que es mejor seleccionar pruebas que detecten ambas toxinas, la obtención de su resultado es de 30 min aproximadamente (Tabla 2) (Mateu *et al.*, 2020).

- **Detección de la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH)**

La enzima glutamato deshidrogenasa también denominada como antígeno común, es codificada por el gen *gluD*, se ubica fuera de PacLoc y se encuentra altamente conservado en todas las cepas de *C. difficile* toxigénicas y no toxigénicas. Esta prueba sirve para la detección rápida de *C. difficile* con inmunocromatografía teniendo una alta sensibilidad del 90%, sin embargo se han descrito reacciones cruzadas de GDH con *C. sordelli* y otras cepas del género *Clostridioides* por lo para esta prueba reporta una especificidad baja para *C. difficile* (Tabla 2). Varios estudios han evaluado su valor predictivo negativo de la GDH en muestras de materia fecal reportando un bajo valor predictor positivo por lo que ante la un valor positivo de la prueba GDH en ausencia de las toxinas de *C. difficile* se requiere de la confirmación de este patógeno en un algoritmo de dos pasos con otro método de diagnóstico, sin embargo un valor negativo de GDH es suficiente para descartar la presencia de este patógeno. (L. Clifford McDonald *et al.*, 2018; Vaustat & Rollet, 2018).

- **Detección por amplificación de ácidos nucleicos (AAN)**

Este método de diagnóstico es superior a la detección de toxinas por EIA y la detección de GDH ya que es específico para detectar los genes de las toxinas *tcdA*, *tcdB* y el gel 16S ribosomal RNA (rRNA). Estos ensayos tienen la ventaja de ser diseñados con múltiples dianas y su objetivo puede ser para diagnóstico y para análisis epidemiológico, se realiza mediante la amplificación de ADN por la reacción de cadena polimerasa (PCR), algunas se realizan directamente sobre la muestra o previo a una extracción de ADN según lo indique el protocolo del ensayo. Es una prueba relativamente rápida ya que su resultado se obtiene de 45 minutos a 3 horas, su especificidad es del 94 a 99% y su sensibilidad es mayor al 90% (Tabla 2) (Alcalá Hernández *et al.*, 2015).

2.6.2. Otras pruebas de detección

- **Cultivo toxigénico**

Esta prueba consiste en el aislamiento de *C. difficile* de las muestras de heces fecales, este método determina si se trata de una cepa productora de toxinas. Se emplean medios selectivos esto debido a que se agrega específicos antibióticos en su preparación como el agar cicloserina, cefoxitina y fructosa (CCFA) o agar yema de huevo, cicloserina y cefoxitina (CCEY), o también se puede ocupar medios no selectivos como el agar sangre enriquecido con 5% de sangre de carnero. Para un mejor resultado en el aislamiento la muestra se somete a un shock etanólico usando de 2 a 3 ml o gramos de la muestra de heces homogenizada con la misma cantidad de alcohol de 95°, se deja reposar de 30 a 60 minutos agitando cada 15 minutos después de cumplir el tiempo se siembra la muestra. Esto se hace con el fin de eliminar la contaminación de los microorganismos no deseados presentes en las heces del paciente. Aunado a esto se pueden agregar nutrimentos al medio de cultivo como taurocolato y lisozima para un mejor cultivo de *C. difficile* por el aumento de la germinación de sus esporas. Por último, se incuba en ambiente anaeróbico ya sea en cámara anaeróbica o en jarras de anaerobiosis por 48 horas en un rango de 30°C a 37°C para obtener un óptimo crecimiento (Tabla 2) (Flores & Duery, 2017; Carroll & Mizusawa, 2020).

Aunque el cultivo toxigénico tiene una alta sensibilidad, la especificidad para CDI es baja debido a la alta tasa de portadores asintomáticos de *C. difficile*, sin embargo, para el caso de pacientes hospitalizados su especificidad es muy alta. Para aumentar la especificidad el caldo/medio de cultivo puede evaluarse con un ensayo de citotoxicidad o EIA (Bartlett & Gerding, 2008).

- **Detección del gen *tpi***

La enzima triosa fosfato isomerasa es codificada por el gen conservado *tpi* que se emplea para la identificación de la especie *C. difficile*. Dentro de la secuencia de este gen se encuentran algunas regiones variables que se ha empleado para la identificación de otras 12 especies del género *Clostridioides* incluyendo a *C. perfringens*, *C. sordelli* y *C. bifermentans*. Con análisis hechos previamente de las secuencias del gen *tpi* se ha construido un árbol filogenético con un alto parecido al que se ha obtenido a partir del análisis de las secuencias del gen 16S ADNr, debido a estas homologías se propuso al gen *tpi* como marcador para la identificación específica de *C. difficile* (Dhalluin *et al.*, 2003; Lemee *et al.*, 2004).

- **Ensayo de citotoxicidad**

Este método consiste en la detección de la presencia de la toxina B a partir de una muestra de heces que se inocula en un cultivo celular (células Vero o de fibroblastos humanos) para observar un efecto citopático a consecuencia de la toxina, sin embargo, no sirve para detectar la presencia de *C. difficile* por lo que su uso para detectar la colonización del paciente es limitada. Debido al uso de líneas celulares sus resultados se obtienen después de 48 a 72 horas siendo un método relativamente largo, laborioso y al requerir el mantenimiento de las células se vuelve una técnica costosa. De igual forma al ser la toxina B termolábil la muestra debe de ser procesada lo más rápido posible y la sensibilidad de esta prueba se ve afectada teniendo un rango de 67%, mientras que su especificidad es de un 99%. Anteriormente era considerada como el estándar de oro para el diagnóstico de ICD, pero fue desplazada por el cultivo toxigénico por tener una mejor sensibilidad (Tabla 2) (Mateu *et al.*, 2020).

Tabla 2. Métodos de diagnóstico de ICD.				
PRUEBA DE LABORATORIO	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD	DISPONIBILIDAD	PRODUCTO DETECTADO
Estándar de oro				
Cultivo Toxigénico	+++	+	Limitada	<i>C. difficile</i> toxigénico
Ensayos de citotoxicidad	+++	+++	Limitada	Toxinas A o B
Pruebas rápidas				
Enzima glutamato deshidrogenasa (GDH)	+++	+	Amplia	GDH (antígeno común <i>C. difficile</i>)
Detección de toxinas por inmunoensayos (EIA)	+	++	Amplia	Toxinas A o B
Ácidos Nucleicos	++	+ / ++	Limitada por costo	Genes 16S ribosomal RNA, <i>tpi</i> , <i>tcdA</i> , <i>tcdB</i> o <i>tcdC</i>

+: baja, ++: moderada, +++: alta. Modificado de Chen *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2021.

2.7. Tratamiento

El primer paso y de ser posible es suspender la antibioterapia al que se encuentre sometido el paciente. De no ser posible, debido a una infección activa, se debe cambiar el antibiótico a otro tipo que no sea parte de los que se encuentran dentro de riesgo para sufrir ICD y evitar empeorar el estado del paciente. De igual forma es recomendable la suspensión de opioides y antiperistálticos ya que este tipo de medicamentos favorecen la supervivencia de las esporas de *C. difficile* en el colon. Es muy importante una buena hidratación del paciente y una reposición adecuada de los electrolitos perdidos por causa de los episodios de diarrea (Nuria González-García *et al.*, 2005).

2.7.1. Antibioterapia

El tratamiento para ICD dependerá de la gravedad de la ICD del paciente y sólo debe de iniciarse en pacientes con síntomas de ICD y teniendo un diagnóstico positivo para *C. difficile* (Debast *et al.*, 2014).

Los antibióticos de elección para su tratamiento son metronidazol, vancomicina y fidaxomicina (Tabla 3). El metronidazol tiene una potente actividad anaerobicida y su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos, produce la pérdida de la estructura helicoidal del ADN y muerte celular generando compuestos tóxicos para la célula, además de sus propiedades antimicrobianas también tiene efecto antiinflamatorio e inmunomodulador (Pérez-Trallero & Luis García Iglesias, 2010). La vancomicina tiene un mecanismo de acción que inhibe la síntesis de la pared celular específicamente recubren el extremo D-alanin-D-alanina del disacárido pentapéptido, con esto evita la elongación del peptidoglucano, este antibiótico ha demostrado ser más eficaz y producir menor número de recurrencias de ICD que el metronidazol. (Calvo & Martínez-Martínez, 2009). Por último, la fidaxomicina inhibe la ARN polimerasa bacteriana, además de que actúa como inhibidor de la esporulación y de la producción de las toxinas de *C. difficile*, este antibiótico solo está indicado para uso en adultos y para infecciones producidas por esta bacteria; se ha observado que este antibiótico es igual de eficaz que la vancomicina y tiene una tasa superior en la aparición de recurrencias de ICD, sin embargo es un antibiótico

con un alto costo por lo que es una limitante para su uso (Mullane *et al.*, 2011; Cornely *et al.*, 2014).

En una ICD leve a moderada el antibiótico de elección es metronidazol vía oral administrado por un periodo de 10 días, en algunos casos se extiende su uso por periodos de hasta 14 días, sin embargo, no hay evidencia suficiente que indique una mejor eficacia por lo tanto no se recomienda su uso por un periodo de tiempo mayor cuando ya se haya tenido una respuesta favorable al tratamiento en el décimo día. Para casos especiales donde el paciente no responde a esta terapia con metronidazol entre los días 5 y 7, se debe de sustituir por vancomicina vía oral (Tabla 3) (S. Lital Meyer *et al.*, 2014).

Para una ICD severa el antibiótico indicado es vancomicina vía oral por 14 días o fidaxomicina vía oral por 10 días y es importante no suspender la alimentación vía oral o enteral de los pacientes ya que los carbohidratos encontrados en la dieta junto con la fibra y posibles prebióticos tienen un papel importante para la restauración de la microbiota intestinal (Tabla 3) (Surawicz *et al.*, 2013).

En una ICD severa a complicada se administra vancomicina vía oral o por sonda nasointestinal o incluso vía rectal como enema de retención en caso de distensión abdominal o por intolerancia a la vía oral junto con Metronidazol endovenoso por 14 días, aunado a una adecuada reposición de electrolitos (Tabla 3) (Diggs & Surawicz, 2009).

Tabla 3. Antibioterapia para el tratamiento de ICD.	
PRIMER EPISODIO	
Infección leve a moderada	Metronidazol 500 mg, 3 veces al día VO por un periodo de 10 días
Infección severa	Vancomicina 125-500 mg 4 veces al día VO por 14 días o Fidaxomicina 200 mg 2 veces al día VO por 10 días
Infección severa y complicada	Vancomicina 125-500 mg 4 veces al día VO o por sonda nasointestinal o 500 mg en 500 ml de suero fisiológico 4 veces al día vía rectal como enema de retención en caso de íleo o distensión abdominal significativa + Metronidazol 500 mg 3 veces al día EV por 14 días
PRIMERA RECURRENCIA	Se sigue el esquema que en el primer episodio según sea la severidad de los episodios de diarrea del paciente

SEGUNDA RECURRENCIA	Vancomicina 125 mg 4 veces al día VO por 14 días seguido de 125 mg dos veces al día VO por 7 días, seguido de 125 mg cada 48 hrs VO por 7 días, seguido de 125 mg cada 72 hrs VO por 14 días o Vancomicina 125 mg cuatro veces al día VO por 10 días seguido por pulsos de Vancomicina 125 mg cada 3 días por 10 veces
TERCERA O MÁS RECURRENCIAS	Trasplante de microbiota fecal

VO: vía oral. EV: vía endovenosa. (S. Lital Meyer *et al.*, 2014).

2.7.2. Terapia alternativa

El uso de probióticos para la restauración de la microbiota intestinal se ha propuesto como una terapia alternativa para complemento de tratamiento de una ICD y para prevención de *C. difficile*. Estudios que han usado probióticos como tratamientos complementarios a la antibioterapia mostraron que la tasa de recurrencias de ICD es menor en comparación de los pacientes que solo reciben el tratamiento con antibióticos (Rineh *et al.*, 2014).

Algunos probióticos más utilizados son las especies de *Lactobacillus*, *Saccharomyces boulardii* y *Bifidobacterium*, al ser administrados en la dosis adecuada vía oral restablece la microbiota intestinal tras la exposición a antibióticos, estimulan la respuesta inmune, bloquean sitios específicos de adherencia y algunas especie son productoras bacteriocinas con acción antimicrobiana (Surawicz, 2013).

Se ha encontrado que bacterias como *Bifidobacterium* y *Lactobacillus spp* inhiben la adhesión de *C. difficile* a las células epiteliales del colon y que ayudan al desarrollo de la respuesta inmune. Otra bacteria descrita con actividad antimicrobiana es *Lactobacillus* debido a la secreción de bacteriocinas y otros péptidos antimicrobianos (Johnson *et al.*, 2012).

2.7.3. Trasplante de microbiota fecal (FMT)

El trasplante de microbiota fecal o FMT (del inglés fecal microbiota transplant) es un tratamiento a considerar en pacientes que han tenido 2 o más episodios de recurrencias de ICD debido a que no respondieron adecuadamente a las opciones de tratamiento (Tabla 3). Esta terapia tiene como objetivo restaurar la composición de la microbiota intestinal al

transferir las bacterias de una muestra de heces de un paciente sano a un paciente con ICD, de igual forma, esto ayuda a estimular la respuesta inmune ante la ICD del receptor.

El FMT ha mostrado resultados prometedores en varias enfermedades gastrointestinales como en la enfermedad de Chrohn, incluso algunas compañías farmacéuticas han iniciado ensayos para examinar el uso potencial de FMT junto con los medicamentos contra el cáncer actuales para una mayor eficacia del tratamiento, sin embargo, esta terapia por ahora solo está indicada para el tratamiento de infecciones recurrentes por *C. difficile* y se ha convertido en un estándar de atención aceptado para pacientes particulares y cada vez con más bases sólidas de evidencia para el respaldo de su uso (Cohen *et al.*, 2010; Ser *et al.*, 2021; Youngster *et al.*, 2014).

Con el aumento del conocimiento de la microbiota intestinal a través de la secuenciación del genoma, el metagenoma y el desarrollo de mejores técnicas de cultivo, la lista de microorganismos endógenos con beneficios para la salud humana ha aumentado drásticamente. Aunque la mayoría de los microorganismos comensales aún se encuentran en una etapa temprana de investigación ya se tiene la suficiente información de los beneficios que establecen en el equilibrio del ecosistema intestinal y la mejora de la ICD, dándoles el nombre de probióticos de próxima generación (NGP) o productos bioterapéuticos vivos (LBP) (Koen Wortlboer *et al.*, 2022).

Para el FMT se recolecta las heces fecales de un donante sano, la muestra se mezcla, filtra y procesa para su administración ya sea en cápsulas vía oral o por solución mediante sonda nasogástrica diluida en solución salina estéril o mediante enema rectal. Durante su procesamiento se realizan pruebas microbiológicas para confirmar que no estén presentes microorganismo patógenos y multirresistentes. Otra forma de aplicación del FMT consiste en cultivar de la muestra del paciente sano las especies ya identificadas y definidas como bacterias comensales no patógenas del microbioma intestinal y transferírselas al paciente con ICD de las maneras descritas anteriormente (Figura 6) (Smits *et al.*, 2016).

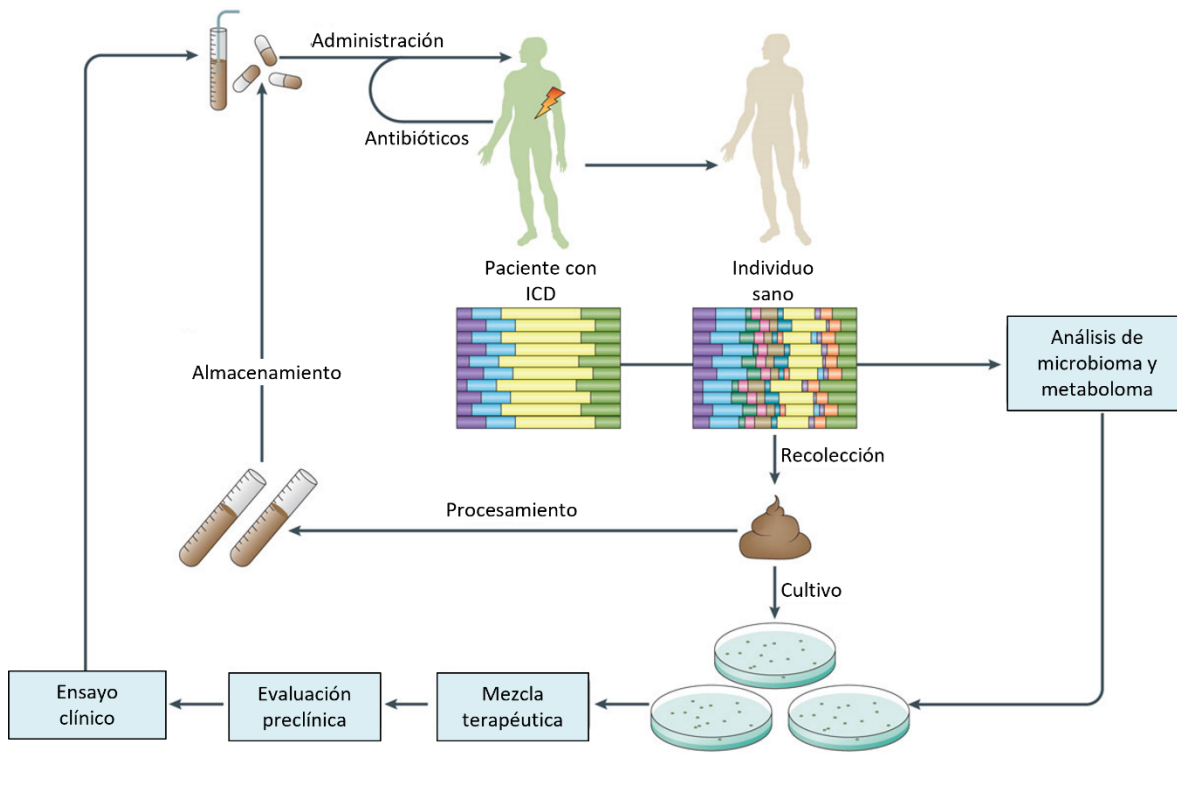


Figura 6. Trasplante de microbiota fecal (FMT). (Modificado de Smits *et al.*, 2016).

2.8. Colonización asintomática por *C. difficile*

2.8.1. Estado de colonización asintomática por *C. difficile*

Por definición, la colonización asintomática o el estado de portador asintomático de *C. difficile* es la ausencia de diarrea sin hallazgos histopatológicos y radiológicos compatibles con colitis pseudomembranosa, pero con la detección de *C. difficile* o de evidencia de la presencia de sus toxinas en heces fecales (Furuya-Kanamori, 2015).

Los pacientes asintomáticos colonizados por *C. difficile* pueden estar protegidos del desarrollo de la ICD por una respuesta inmune humoral a las toxinas, por bacterias protectoras en su microbiota intestinal entre otros mecanismos propuestos que aún no están del todo claro, la prevalencia de la colonización asintomática varía también por los factores subyacentes externos como los ambientales y factores del propio *C. difficile* (Shim *et al.*, 1998).

2.8.2. Mecanismo de la colonización asintomática por *C. difficile*

Como ya se había mencionado, la transmisión de *C. difficile* es vía fecal-oral por medio de la ingestión de sus esporas, llegan al estómago donde resisten las condiciones ácidas del ácido gástrico y germinan en células vegetativas en el ambiente anaeróbico del colon; estas células vegetativas entran a la capa de moco del colon usando flagelos y por la degradación enzimática de la matriz extracelular de las células epiteliales, una vez ahí se lleva a cabo la adhesión de *C. difficile* a las células epiteliales intestinales por medio de las proteínas de la capa S (Furuya-Kanamori *et al.*, 2015).

El problema es que aún no se tiene definido el riesgo de protección o de desarrollo de una ICD en el paciente asintomático colonizado por *C. difficile*, lo que sí se sabe es que las cepas toxigénicas son más frecuentes en los aislamientos de estos pacientes que las cepas no toxigénicas. Algunos estudios han observado que la colonización produce una respuesta inmune humoral que otorga una protección a la ICD, al ver que estos pacientes tienen una alta concentración de IgG frente a TcdA; otro estudio observó en pacientes de este tipo, pero con un episodio de diarrea tuvieron concentraciones más altas de IgM frente a TcdA y TcdB incluso cuando *C. difficile* no es detectado (Kyne *et al.*, 2000; Sánchez-Hurtado *et al.*, 2008).

Por otro lado, no hay evidencia que las cepas no toxigénicas sean capaces de producir sintomatología clínica. Natarajan en 2013 observó la presencia de cepas no toxigénicas en pacientes con ICD sin embargo, en sus cultivos también se encontraron cepas toxigénicas de *C. difficile* por lo que al haber una mezcla de estas cepas no se asoció su presencia al desarrollo de la ICD. También se ha definido que la colonización por cepas no toxigénicas confieren protección contra la ICD otorgando una resistencia hacia las cepas toxigénicas por medio de mecanismos de competencia de nutrientes o de accesibilidad a las células epiteliales del colon (Natarajan *et al.*, 2013; Gerding *et al.*, 2015).

2.9. Respuesta inmunitaria contra *C. difficile*

2.9.1. Inmunidad innata

El sistema inmune responde rápidamente ante la invasión de las células epiteliales del colon mediado por las toxinas A y B de *C. difficile*, mediante las células inmunitarias residentes se liberan citocinas y quimiocinas proinflamatorias se lleva a cabo el reclutamiento de las células inmunitarias innatas y adaptativas para así producir la expresión de péptidos antimicrobianos y especies reactivas de oxígeno (ROS). Las vías de señalización de la proteína

activadora 1 (AP-1) se activan en las células epiteliales intestinales mediante las fosforilación de las proteínas cinasas (MAPK) para finalmente conducir a la transcripción de quimiocinas proinflamatorias como IL-8, quimiocina CXCL1 y CXCL2 para el reclutamiento de neutrófilos y la activación de células linfoides innatas (ICL), estas últimas reponderarán a IL-1 β , IL-12 e IL-23 y a su vez junto con el interferón- γ (IFN γ) inducen el aumento de la actividad fagocítica de los macrófagos y los neutrófilos para así limitar la diseminación de *C. difficile*, disminuir la actividad de sus toxinas y reparar el daño en las células epiteliales del colon (Figura 7) (Abt *et al.*, 2016).

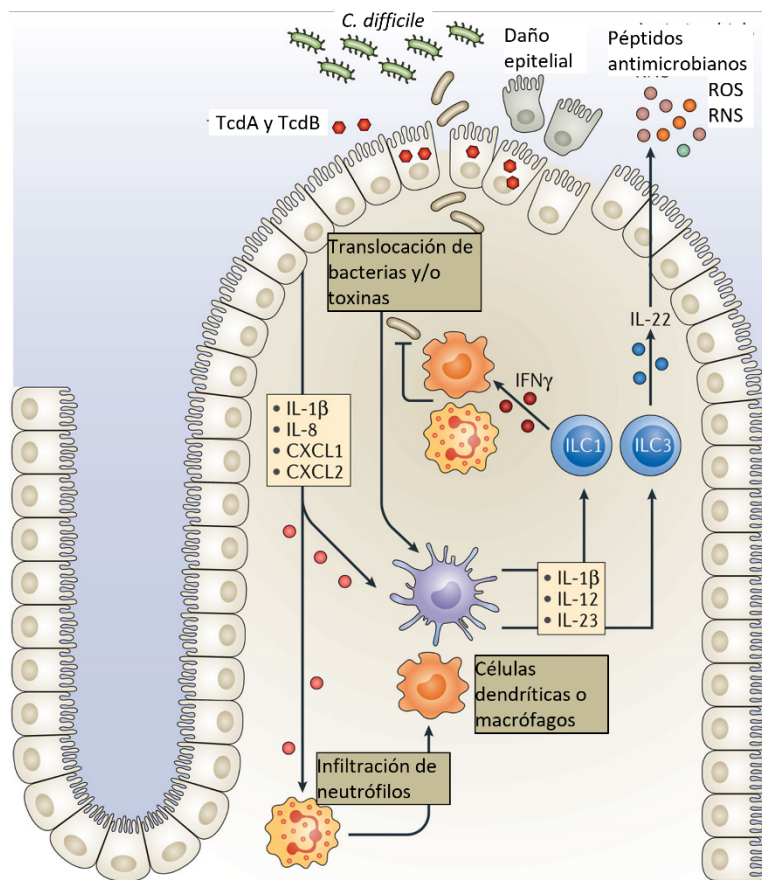


Figura 7. Activación de la respuesta inmune innata en las células epiteliales del colon ante la colonización de *C. difficile* (Abt *et al.*, 2016).

2.9.2. Inmunidad adaptativa

Algunas células de la inmunidad adaptativa como las células T y las células B no contribuyen a la resolución de la ICD pero se ha observado que la respuesta inmune tiene un efecto

protector ante esta patología, a diferencia de las inmunoglobulinas IgG e IgA las cuales han sido relacionadas con la gravedad de la ICD con respecto a su concentración ya que en las su espectro de actividad neutraliza a las toxinas de *C. difficile*. El papel de las células T aún no se tiene del todo claro debido a que medir las respuestas inmunes de estas células resulta de ensayos muy costosos y las técnicas empleadas carecen de sensibilidad, sin embargo, se ha descrito que las células T CD4⁺ da señales a las células B ante la exposición al antígeno de *C. difficile* para la maduración y especificidad en la memoria de la célula inmune (Abt *et al.*, 2016).

2.10. Microbiota intestinal

2.10.1. La microbiota intestinal y su relación con el estado de salud

Así como cada ser humano tiene su ADN único también contiene su propia composición de su microbiota intestinal, sin embargo, a través de los estudios realizados se ha definido una composición global básica, es decir un patrón de abundancia en ciertas bacterias por ejemplo se ha definido que en el 90% de la composición de la microbiota están 2 *phylum*: Bacteroidetes y Firmicutes, y que en el 10% restante se encuentran Proteobacterias, Actinobacterias, Fusobacterias y Verrucomicrobia (Álvarez *et al.*, 2021).

Todo el tracto gastrointestinal es una barrera de células epiteliales que limita el contacto directo de microorganismos transitorios con las células inmunes especializadas en la lámina propia del intestino y su propagación sistémica como resultado una homeostasis inmunológica. La mayoría de las células inmunológicas que la conforman son los enterocitos (90 al 95%), seguido de las células enteroendocrinas, células caliciformes, células M y por último las células Paneth. Las células caliciformes secretan glicoproteína de mucina que en el colon se ensamblan generando capas de moco que servirá para atrapar a microorganismos evitando así su entrada al epitelio y facilitará su expulsión en las heces y las células de Paneth secretan los péptidos antimicrobianos para inhibir el crecimiento de determinadas bacterias patógenas (Figura 8) (Malin *et al.*, 2008; Vaishnava *et al.*, 2011).

En la microbiota intestinal son sintetizados metabolitos a partir de la dieta que generan señales neuronales y endocrinas las cuales influyen en distintos órganos y tejidos distales de teniendo un impacto en la regulación del balance energético, funciones cognitivas, el estado de ánimo y comportamiento. También a través de la dieta se sintetizan ácidos grasos de

cadena corta (AGCC) que activan a los receptores GPR41 y GPR43 para la estimulación de las hormonas endocrinas por parte de las células L como el péptido similar al glucagón (GLP-1) o el péptido tirosina-tirosina (PYY), estos ayudan a la regulación de la homeostasis energética como el metabolismo de la glucosa, la resistencia a la insulina, la termogénesis entre otros por medio de efectos endocrinos. En cuanto a la síntesis de compuestos neuroactivos, la microbiota intestinal está relacionada con los niveles de serotonina debido a su capacidad de metabolizar su precursor el triptófano, también en el neurotransmisor ácido γ -aminobutírico (GABA) es producido por bacterias de la microbiota intestinal por medio de la descarboxilación del glutamato por la enzima glutamato descarboxilasa (Figura 8) (Álvarez *et al.*, 2021).

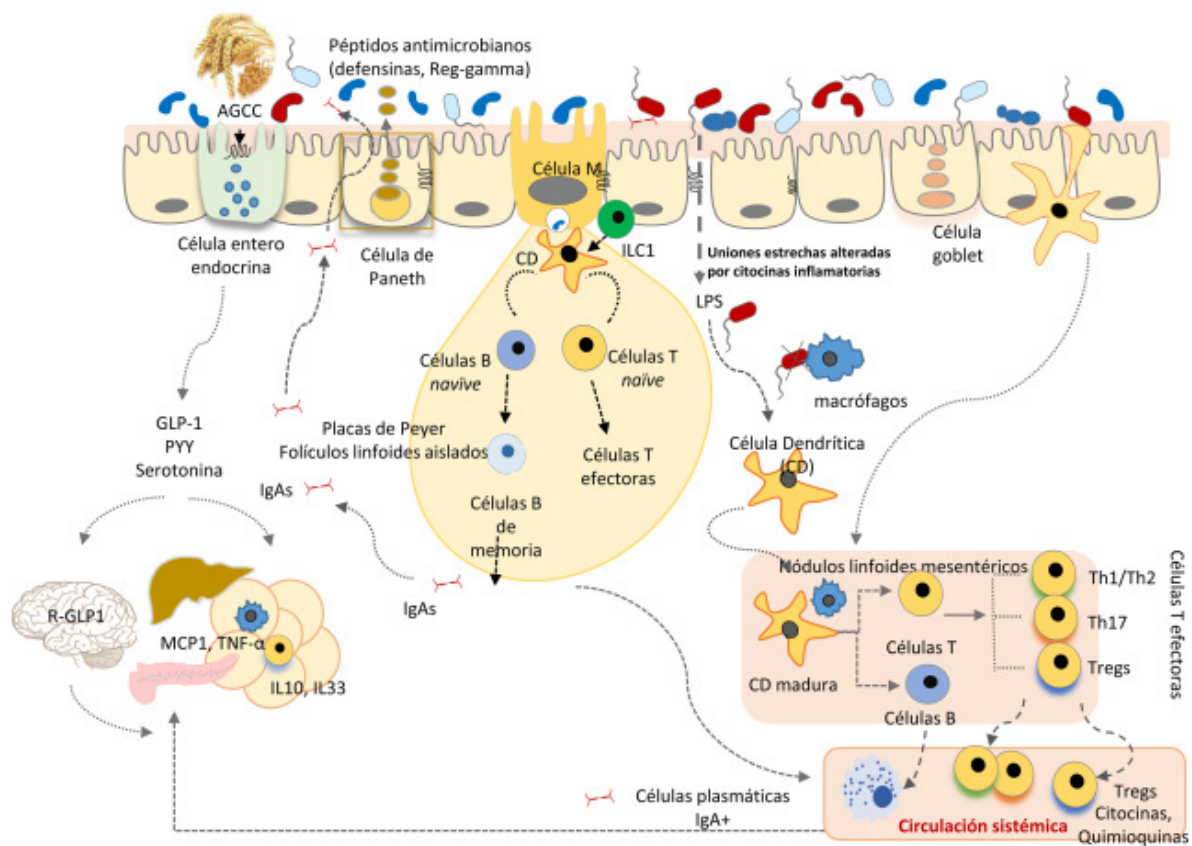


Figura 8. Representación de la influencia de la microbiota y sus metabolitos sobre el sistema inmunitario y neuroendocrino (Álvarez *et al.*, 2021).

2.10.2. Métodos de estudio de la microbiota intestinal. Secuenciación metagenómica

La metagenómica se basa en el uso de técnicas de biología molecular para analizar la diversidad de genomas microbianos, llamados también metagenomas, a partir de muestras de seres vivo o ambientales. Esta metodología con el paso de los años y el avance en la tecnología se ha logrado entender la complejidad y diversidad de los genomas en la salud y en la enfermedad, un ejemplo es el desarrollo del proyecto del genoma humano el cual reveló la compleja arquitectura del genoma y al mismo tiempo creó una necesidad de una mayor tecnología y conjuntos de datos para responder complejas cuestiones biológicas que surgieron a lo largo del desarrollo del proyecto (Goodwin *et al.*, 2016).

Una parte crucial para la creación de librerías metagenómicas es la extracción de los ácidos nucleicos de la muestra de interés. Existen dos formas para la extracción del material genético, la primera por medio de un tratamiento químico y la segunda por medio de una lisis directa con métodos mecánicos, con la lisis mecánica se logra recuperar ADN de mayor diversidad microbiológica, sin embargo, con el tratamiento químico se obtiene ADN de mayor peso molecular; para una extracción de ARN se utilizan los mismos métodos de extracción incluyendo inhibidores de RNAsas. Para determinar el método ideal de extracción se debe de considerar el tipo de muestra, el ácido nucleico de interés y el tipo de análisis que se va a realizar con el material genético (Cortés López *et al.*, 2020).

Tras el desarrollo de las tecnologías de secuenciación masiva o “Next Generation Sequencing technologies (NGS)”, se puede lograr secuenciar millones de moléculas de ADN de manera simultánea facilitando el estudio de la diversidad microbiana. Las más empleadas son la pirosecuenciación 454 y la secuenciación de lecturas cortas por la plataforma de Illumina (Goodwin *et al.*, 2016).

- **Secuenciación de lecturas cortas, Illumina.**

Esta secuenciación como su nombre lo dice se obtienen unas lecturas de menor tamaño aproximadamente de 50 a 400 pb, sin embargo, se pueden obtener una mayor cantidad de lecturas y debido a su pequeño tamaño de estas tienen un porcentaje de error de 0.1%, al igual, su costo es reducido comparado con el de otras tecnologías. Actualmente es la tecnología que más se usa para el estudio de microbiomas, pero se requiere de un análisis bioinformático mucho más complejo que con la secuenciación con otras plataformas (Cortés López *et al.*, 2020).

2.10.3. Gen ARNr 16S

Un marcador molecular es un segmento de ADN de un gen o región no codificante del genoma que permite identificar diferentes variantes (alelos) y se localiza en un sitio determinado en los cromosomas. Estos marcadores se utilizan para clasificar a los grupos taxonómicos tanto en eucariotas como en procariotas, en especial los genes ribosomales (ARN ribosomal, ARNr) los cuales son altamente conservados y evolutivamente estables pero con regiones hipervariables, estos genes se han utilizado como marcadores moleculares para los estudios de filogenia y taxonomía bacteriana (Cortés López *et al.*, 2020).

El gen 16S ARNr se emplea para la identificación de la similitud filogenética de las bacterias y arqueas permitiendo su identificación y clasificación sin necesidad de aislamientos. Tiene una secuencia aproximada de 1.550 pb de longitud y contiene regiones variables y conservadas con secuencias de oligonucleótidos únicas para cada grupo filogenético. La información que se obtiene por medio de la secuenciación de este gen se agrupa en unidades taxonómicas operacionales (OTU) y de acuerdo al porcentaje de similitud de su respectivo ARNr 16S es su asignación taxonómica, por ejemplo cuando se tiene una similitud del 96% se da la asignación taxonómica de género mientras que en una similitud del 97% se habla de una asignación taxonómica de especie (Icaza-Chávez, 2013).

3. ANTECEDENTES

3.1. ANTECEDENTES GENERALES

3.1.1. Epidemiología de *C. difficile* y la ICD

La epidemiología de *C. difficile* y de la ICD ha cambiado mucho en los últimos años, no solo se ha observado un aumento en la presencia de casos de ICD, sino también se han visto cambios en su sintomatología, la respuesta al tratamiento y sus recurrencias. También se ha alertado por los casos en aumento de la ICD adquirida en la comunidad y los nuevos posibles factores de riesgo como los supresores de ácido gástrico o el uso de agentes de higiene de manos a base de alcohol como el gel antibacterial (Freeman *et al.*, 2010).

La incidencia en países europeos de los casos de ICD son 7 de cada 10,000 pacientes hospitalarios, mientras que en Estados Unidos *C. difficile* es la principal causa de infección hospitalaria reportándose 14,000 muertes al año y aproximadamente del 4 al 10% de los pacientes hospitalizados son colonizados por esta bacteria toxigénica. Estudios han descrito que es mayor el riesgo de que la ICD adquirida en la comunidad afecte más a jóvenes saludables; un estudio publicado en 2015 reporta 15,451 casos de ICD en 14,453 pacientes, de igual forma se reportaron 48 casos comunitarios de ICD por 10,000 habitantes, una incidencia mayor con el paso del tiempo y que pone en cuestión la supervivencia de hábitad de *C. difficile* del hospital a la comunidad (Lessa *et al.*, 2015; Martin *et al.*, 2016).

Entre los años 2002 y 2005 ocurrió una epidemia de ICD en Quebec, Canadá, en la cual por medio de métodos de epidemiología molecular se realizó la tipificación y se identificó una cepa variante de *C. difficile* nombrada cepa BI/NAP1/027. Esta cepa ya había sido reportada en varios países del mundo relacionada con brotes regionales de ICD y colitis severa, además, es especial ya que produce la toxina binaria y está asociada a mutaciones en el gen regulador *tdcC* causando la hiperproducción de las toxinas A y B, además de que puede tener mutaciones en las proteínas de la capa superficial aumentando su adherencia. Debido a que la tipificación de cepas no está dentro de los protocolos de diagnóstico de la ICD existe muy poca información sobre la prevalencia de la cepa BI/NAP1/027, sin embargo, estudios realizados en Bélgica y países bajos reportaron que del 25% al 50% de los casos de ICD fueron causados por la cepa BI/NAP1/027 y que se encontraba siendo una cepa predominante en aislamientos hospitalarios (Rupnik *et al.*, 2009)

Una nueva cepa reportada es el ribotipo 078 asociada a la ICD adquirida en la comunidad descrita en los países bajos, esta cepa es similar a la cepa BI/NA/027. Sin embargo, el ribotipo 078 se ha descrito como una cepa hipervirulenta asociada a una enfermedad más grave y mortal en pacientes jóvenes (Figura 9) (Ananthkrishnan, 2010).

El descubrimiento del ribotipo 027 de *C. difficile* es un motivo de preocupación mundial para los países con casos reportados como en los que aún no es reportada este ribotipo, ya que es importante su identificación y vigilancia para así frenar su esparcimiento y evitar grandes epidemias como las de América del Norte y países de Europa. Este ribotipo se ha clasificado también como una cepa hipervirulenta causante de una colitis muy grave y mortal a diferencia de los aislados realizados antes del 2001 donde esta cepa solo era resistente a fluoroquinolona. Entre los años 2008 a 2010 se reportaron los primeros casos por este ribotipo en Australia Occidental, Corea del Sur, Hong Kong y Costa Rica (Figura 9) (Archie et al., 2010).

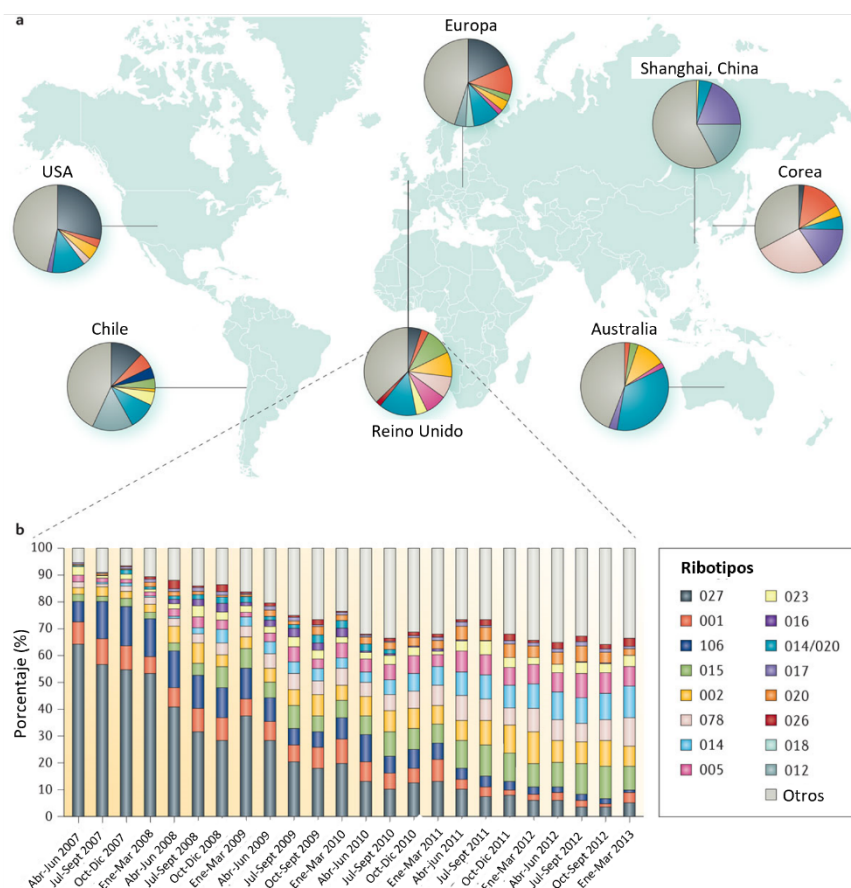


Figura 9. Epidemiología mundial de los ribotipos más reportados de *C. difficile*. a) Ribotipos presentados en distintos países del mundo. b) Desglose de meses entre los años 2007 a 2013 y sus porcentajes de ribotipos presentados en el Reino Unido (Martin *et al.*, 2016)

3.2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

3.2.1. Mecanismos de resistencia a la colonización de *C. difficile* y el desarrollo de ICD en la microbiota intestinal

- **Transformación de ácidos biliares para la mediación de la resistencia a la colonización por *C. difficile***

La microbiota intestinal puede afectar la invasión de *C. difficile* del tracto intestinal a través de la transformación de ácidos biliares ya que estos tienen un papel muy importante sobre la germinación de esporas y el crecimiento vegetativo de *C. difficile*, en específico los ácidos biliares primarios colato y quenodesoxicolato tienen diferentes efectos sobre el proceso de germinación de las esporas. Se ha observado que las formas conjugadas y desconjugadas del colato junto con el aminoácido glicina, funcionan juntas para promover la germinación de las esporas de *C. difficile* *in vitro*, mientras que el quenodesoxicolato es un potente inhibidor de la germinación. Las enzimas hidrolasas de sales biliares que son producidas por bacterias en el tracto intestinal aseguran que todos los ácidos biliares sean desconjugados de su aminoácido en la luz intestinal y estas mismas bacterias también median en la transformación de ácidos biliares primarios en ácidos biliares secundarios a través de la enzima 7-deshidroxilasa, convirtiendo el colato y el quenodesoxicolato (CDCA) en ácido desoxicolato y litocolato (Figura 10a) (Britton & Young, 2012).

- **Antagonismos directo de la microbiota intestinal**

Ciertas bacterias intestinales tienen la capacidad para producir antimicrobianos que inhiben directamente el crecimiento de *C. difficile*. Un ejemplo es *Bacillus thuringensis* que segrega una bacteriocina denominada Thuricin CD, que se compone de dos péptidos que actúan de forma sinérgica que le confiere un espectro de actividad contra bacterias Gram positivas formadoras de esporas incluida *C. difficile*. Se ha observado que Thuricin CD demostró ser tan eficaz como el metronidazol para inhibir *C. difficile* en un modelo *in vitro* del colon humano y dado su estrecho espectro puede ser considerada como una terapia alternativa para CDI, independientemente de su potencial como tratamiento para la ICD al identificar a *B.*

thuringensis en la microbiota intestinal indicar los mecanismos que posee esta para la resistencia intrínseca dirigidos a otros patógenos específicos (Rea *et al.*, 2010).

- **Competencia por nutrientes y nichos entre las bacterias comensales y *C. difficile***

La microbiota intestinal también puede afectar la colonización por patógenos como *C. difficile* al generar competencia por los recursos ya que al alterar su composición también se alteran las fuentes de nutrientes de las bacterias comensales.

Se han descrito varios escenarios, el primero al reducir la diversidad de la microbiota intestinal ante una exposición con antibióticos, estos aumentan la competencia por recursos limitados y liberan nichos ecológicos que antes no estaban disponibles (Figura 10b). Otro escenario es cuando en la lisis de las bacterias se liberan fuentes de carbono que la comunidad bacteriana restante puede tomar como fuente de nutrientes para su desarrollo y reproducción. A pesar del gran número de genomas de *C. difficile* que se han secuenciado, se han realizado relativamente pocos estudios de las redes metabólicas utilizadas por *C. difficile* para colonizar el intestino. Los estudios *in vitro* han demostrado que *C. difficile* puede crecer en azúcares simples, aminoácidos, péptidos y carbohidratos complejos (fermentación) (Abbas & Zackular, 2020).

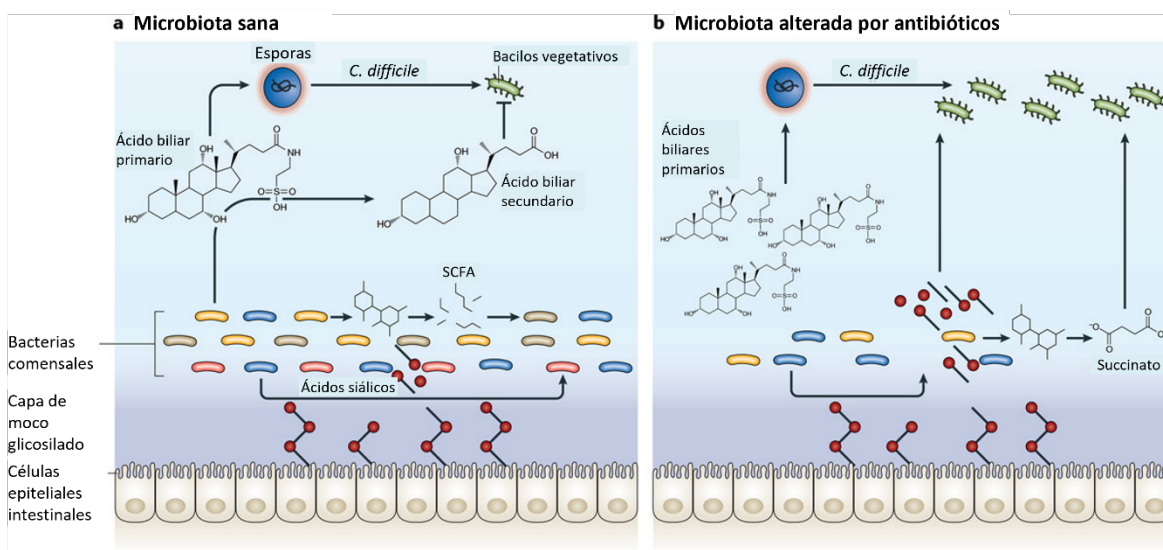


Figura 10. Mecanismos de resistencia a la colonización de *C. difficile* en la microbiota intestinal.
a) La microbiota transforma los ácidos biliares primarios en ácidos biliares secundarios para inhibir el crecimiento de *C. difficile*. También estas bacterias comensales de la microbiota en la fermentación

transforman los carbohidratos en ácidos grasos de cadena corta (AGCC) como el succinato y con esto otras poblaciones de bacterias comensales utilizan estos metabolitos como fuente de energía. **b)** Ante la exposición a antibióticos y el desequilibrio de la microbiota intestinal, se agotan las bacterias transformadoras de los ácidos biliares primarios y se puede dar la esporulación y el crecimiento de *C. difficile*. Otra consecuencia por la exposición a antibióticos es que la riqueza de bacterias consumidoras de ácido siálico y succinato, esto al estar disponible es una fuente de energía para *C. difficile*. (Abt *et al.*, 2016)

3.2.2. Alteraciones de la microbiota intestinal en pacientes con ICD

Las especies de bacterias comensales relacionadas con el desarrollo y resistencia a la ICD es un tema que con el paso del tiempo va siendo de más interés para los científicos y buscan desarrollar esta investigación en modelos murinos o estudios de casos clínicos y controles en humanos.

Skraban *et al.*, 2013, en un estudio mediante cromatografía líquida desnaturalizante de alto rendimiento (DHPL) analizaron la microbiota intestinal en muestras fecales de voluntarios sanos y muestras de pacientes con posible colonización sintomática de *C. difficile* dividiendo estas muestras de acuerdo con la consistencia de las heces. Detectaron diferencias significativas entre las dos poblaciones de muestras analizadas siendo *Bifidobacterium longum* la especie con mayor diversidad en las muestras negativas a *C. difficile* con consistencia líquida de heces. Estos autores identificaron patrones de composición de la microbiota que predicen la posible colonización de *C. difficile*, sin embargo, concluyeron que estos patrones de composición están ligados con el ribotipo de *C. difficile* presente en la colonización (Skraban *et al.*, 2013).

Lee *et al.*, 2017, hacen un estudio descriptivo de la caracterización de la microbiota intestinal en pacientes hematológicos receptores de trasplante de médula ósea, estos pacientes al recibir un tratamiento de profilaxis antibiótica antes y después de su trasplante son personas vulnerables ante ICD. Examinaron la composición de la microbiota en estos pacientes con trasplante e identificaron la presencia de 3 taxones bacterianos correlacionados con la protección contra ICD: *Bacteroidetes*, *Lachnospiraceae* y *Ruminococcaceae*, en los pacientes que tuvieron una colonización significativa con estos grupos se identificó que su

riesgo ante el desarrollo de ICD disminuyó un 60% independientemente de sus factores clínicos (Lee *et al.*, 2017).

Weingarden *et al.*, 2014, realizaron un análisis metabolómico y cuenta de ácidos biliares específicos en 12 pacientes con ICD recurrente, se analizaron las muestras de heces antes y después de su tratamiento con FMT y la de sus donantes para la identificación y comparación de su composición bacteriana. Se observó que las muestras de los pacientes después del FMT tienen una mayor diversidad en su microbiota que antes de recibir su FMT, específicamente una mayor abundancia en los *phylum* Bacteroidetes, Firmicutes y Proteobacteria. Las muestras de los donantes estaban compuestas principalmente por los *phylum* Bacteroidetes y Firmicutes y con poca abundancia de Proteobacterias mientras que las muestras de los pacientes con ICD estaban compuestas en su mayoría por el *phylum* Proteobacteria. A nivel de familia se encontraron a *Lachnospiraceae*, *Bacteroidaceae* y *Ruminococcaceae* como dominantes en las muestras de los donantes mientras que en las muestras de los pacientes con ICD estas familias estuvieron en una mínima abundancia. Por el contrario, para las familias *Enterobacteriaceae*, *Veillonellaceae* y *Verrucomicrobiaceae* se reportaron en mínima abundancia para las muestras de los donantes mientras que en los pacientes con ICD estuvieron en una mayor abundancia. Al final, después del FMT el patrón de la microbiota de los pacientes con ICD se fue revirtiendo a modo ser muy similar a la de los donantes (Weingarden *et al.*, 2014).

Milani *et al.*, 2016, en su estudio metagenómico compararon la composición de la microbiota intestinal en tres grupos de pacientes: pacientes con ICD, pacientes con tratamiento antibiótico sin ICD y pacientes con ICD negativo sin tratamiento a antibiótico. Observaron una abundancia de bacterias menor en las muestras con ICD, y en estas muestras se identificaron bacterias comensales intestinales como *Bacteroides*, *Alistipes*, *Lachnospira* y *Barnesiella*. En los pacientes negativos de ICD y con tratamiento antibiótico se identificó una baja abundancia en las especies comensales como *Alistipes* y sin alguna otra reducción de especies significativa (Milani *et al.*, 2016).

3.2.3. Alteraciones de la microbiota intestinal en pacientes portadores de *C. difficile*

Como se ha descrito anteriormente, la microbiota tiene un papel muy importante en la resistencia a la colonización de *C. difficile* asintomática como para la transición al desarrollo completo de una ICD.

Zhang *et al.*, 2015, describieron la composición de la microbiota intestinal en pacientes con ICD, portadores asintomáticos de *C. difficile* y controles sanos. Las muestras de los pacientes con ICD y portadores asintomáticos tuvieron una diversidad y abundancia menor en comparación con los controles sanos, en este último grupo se identificó una abundancia mayor en los *phylum* Bacteroidetes y Firmicutes mientras que en los pacientes con ICD había una abundancia mayor en el *phylum* de Proteobacterias y menor en los *phylum* mencionados anteriormente. La microbiota intestinal de los pacientes colonizados asintomáticos fue más parecida a los controles sanos pero con una abundancia mayor de Proteobacteria y una abundancia menor en Firmicutes y Bacteroidetes aunque estas diferencias no fueron significativas. En Bacteroidetes hubo una disminución de *Alistipes*, *Bacteroides* y *Prevotella* junto con un aumento de *Parabacteroides* en pacientes con ICD y portadores asintomáticos con respecto a los controles sanos. En Proteobacterias hubo un aumento de *Escherichia* *Shigella*, *Klebsiella*, *Haemophilus*, *Pseudomonas* y *Biophila* en pacientes con CDI y en portadores asintomáticos, pero con una disminución en *Parasutterella* y *Gemminger*. También se identificó una escasez en las bacterias productoras de butirato como Coprococcus y Roseburia, Fecalibacterium y Ruminococcus en pacientes con ICD y portadores asintomáticos respectivamente. Los autores concluyeron que independiente del estado inmune del hospedador, se da una pérdida de resistencia a la colonización en portadores debido al cambio en la composición de la microbiota que controla el cambio de estado portador asintomático a la ICD (Zhang *et al.*, 2015).

Rea *et al.*, 2012, examinaron la tasa de portación de *C. difficile* en función a la composición de la microbiota intestinal de pacientes de la tercera edad en la comunidad, también incluyeron a pacientes ambulatorios y de estancia hospitalaria larga y corta. Reportaron una tasa de portadores del 1.6% para personas de la comunidad, 9.5% en pacientes ambulatorios y 21% en pacientes con alguna estancia hospitalaria. Los pacientes portadores asintomáticos no reportaron diferencias significativas a nivel de *phylum* y familia en comparación con los pacientes que no reportaron *C. difficile* en sus cultivos. La única diferencia significativa fue

una abundancia en el phylum Spirochaetes y Proteobacterias en los portadores asintomáticos (4,2%) que en los pacientes sanos (2,3%). A nivel familia la abundancia de *Erysipelotrichaceae*, *Aerococaccae* y *Flavobacteriaceae* fue mayor en los pacientes portadores y *Enterococcaceae*, *Spirochaetaceae*, *Prevotellaceae*, tuvieron una abundancia disminuida. Por último, a nivel de género, *Parabacteroides* tuvo una abundancia mayor en los pacientes con ICD comparado con controles sano y portadores asintomáticos, sin embargo, *Bifidobacteria spp* no fue detectada en pacientes con CDI, pero si en el resto portadores y en los controles (Rea *et al.*, 2012).

4. JUSTIFICACIÓN

La incidencia de las enfermedades diarreicas asociadas a *C. difficile* han aumentado en los últimos años y se ha convertido en uno de los principales patógenos causantes de infecciones nosocomiales en países desarrollados, sin embargo, su epidemiología ha cambiado pues no hace poco se sabía que la ICD era una enfermedad exclusivamente nosocomial, pero el progresivo aumento también de casos provenientes de la comunidad ha provocado una alerta ante el cambio en la epidemiología de esta bacteria patógena. En México y América Latina la presencia de *C. difficile* es poco reportada por lo que la realización de este estudio tendrá un beneficio en la generación de conocimiento epidemiológico en lo que se refiere a la presencia de este patógeno en la microbiota intestinal y sobre todo se creará un panorama de la colonización asintomática de *C. difficile* en la población.

La disbiosis de la microbiota intestinal es un factor muy importante para el desarrollo de la colonización de *C. difficile* y en el desarrollo de la ICD, identificar este patrón de cambio en ambos casos permite entender los mecanismos de interacción de estas comunidades bacterianas, determinar especies o grupo de bacterias protectoras o predisponentes así como el diseño de terapias moduladoras de la microbiota intestinal más enfocadas y precisas.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México no existen estudios específicos sobre la caracterización de la microbiota intestinal sana y su relación con ICD, de igual forma son nulos los estudios sobre portadores asintomáticos de *C. difficile* por lo que realizar un estudio de metagenómica para conocer la composición de la microbiota intestinal nos da un panorama hacia el impacto que tienen las bacterias comensales sobre el desarrollo de ICD y la resistencia de las mismas para el pronóstico y tratamiento de esta enfermedad. De igual forma con este estudio se podrá comparar la microbiota intestinal mexicana sana y con la presencia de *C. difficile* con lo reportado en otros países del Norte y Sur de América y Europa donde la ICD es un serio problema de salud pública.

6. HIPÓTESIS CIENTÍFICA

La microbiota intestinal de los pacientes con ICD y pacientes portadores asintomáticos de *C. difficile* es muy diferente con respecto a los controles sanos, lo que tiene una importancia significativa en la diversidad y riqueza bacteriana para el desarrollo de la ICD.

7. OBJETIVOS

7.1. OBJETIVO GENERAL

- Caracterizar por metagenómica la microbiota intestinal de pacientes con ICD, pacientes asintomáticos a *C. difficile* y sanos usando muestras de ADN extraídas de heces fecales

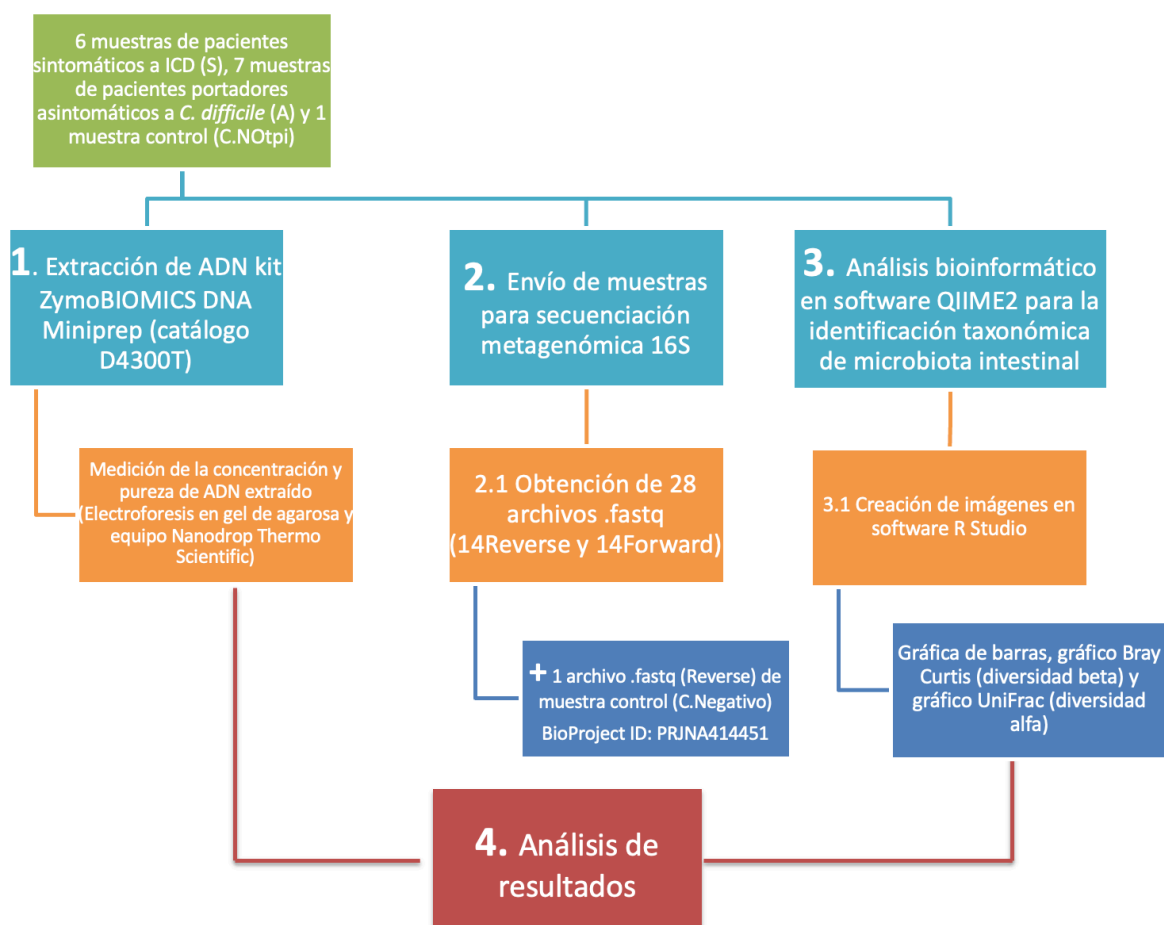
7.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar la composición de la microbiota intestinal entre el grupo de pacientes con ICD y el grupo de pacientes asintomáticos a *C. difficile* con respecto a grupo de controles sanos
- Caracterizar el patrón de disbiosis de la microbiota intestinal para describir los posibles mecanismos de bacterias protectoras o predisponentes al desarrollo de una ICD
- Describir la importancia de las bacterias comensales de la microbiota intestinal de pacientes asintomáticos a *C. difficile* y pacientes sanos para describir los posibles mecanismos para la prevención del desarrollo de la ICD

8. MATERIAL Y MÉTODOS

8.1. Estrategia de trabajo

El estudio observacional transversal y prospectivo se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular de Enteropatógenos del Centro de Investigación en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias ICUAP en la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP).



8.2. Técnicas y procedimientos

8.2.1. Selección de muestras fecales y definición de condiciones

Para este estudio se tomaron en cuenta muestras de heces diarreicas recolectadas en estudios anteriores de pacientes hospitalizados en el periodo comprendido de julio del 2018 a julio del

2019 de los siguientes hospitales: Hospital Ángeles Puebla, Hospital General de Zona no. 20 IMSS La Margarita Puebla y Hospital Infantil de México “Federico Gómez”. Además, en el periodo de mayo a diciembre del 2023 se recolectaron muestras del hospital MAC Puebla, a todas las muestras se les realizaron estudios de laboratorio clínico en sus respectivos hospitales para determinar la presencia de toxinas de *C. difficile* para clasificarlos como pacientes sintomáticos. De igual forma se consideraron muestras de heces fecales de estudios anteriores de individuos voluntarios de la ciudad de Tehuacán, Puebla recolectadas en el periodo de julio del 2018 a junio del 2019 y que a través de pruebas moleculares y de cultivo se aisló a *C. difficile* clasificando a estos pacientes como portadores asintomáticos.

Se definió como **paciente sintomático de ICD (S)** a la muestra de heces para la cual se reportará una consistencia líquida lo que se consideró como indicador de diarrea y que sea positiva al PCR del gen *tpi* y el gen de al menos alguna toxina de *C. difficile*, por último, se definió como **paciente asintomático portador a *C. difficile* (A)** a la muestra de heces que tuviera una consistencia pastosa o sólida y que fue positiva al PCR del gen *tpi* de *C. difficile*

Para estudiar las diferencias en la diversidad de la microbiota intestinal con paciente sanos, se empleó una muestra de heces de nuestra biblioteca que fue negativa para el gen *tpi* y para los genes de las toxinas de *C. difficile*, sin embargo, es positiva para el cultivo en medio CCFA-TC observándose bacilos Gram positivos. De igual forma se incluyó la secuenciación 16S de un paciente sano del estudio realizado en nuestro país y publicado previamente en 2017, todos los datos se descargaron a través del portal EBI mediante el número de BioProject ID: PRJNA414451 (Camacho et al., 2017).

8.2.2. Extracción de ADN metagenómico de muestras

Las alícuotas de las muestras se descongelaron a temperatura ambiente y se pesaron 0.200 g de cada muestra fecal poniéndolas en un tubo eppendorf de 1.5 ml para la posterior extracción de DNA metagenómico.

El ADN metagenómico se extrajo mediante el Kit ZymoBIOMICS DNA Miniprep (Número de Catálogo D4300T, Zymo Research, Irvine, CA.) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN total de cada muestra se diluyó en agua libre de Dnasa/Rnasa de ZymoBIOMICS y se mantuvo almacenada a -80°C hasta su envío para su respectiva secuenciación.

8.2.3. Medición de calidad y cantidad de ADN extraído

La calidad del ADN total se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, se pesaron 0.8g de este polisacárido disolviéndolo muy bien en 100 ml de buffer TAE (Tris-Acetato EDTA), y se empleó una cámara de electroforesis llenándola con el mismo buffer mencionado hasta que el gel estuviera perfectamente cubierto. Para cargar las muestras se mezcló 2 uL de extracción de ADN con 2 uL de buffer de carga y se colocaron en los pozos del gel. Para correr la electroforesis se utilizó un voltaje constante de 80V y al finalizar se tiñó el gel con bromuro de etidio para su visualización en la cámara de luz UV y se fotodocumentó.

Por último, la concentración de ADN se midió utilizando el equipo Nanodrop 2000 de Thermo Scientific conforme al manual de usuario del proveedor, ocupando 1uL de extracción de ADN de cada una de las 10 muestras, y como blanco se utilizó 1uL de agua libre de Dnasa/Rnasa de ZymoBIOMICS. La concentración de la muestra de ADN se calculó teniendo en cuenta el valor de absorbancia obtenida a una longitud de onda de 280 nm, 260 nm y 230 nm, mientras que la relación de absorbancia A260/280 y A260/230 se utilizó para evaluar la pureza de cada una de las muestras.

8.2.4. Amplificación y secuenciación de ADN

Todas las muestras se procesaron y analizaron con el Servicio de Secuenciación de ZymoBIOMICS para Análisis de Microbiomas (Zymo Research, Irvine, CA) y se enviaron a través de la empresa BiASYS México.

Para la preparación de Targeted Library todas las muestras enviadas de ADN se prepararon también para la secuenciación del gen 16S con el Quick-16STM NGS Library Prep Kit (Zymo Research, Irvine, CA) diseñado por la empresa Zymo Research para proporcionar la mejor cobertura del gen 16S manteniendo una alta sensibilidad. Los primers utilizados en este proyecto para la secuenciación fueron Quick-16STM Primer Set V3-V4 (Zymo Research, Irvine, CA).

La biblioteca de secuenciación se preparó utilizando una preparación de bibliotecas por reacciones de PCR en tiempo real para controlar los ciclos para evitar la formación de quimeras de PCR. Los productos finales de PCR se cuantificaron con lecturas de

fluorescencia de qPCR y agrupadas en base a la misma molaridad, por último, la biblioteca agrupada se limpió con Select-a-Size DNA Clean & Concentrator™ (Zymo Research, Irvine, CA), luego cuantificado con TapeStation (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) y Qubit® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, WA).

Un control estándar de ADN microbiano propiedad de ZymoBIOMICS (Zymo Research, Irvine, CA) se utilizó como control positivo para cada preparación de biblioteca y para la secuenciación final del gen 16D ARNr se utilizó el kit de preparación Quick -16S NGS (Zymo Research, Irvine, CA) empleando la plataforma Illumina MiSeq™ con un kit de reactivos para la amplificación de la región V3-V4 paired end de 600 ciclos, la secuenciación se realizó con un 10 % de adición de PhiX. Las secuencias metagenómicas de la microbiota intestinal de cada una de las muestras se obtuvieron en un archivo de formato .fastq para cada una.

8.2.5. Análisis Bioinformático de las secuencias del gen 16S, asignación taxonómica y creación de gráficos

Cada una de las secuencias obtenidas de la microbiota intestinal fueron importados al software bioinformático QIIME2 (<https://qiime2.org/>) y se analizaron con su complemento DADA2 basado en la variante de secuencia de amplicones (ASV) en la que se realizó el filtrado de calidad de las lecturas sin procesar emparejadas y con esto obtener una mejor resolución para el análisis de los datos. Además, se realizó un trimming a 300 bp en las secuencias forward y reverse respectivamente, se unieron y se buscaron las secuencias quiméricas para eliminarlas (Callahan *et al.*, 2016). La asignación taxonómica se realizó a través de las unidades taxonómicas operativas (OTU) utilizando la base de datos 16S de secuencia completa de Silva_138, un clasificador bayesiano *naive* Uclust from Qiime v.1.9.1 una base de datos 16S diseñada por el fabricante para ser empleada como referencia. Así mismo, cada OTU se correlacionó por definición en un 97% de similitud con la secuencia que se encontró de la base de datos. Los resultados de la asignación taxonómica se expresaron en abundancia relativa en porcentaje para los diferentes *phylum*, familia y género y los análisis de diversidad alfa y diversidad beta se realizaron con QIIME2 mediante el plugin Community Ecology Package (Caporaso *et al.*, 2010).

Por último, para la creación de los gráficos de todos los análisis se registraron en R Studio los resultados de los programas antes mencionados a R Studio (<https://www.rstudio.com/tags/rstudio-ide/>) y se corrieron con scripts propios del autor de este trabajo de investigación.

9. RESULTADOS

9.1. Selección y análisis de la población de estudio

Se seleccionaron un total 14 muestras de heces fecales, siendo 8 muestras de mujeres (72.7%) y 6 muestras de hombre (54.5%). Con respecto a su procedencia 4 muestras provienen del Hospital Ángeles de Puebla, 4 muestras del Hospital MAC Puebla y 6 muestras de la ciudad de Tehuacán, Puebla. Además 11 de las 14 muestras son de adultos en el rango de edad de 20 a 82 años, y 3 muestras son de infantes con 0, 1 y 8 años; el promedio de edad para los adultos fue de 38.27 años y para los infantes su promedio fue de 3 años (Figura 11 y Figura 12).

A todas las muestras se les realizaron estudios de laboratorio clínico en sus respectivos hospitales e investigaciones previas para determinar la presencia de toxinas de *C. difficile*, también se reportó la consistencia de las heces fecales de la muestra como solida-pastosa y líquida. De acuerdo con todos estos datos se clasificaron para su estudio dos grupos de pacientes: sintomáticos a ICD (S) y portadores asintomáticos de *C. difficile* (A). 6 muestras calificaron para el grupo S y 7 muestras calificaron para el grupo A, por último, 2 muestras clasificaron como control negativo: una seleccionada de nuestra biblioteca de muestras de voluntarios y una muestras de un estudio publicado anteriormente en nuestro país en 2017 descargando su secuencia metagenómica de la muestra a través del portal EBI mediante el número de BioProject ID: PRJNA414451 (Camacho et al., 2017), estas muestras de nombraron “C.NOtpi” y “C.Negativo” respectivamente (Tabla 4). De acuerdo con el resultado de la prueba de PCR de los estudios de laboratorio de cada una de las muestras, se determinó el patrón del toxinotipo de las muestras y se agruparon de acuerdo con el comportamiento que seguían (Tabla 5).

Todas las muestras mencionadas cumplieron con los criterios de inclusión y la muestra “C.Negativo” no se consideró para los porcentajes de edad y sexo ya que no se tienen esos datos.

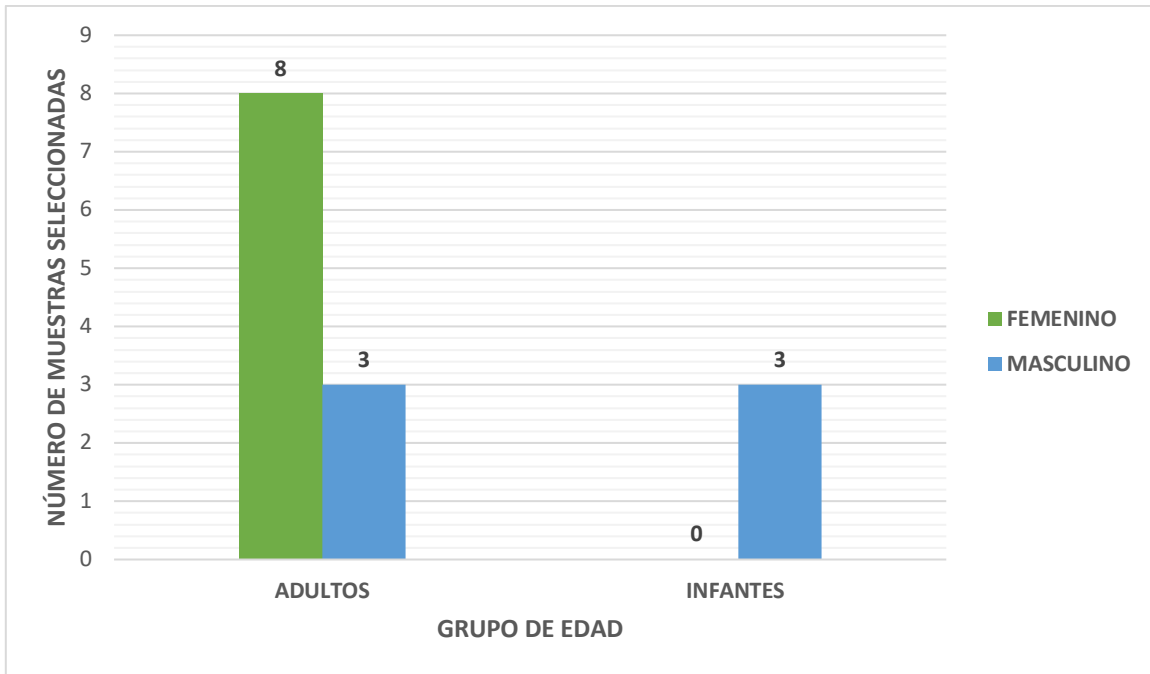


Figura 11. Distribución de muestras de acuerdo con el grupo de edad y el sexo.

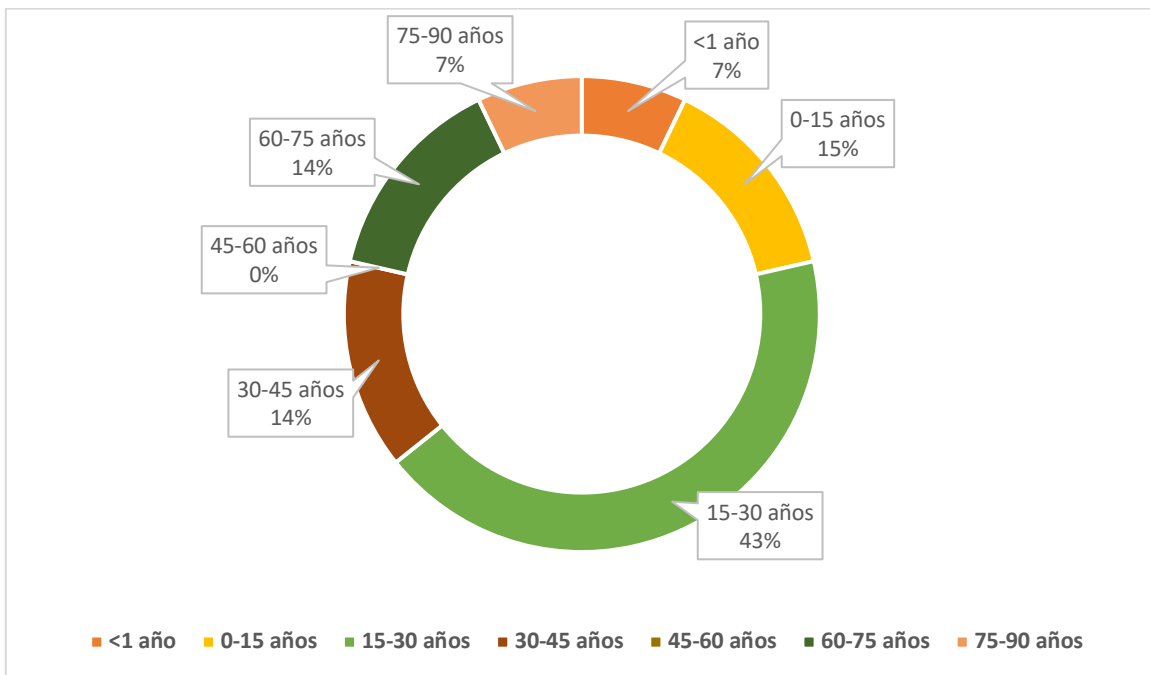


Figura 12. Distribución de muestras de acuerdo con el rango de edad.

Tabla 4. Características clínicas de la población de estudio

MUESTRA	SEXO	AÑOS	PROCEDENCIA	GRUPO	ELISA (TOXINA A Y B)			TINCIÓN GRAM	PCR				
					HECES	CULTIVO	HECES		<i>tpi</i>	<i>tcdA</i>	<i>tcdB</i>	<i>cdtA</i>	<i>cdtB</i>
S1	F	66	H. Ángeles Puebla	sintomático	Positivo	Líquida	Positivo	Gram positivo	+	+	+	+	+
S2	M	0a	H. Ángeles Puebla	sintomático	Positivo	Líquida	Positivo	Gram positivo	+	+	+	-	-
S3	M	35	H. MAC	sintomático	Positivo	Líquida	Positivo	Gram positivo	+	+	+	+	+
S4	M	27	H. MAC	sintomático	Positivo	Líquida	Negativo	Negativo	+	+	+	-	-
S5	F	82	H. MAC	sintomático	Positivo	Líquida	Positivo	Gram positivo	+	+	+	-	-
S6	F	61	H. MAC	sintomático	Positivo	Líquida	Negativo	Negativo	+	+	+	-	-
A1	F	22	Voluntario	asintomático	NR	Sólida	Positivo	Gram positivo	+	-	-	-	-
A2	M	20	Voluntario	asintomático	NR	Sólida	Positivo	Gram positivo	+	-	-	-	-
A3	F	20	Voluntario	asintomático	NR	Sólida	Positivo	Gram positivo	+	-	-	-	-
A4	F	25	Voluntario	asintomático	NR	Sólida	Positivo	Gram positivo	+	-	-	+	-
A5	M	1	Voluntario	asintomático	NR	Sólida	Positivo	Gram positivo	+	-	+	-	-
A6	F	20	H. Ángeles Puebla	asintomático	Positivo	Sólida	Positivo	Gram positivo	+	+	+	-	-
A7	F	43	H. Ángeles Puebla	asintomático	NR	Sólida	Positivo	Gram positivo	+	+	+	-	-
C(NOtpi)	M	8	Voluntario	control	NR	Sólida	Positivo	Gram positivo	-	-	-	-	-
C(-)	-	-	BioProject ID: PRJNA414451	control	-	Sólida	Negativo	Negativo	-	-	-	-	-

NR: no realizado

Tabla 5. Clasificación de muestras seleccionadas de acuerdo al toxintipo

ID MUESTRA	CULTIVO CCFA	PCR			TOXINOTIPO
		<i>tpi</i>	<i>tcdA/tcdB</i>	<i>cdtA/cdtB</i>	
S1, S3	Positivo	+	+/+	+/+	A+B+CDT+
S2, S4, S5, S6, A6, A7	Positivo	+	+/+	-/-	A+B+CDT-
A1, A2, A3	Positivo	+	-/-	-/-	No toxigénica
A4	Positivo	+	-/-	-/+	A-B-CDT+
A5	Positivo	+	-/+	-/-	A-B+CDT-
C(NOtpi)	Positivo	-	-/-	-/-	Control (-)

9.2. Extracción de ADN metagenómico de muestras seleccionadas

Tras el empleo del Kit ZymoBIOMICS DNA Miniprep (número de Catálogo D4300T, Zymo Research, Irvine, CA.) para la extracción de ADN metagenómico de cada muestra, se obtuvieron 30 ul de extracción de ADN de cada muestra.

Para comprobar la calidad de la extracción de ADN metagenómico se llevo a cabo una electroforesis en gel de cada una de las muestras obteniéndose dos imágenes de esta técnica (Figuras 13 y 14).

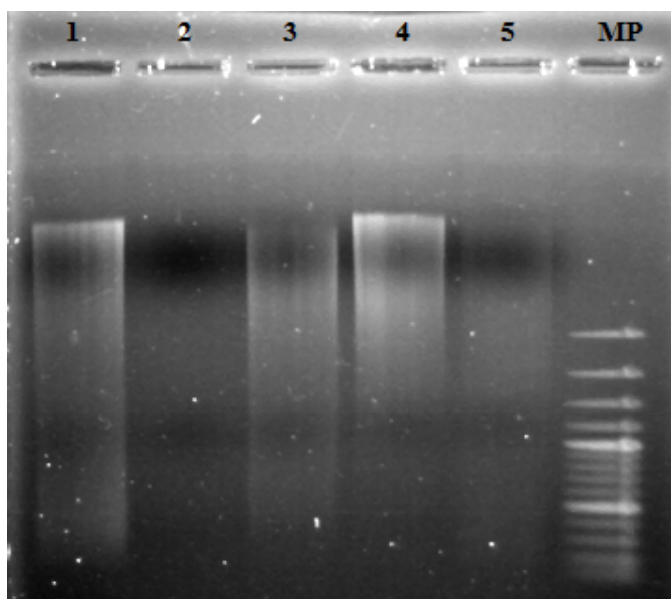


Figura 13. DNA metagenómico a partir de muestras fecales de pacientes sintomáticos y asintomáticos de ICD. Corrimiento electroforetico en gel de agarosa al 0.8% de muestras de ADN metagenómico. En el carril 1, 2, 3, 4 y 5 se encuentran las muestras S3, S4, S5 y S6 respectivamente, en el carril 5, se encuentra la muestra A5; y por último en el carril MP, marcador de peso molecular de 1kb.

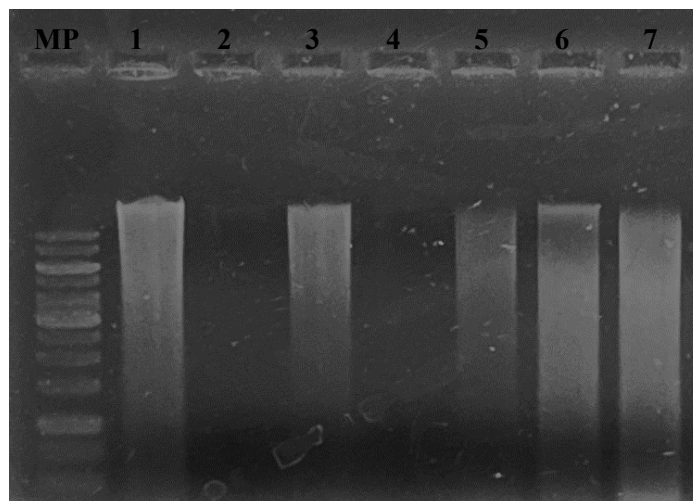


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% del ADN extraído de muestras. En el carril MP se encuentra un marcador de peso molecular de 1kb, en el carril 1, 2, 4 y 5 se encuentran las muestras A1, A2, A6 y A7 respectivamente, en el carril 3 y 6 se encuentra las muestras S2 y S1 respectivamente y por último, en el carril 7 se encuentra la muestra control negativo (C.NOtpi).

La concentración de ADN se midió utilizando el equipo Nanodrop 2000 de Thermo Scientific. Cuando la relación A260/280 tiene un valor entre 1.8-2.0 se considera un ADN de pureza óptima se tiene un valor entre 1.8-2.0. Un ADN de pureza aceptable debe tener al menos una relación A260/280 >1.6. Un valor A260/280 <1.6 indica una posible contaminación por compuestos aromáticos como fenoles y proteínas (Tabla 7 y Tabla 8).

Tabla 7. Valores de medición de la concentración y pureza de la extracción de ADN de muestras de portadores asintomáticos de <i>C. difficile</i> (A)							
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7
ng/uL	98.351	12.774	95.997	49.131	97.972	12.26	26.694
260/280	2.063	1.703	1.117	2.182	1.464	1.687	1.797

Tabla 8. Valores de medición de la concentración y pureza de la extracción de ADN de muestras de pacientes con ICD (S) y muestra control negativo (C.(NOtpi))							
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	C(NOtpi)
ng/uL	54.454	42.225	46.6	38	30.5	46.5	81.576
260/280	2.1183	2.332	2.24	2.25	1.8	1.91	2.141

9.3. Comparación taxonómica microbiana entre pacientes sintomáticos a ICD y portadores asintomáticos de *C. difficile*

Todos los archivos .fastq obtenidas de la secuenciación por método de Illumina (incluyendo a las muestras control para su posterior análisis) fueron analizados mediante los software QIIME2 y RStudio para su análisis bioinformático, asignación taxonómica y creación de gráficos. El Flujo de trabajo del programa se encuentra en el anexo 13.1 y los scripts utilizados para la creación de gráficos se encuentran en los anexos 13.2 y 13.3.

Se realizó una comparación de las asignaciones taxonómicas a nivel filo, familia y género entre el grupo S con el grupo A para evaluar cuantos y cuáles son los taxones que los diferencian y así determinar qué tan variante es la microbiota intestinal ante la ICD.

9.3.1. Diferencias a nivel de *phylum* entre los grupos S y A

Se reportaron 10 filos, de los cuales los que se reportaron para la mayoría de las muestras (n=13) fueron Firmicutes, Proteobacteria y Actinobacteria con una media de abundancia de 49.351, 21.334, 19.004 respectivamente, mientras que Tenericutes y Cyanobacteria fueron los filos menos abundantes con una media de abundancia de 0.004 y 0.020 respectivamente. Synergistetes y Tenericutes cada uno se reportó solo en las muestras S1 y A7 respectivamente, estos se encuentran debajo de Fusobacteria y Euryarcheota los cuales se reportaron en 4 (S1, S4, S5 y S6) y 3 (C.Negativo, S6 y A7) muestras respectivamente (Anexo 13.4).

Al comparar las medias de las abundancias relativas de los grupos S y A, a nivel de *phylum* de la microbiota intestinal de ambos grupos comparten un patrón de presencia en Actinobacteria, Firmicutes y Proteobacteria, sin embargo, la diferencia en la media de abundancia del último filo mencionado es muy notable ya que es mucho menor en el grupo A. A sí mismo, se observó que algunos filos solo estuvieron presentes en el grupo S como Fusobacteria y Synergistetes, mientras que para el grupo A el filo Tenericutes fue exclusivo de este grupo (Tabla 9). En las muestras S2, A3 y A5 se observó una relación y abundancia similar en Actinobacteria:Firmicutes con un porcentaje de 67.55%:28.108, 67.05%:45.329% y 52.882%:45.329% respectivamente (Figura 15).

Para el grupo S los más abundantes fueron Proteobacteria, en especial las muestras S3, S4, S5 y S6, seguido de Firmicutes con una media de abundancia del 41.388 y 25.60 para ambos filos respectivamente. Actinobacteria y Bacteroidetes reportaron una abundancia menor de 14.084 y 13.269; estos tres últimos filos se encontraron presentes en todas las muestras de este grupo. Euryarcheota y Cyanobacteria fueron los que presentaron en una media de abundancia casi nula, sin embargo, Cyanobacteria se reportó presente en 4 muestras (Tabla 9).

Tabla 9. Cálculo de media de las abundancias relativas y número de muestras a nivel phylum presentes en el grupo S, grupo A y cálculo total de ambos grupos S y A						
TAXON: phylum	GRUPO S		GRUPO A		GRUPO S Y A	
	MEDIA	MUESTRAS	MEDIA	MUESTRAS	MEDIA	MUESTRAS
Actinobacteria	14.084	6	23.924	7	19.004	13
Bacteroidetes	13.269	5	1.600	4	7.434	9
Cyanobacteria	0.026	4	0.014	2	0.020	6
Euryarcheota	0.004	2	1.809	1	0.907	3
Firmicutes	25.600	6	73.103	7	49.351	13
Fusobacteria	0.886	4	0.000	0	0.443	4
Proteobacteria	41.388	6	1.279	7	21.334	13
Synergistetes	0.437	1	0	0	0.219	1
Tenericutes	0	0	0.008	1	0.004	1
Verrucomicrobia	4.107	5	0.381	3	2.244	8

Las muestras que reportaron más filos fueron S5 y S6 con 8 filos, para S1 y S4 se reportaron 7 filos, mientras que las muestras con menos filos fueron S3 con 5 y S2 con 4 filos. S4 y S6 siguieron un patrón similar con la abundancia de los filos Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes y Actinobacterias teniendo una abundancia de 50.195%, 32.045, 12.302 y 3.068, y 52.432, 26.621, 16.157 y 2.099 respectivamente para los filos y las muestras. S1 es la única muestra que tiene una mayor abundancia en Bacteroidetes con 43.191% y presenta una abundancia considerable de 21.289 en Verrucomicrobiota. Por último, se observa una abundancia remarcada para Proteobacteria en las muestras S3, S4, S5 y S6. (Figura 15 y Anexo 13.4).

En el grupo A los filos más abundantes fueron Firmicutes y Actinobacteria con una media del 73.103 y 23.924 respectivamente, siendo mayor la abundancia reportada en Firmicutes que en el grupo S. En este grupo el comportamiento de los filos menos abundantes es similar

al del grupo S, estos fueron Tenericutes y Cyanobacteria con una media de abundancia del 0.008 y 0.0014 respectivamente. Los filos que Firmicutes, Actinobacteria y Proteobacteria se encontraron reportados en todas las muestras de pacientes asintomáticos, sin embargo, Proteobacteria se reportó en una media muy baja de solo 1.279 (Tabla 9).

Las muestras A1, A2, A6 y A7 comparte un patrón similar en la abundancia del filo Firmicutes con un porcentaje de 92.075%, 86.905%, 86.532% y 82.636% respectivamente. Se observa una abundancia mayor de Actinobacteria para las muestras A3 y A5 con 67.058% y 52.882%, para las muestras A4 y A6 también es sobresaliente la abundancia de este filo, pero se reporta en un porcentaje menor teniendo 23.972% y 11.896%. A pesar de reportar una abundancia casi nula el filo de Proteobacteria se encuentra presente en todas las muestras, mientras que Euryarcheota solo se observa en la muestra A7 con una abundancia remarcada de 12.663% (Figura 15).

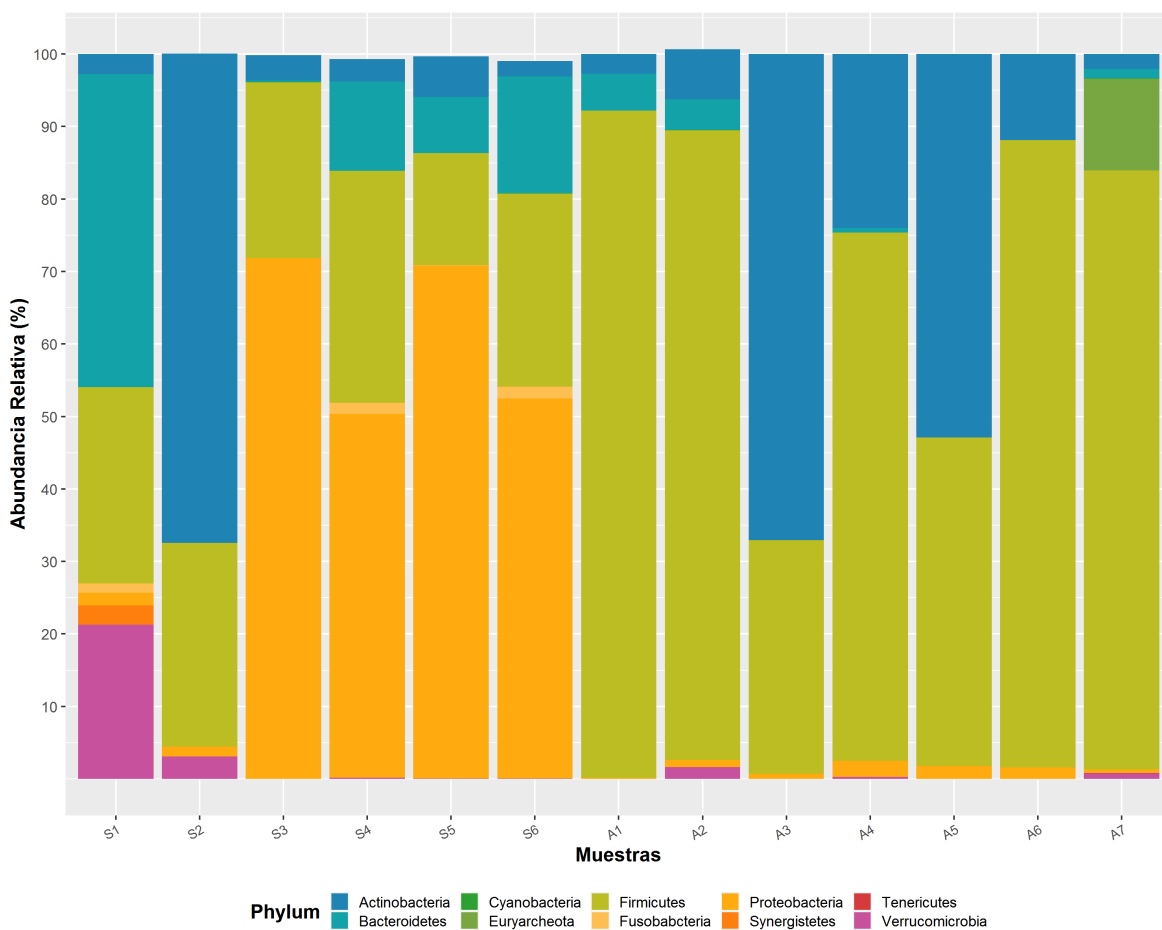


Figura 15. Gráfico de barras de la caracterización de la microbiota intestinal mexicana de pacientes sintomáticos a ICD y portadores asintomáticos a *C. difficile* a nivel taxonómico Filo.

9.3.2. Diferencias a nivel de familia entre los grupos S y A

Se reportaron un total de 33 familias, teniendo una mayor abundancia *Lachnospiraceae* con una media de 23.839, seguido de *Enterobacteriaceae* con 18.360 pero sólo está presente en 4 de 14 muestras estudiadas, y *Bifidobacteriaceae* con 16.898. Las familias *Erysipelotrichaceae* y *Bacteroidaceae* están presentes con una media menor de 6.528 y 4.365, sin embargo, se encuentran presentes en la mayoría de las muestras de estudio. Otra familia con ese comportamiento es *Coriobacteriaceae* y *Acidaminococcaceae* ya que se encuentran presentes en 12 muestras, pero tiene una media de abundancia mínima de 1.383 y 2.607, así como *Streptococcaceae* presente en 13 muestras con una media de abundancia de 3.169 (Tabla 10 y Anexo 13.5). Los grupos minoritarios fueron excluidos debido a que apenas son visualizables en el gráfico, para la consulta la tabla de abundancia relativa de todas las familias reportadas ir al Anexo 13.4.

TAXON: familia	GRUPO S		GRUPO A		GRUPO S Y A	
	MEDIA	MUESTRAS	MEDIA	MUESTRAS	MEDIA	MUESTRAS
<i>Acidaminococcaceae</i>	2.616	6	2.598	6	2.607	12
<i>Actinomycetaceae</i>	0.222	6	0.034	2	0.128	8
<i>Bacteroidaceae</i>	7.691	5	1.039	4	4.365	9
<i>Bifidobacteriaceae</i>	11.678	5	22.118	7	16.898	12
<i>Christensenellaceae</i>	0.017	4	1.783	3	0.900	7
<i>Clostridiaceae</i>	0.769	5	5.451	3	3.110	8
<i>Coriobacteriaceae</i>	1.128	6	1.637	6	1.383	12
<i>Enterobacteriaceae</i>	36.721	4	0.000	0	18.360	4
<i>Enterococcaceae</i>	4.026	6	0.103	3	2.064	9
<i>Erysipelotrichaceae</i>	1.623	6	11.432	7	6.528	13
<i>Fusobacteriaceae</i>	0.501	4	1.568	4	1.034	8
<i>Lachnospiraceae</i>	8.900	6	38.779	7	23.839	13
<i>Micrococccaceae</i>	0.116	4	0.000	0	0.027	4
<i>Peptostreptococcaceae</i>	0.679	4	0.010	1	0.344	5
<i>Porphyromonadaceae</i>	0.154	2	0.053	3	0.104	5
<i>Prevotellaceae</i>	0.208	5	0.407	4	0.308	9
<i>Rikenellaceae</i>	4.304	4	0.087	3	2.195	7
<i>Ruminococcaceae</i>	2.040	6	1.101	5	1.570	11
<i>Streptococcaceae</i>	2.093	6	4.246	7	3.169	13
<i>Synergistaceae</i>	0.004	1	0.294	3	0.149	4

Al comparar las medias de abundancia de ambos grupos, presentan un comportamiento similar tanto en su abundancia como en las familias presentes *Acidaminococcaceae*, *Coriobacteriaceae* y *Fusobacteriaceae*. Hablando de las familias exclusivas, se observan 13 algunas a mencionar son *Bacillaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Microbacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Verrucomicrobiaceae* que son exclusivas del grupo S, a pesar de que la mayoría de las familias en este grupo tiene una media de abundancia baja es el que más taxones se encontraron reportados en las muestras por ende es el grupo que presenta una mayor diversidad en la microbiota (Tabla 10 y Anexo 13.15).

En el grupo S se observó *Enterobacteriaceae* como la familia con una media de abundancia mayor de 36.721, sobre todo en las muestras S3, S5, S6 y S4 con una abundancia de 71.285%, 69.450%, 51.431% y 42.747% respectivamente. Por otro lado, *Bifidobacteriaceae* es otra familia con una mayor media de abundancia de 11.678, sin embargo, solo en la muestra S2 se reporta con una abundancia alta de 66.926% para las demás muestras su abundancia es mínima. Las muestras ordenadas de mayor a menor diversidad por la cantidad de familias reportadas son S6, S5, S4 y S3 con 32, 31, 31 y 29 familias reportadas. En la muestra S1 se nota un aumento de abundancia en las familias *Rikenellaceae* (24.020%) y para *Bacteroidaceae* en las muestras S2, S4, S5 y S6 con 18.203%, 9.162%, 7.881% y 11.117% respectivamente lo cual no se observa en las demás muestras, lo mismo sucede en S2 con la familia *Bifidobacteriaceae*. Por último, en las muestras S2, S3 y S6 se nota un aumento de abundancia en la familia de *Lachnospiraceae* con 20.775%, 12.656% y 10.558% para cada muestra respectivamente (Figura 16).

En el grupo A, se tienen a las familias con una media de abundancia mayor fueron: *Lachnospiraceae* con 38.779, *Bifidobacteriaceae* con 22.118 y *Erysipelotrichaceae* con 11.432. Se reportó un aumento de abundancia significativo para *Erysipelotrichaceae* en las muestras A2 (23.640%), A1 (20.997%), A7 (19.529%) y A4 (11.506%), este comportamiento también se reportó para *Streptococcaceae* en las muestras A6 (15.767%), A5 (7.102%), A4 (6.899%) y A3 (5.768). En las muestras A1, A2 y A6 se reportó una abundancia de *Acidaminococcaceae* con 7.037%, 4.294% y 3.963% respectivamente para cada muestra, al igual que con la muestra A7 con *Chistensenellaceae* 11.547% de abundancia (Figura 16).

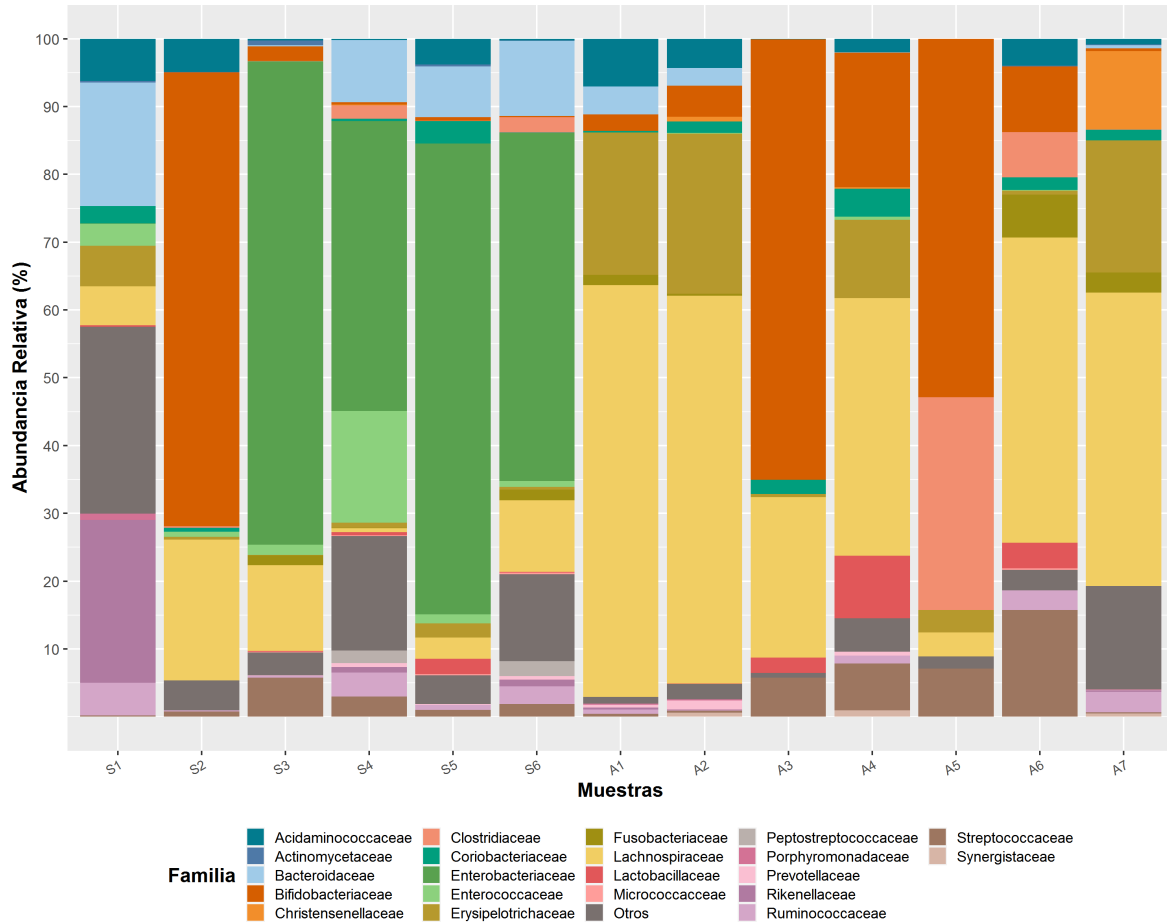


Figura 16. Gráfico de barras de la caracterización de la microbiota intestinal mexicana de pacientes sintomáticos a ICD y portadores asintomáticos a *C. difficile* y un control negativo a nivel taxonómico Familia.

9.3.3. Diferencias a nivel de género entre los grupos S y A

Se reportaron 79 géneros, de los cuales *Escherichia-Shigella*, *Bifidobacterium* y *Dorea* son los que presentan una media de abundancia mayor con 18.401, 16.872 y 7.925 respectivamente. Sin embargo, los géneros que se reportaron en un mayor número de muestras son *Eubacterium*, *Coprococcus*, *Weissella*, *Roseburia*, *Actinomyces* entre otros pero teniendo una media de abundancia mínima. Algunos géneros exclusivos que se identificaron en el grupo S son *Blautia*, *Butyvirio*, *Marvinbryantia*, *Pyramidobacter*, *Pseudomonas*, *Ruminiclostridium*, *Subdoligranulum*, *Terrisporobacter* y *Turicibacter*, para el grupo A se identificaron un total de 24 géneros exclusivos, teniendo este grupo una mayor diversidad en la microbiota intestinal, por nombrar a algunos géneros están *Actinomyces*, *Akkermansia*,

Alistipes, *Anaerostipes*, *Anaerotruncus*, *Bacteroidetes*, *Bifidobacterium*, *Blautia*, *Hemophilus*, *Intestinibacter*, *Lactobacillus* y *Turicibacter*. (Tabla 11 y Anexo 13.6). Los grupos minoritarios fueron excluidos debido a que apenas son visualizados en el gráfico, para la consulta la tabla de abundancia relativa de todos los géneros reportados ir al Anexo 13.5.

Tabla 11. Cálculo de media de las abundancias relativas y número de muestras a nivel género presentes en el grupo S, grupo A y cálculo total de ambos grupos S y A						
TAXON: género	GRUPO S		GRUPO A		GRUPO S Y A	
	MEDIA	MUESTRAS	MEDIA	MUESTRAS	MEDIA	MUESTRAS
<i>Actinomyces</i>	0.222	6	0.034	2	0.128	8
<i>Akkermansia</i>	0.148	4	0.023	1	0.086	5
<i>Alistipes</i>	0.301	4	0.125	2	0.213	6
<i>Bacteroidetes</i>	7.691	5	5.378	4	6.535	9
<i>Bifidobacterium</i>	11.626	5	22.118	7	16.872	12
<i>Clostridium</i>	0.363	5	0.036	2	0.199	7
<i>Collinsella</i>	0.613	4	1.365	5	0.989	9
<i>Dorea</i>	3.521	6	12.328	7	7.925	13
<i>Eggerthella</i>	0.772	6	0.044	2	0.408	8
<i>Enterococcus</i>	3.353	4	0.033	1	1.693	5
<i>Escherichia-Shigella</i>	36.763	4	0.039	1	18.401	5
<i>Faecalibacterium</i>	0.504	4	0.010	1	0.257	5
<i>Fusobacterium</i>	0.501	4	0.010	1	0.255	5
<i>Hungatella</i>	0.596	5	0.022	2	0.309	7
<i>Phascolarctobacterium</i>	0.772	5	0.284	4	0.528	9
<i>Ruminococcus</i>	1.398	4	0.094	2	0.746	6
<i>Streptococcus</i>	1.830	4	0.060	1	0.945	5
<i>Subdoligranulum</i>	0.490	5	0.000	0	0.245	5

En el grupo S el género más abundante fue *Escherichia-Shigella* con una media de abundancia de 36.763 y reportándose únicamente en las muestras S3, S4, S5, S6 con una abundancia de 71.241%, 36.479%, 69.386%, 43.469% respectivamente. El género *Bacteroidetes* tuvo una presencia no alta pero significativa en las muestras S1, S4, S5, S6 y S7 con una abundancia de 18.203%, 9.162%, 7.481% y 11.117%. En S2 se reporta una abundancia alta de dos géneros que solo se están presentes en esta muestra, *Bifidobacterium* con 66.926% y *Dorea* con 20.478, otra cosa en especial a S2 es que no se reportaron los suficientes géneros por lo que la hace en la muestra con la menor diversidad de la microbiota en este grupo. Se observa un incremento en los géneros *Streptococcus* para las muestras S3, S4, S5 y S6 con 5.626%, 2.621%, 1.002%, 1.729% de abundancia, de igual forma sucedió

con *Ruminococcus* para las muestras S4 y S6 con 3.797% y 4.539% de abundancia y con *Streptococcus* en la muestra S3 con de abundancia (Figura 17).

Para el grupo A el género más reportado es *Bifidobacterium* con una media de abundancia de 22.118 reportándose en todas las muestras, pero estando con una mayor abundancia en A5, A5 y A6 con 65.010%, 19.843% y 52.882%. *Dorea* es un género también con una media de abundancia alta con 13.328 sobresaliendo en las muestras A2, A3, A4 y A7 con 29.170%, 14.289%, 13.043% y 14.615% de abundancia respectivamente. Los géneros *Anaeroestipes*, *Eubacterium* y *Holdemanella* se encuentran con una media de abundancia baja pero significativa a diferencia de los demás géneros encontrados teniendo 5.451%, 5.496% y 4.606% respectivamente; para *Anaeroestipes* se reportó en las muestras A5 y A6 con una abundancia de 31.375% y 6.712%, *Eubacterium* se reportó en todas las muestras con una abundancia mayor en las muestras A3, A4, A5 y A6 con 5.768%, 9.071%, 7.102% y 15.596% respectivamente, por último *Holdemanella* se reportó en todas las muestras excepto en A6, resaltando en A1, A2, A4, A5 y A7 con 10.188%, 6.935%, 4.229%, 3.31% y 7.088% (Figura 17).

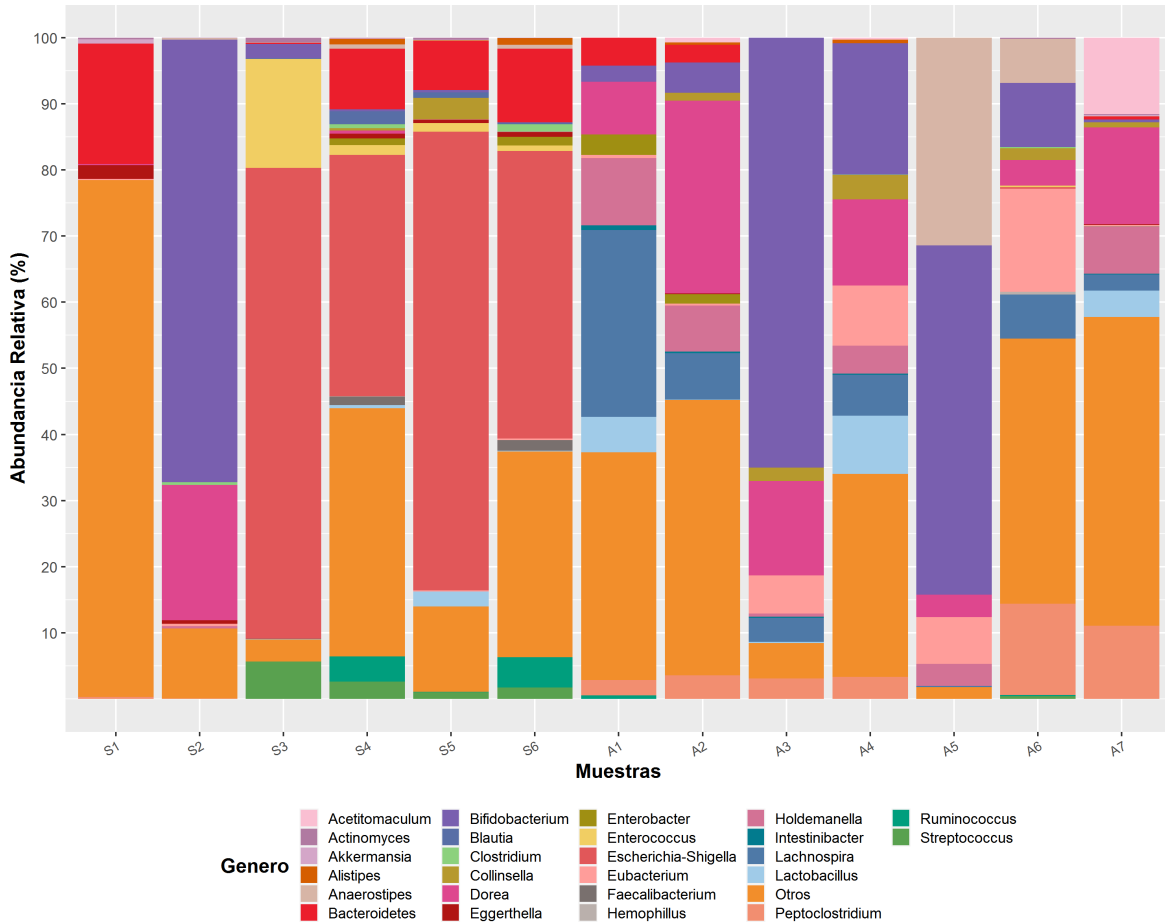


Figura 17. Gráfico de barras de la caracterización de la microbiota intestinal mexicana de pacientes sintomáticos a ICD y portadores asintomáticos a *C. difficile* y un control negativo a nivel taxonómico Género.

9.4. Diversidad beta de la microbiota intestinal

Para determinar las diferencias en abundancia de los taxones reportados en las muestras, se determinó el índice de Bray-Curtis en el que se pueden observar tres agrupaciones esquematizadas como un ovalo en color, las cuales nos indican que tienen una similitud en la composición de su microbiota a nivel especie, y son: la primera compuesta por las muestras A5, S2 y A3 (círculo color verde), resaltando que las primeras dos muestras son de pacientes infantiles, de un año asintomático y un paciente menor de un año sintomático respectivamente junto con un paciente de 20 años asintomático; la segunda agrupación compuesta por A4, S4, y A2 (círculo color azul), estos pacientes comparten la característica de estar en un rango de edad muy cercano (25, 27 y 20 años respectivamente); en la última agrupación se encuentran

las muestras C-Negativo, A1, y A7 (círculo color amarillo), aquí encontramos a un control negativo contra dos muestras de pacientes asintomáticos con el toxintipo de A-B- y A+B+ respectivamente (Figura 18).

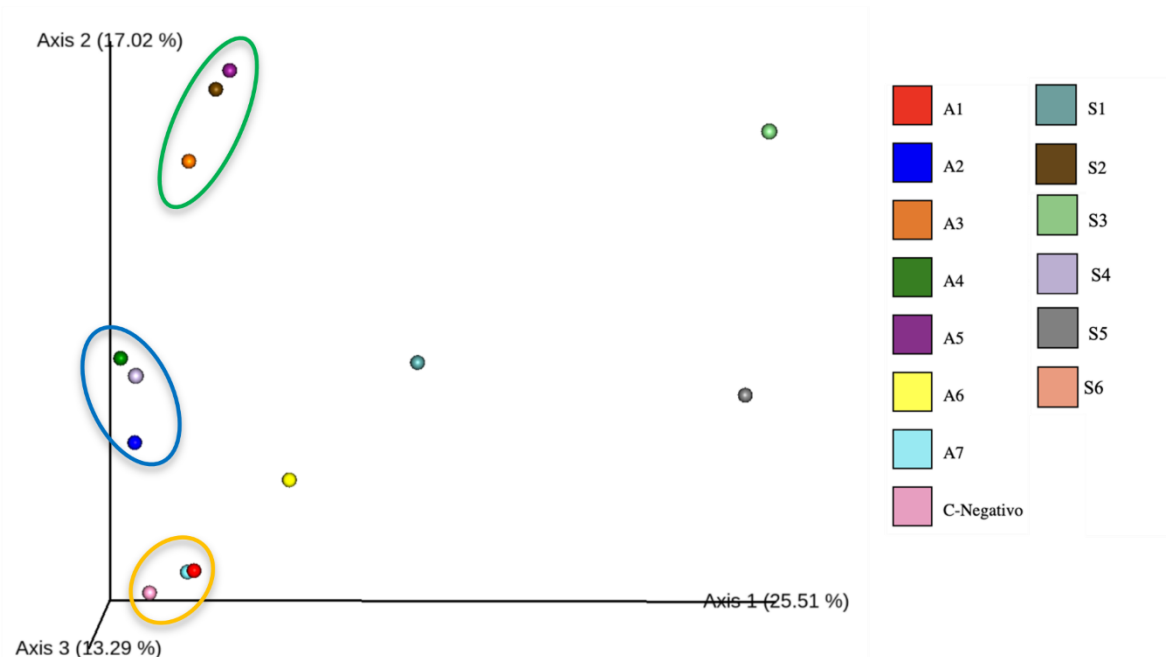


Figura 18. Análisis Diversidad beta, para determinar las diferencias en abundancia de los taxones a través del índice Bray-Curtis. Se encontraron 3 agrupaciones indicando una similitud en la composición de su microbiota a nivel especie, verde: muestras A5, S3 y A3, azul: A4, S4 y A2, y amarillo: C.Negativo, A1 y A7.

9.5. Relación entre los grupos de pacientes sintomáticos a ICD vs portadores asintomáticos de *C. difficile*

Para determinar si había diferencias significativas entre las comunidades microbianas se analizaron utilizando matrices de distancia UniFrac ponderada usando un gráfico de análisis de coordenadas principales y también se utilizó un análisis por pares de PERMANOVA. En la Figura 19, se observa una agrupación de 4 pacientes asintomáticos A3, A4, A5 y A6 y 1 paciente sintomático S2, dos muestras (A6 y S2) teniendo el mismo toxintipo +tpi y A+B+, A4 teniendo cdtA+ y A5 con toxintipo A-B+. Por último, dos muestras se encuentran muy cercanas al eje X A7 y S3, teniendo un toxintipo A+B+ y A-B- respectivamente (Figura 19).

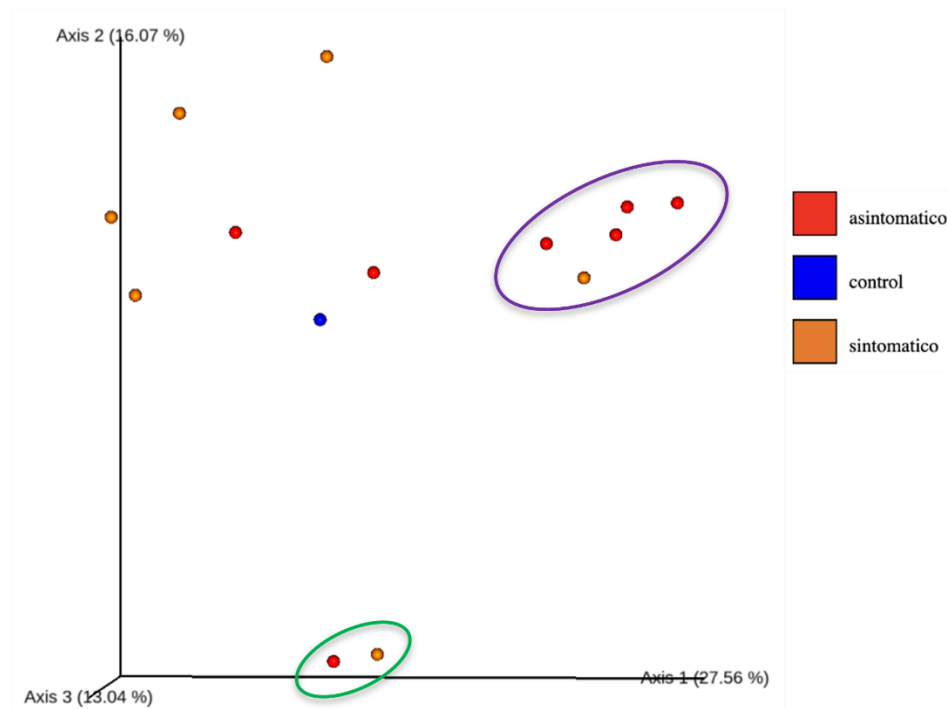


Figura 19. Matrices de distancia UniFrac ponderada basado en análisis por pares de PERMANOVA. Se reportaron dos agrupaciones indicando una similitud entre las muestras de la composición de su microbiota, morado: A3, A4, A5, A6 y S2, y verde: A7 y S3.

9.6. Relación contrastante entre el grupo de portadores asintomáticos de *C. difficile* (A) y controles negativos

Se realizó una comparación de las asignaciones taxonómicas a nivel filo, familia y género de las dos muestras control con el grupo A para evaluar cuantos y cuales taxones son los que los diferencian para determinar qué tan variante es la microbiota intestinal ante la colonización asintomática de *C. difficile*.

9.6.1. Diferencias a nivel de phylum entre los grupos C y A

Al comparar la cantidad de filos reportados en ambos grupos se observa una diferencia en cuanto a la diversidad de la microbiota intestinal, ya que en el grupo control en total solo se reportaron 5 filos mientras que en el grupo A se reportaron 8 filos. Para ambos grupos el filo Firmicutes se encuentra con mayor media de abundancia, reportando 89.455 el grupo C mientras que en el grupo A se tiene una media de abundancia de 73.103, sucede lo contrario con el filo Actinobacteria ya que se encuentra con mayor media de abundancia en el grupo A con 23.924 mientras que en el grupo C tiene una media de abundancia de 5.044 (Tabla 12).

En las dos muestras control negativo junto con A1, A2 se observa un patrón en la abundancia en los filos Actinobacteria y Firmicutes de 5.078% y 89.581% para C(Notpi), 5.010% y 89.328% para C.Negativo, A1 con 92.076% y 2.706%, por último A2 con 86.795% y 6.786%, respectivamente para ambos filos, lo mismo sucede con la abundancia del filo Proteobacteria, se observa un patrón en su abundancia para las muestras C.Negativo con 1.861%, A5 con 1.788% y A6 con 1.50%, para las muestras A2 con 0.859% y A3 con 0.719%, mientras que la muestra A4 tuvo la mayor abundancia con 2.211%, (Figura 20).

Tabla 12. Cálculo de media de las abundancias relativas y número de muestras a nivel <i>phylum</i> presentes en el grupo control y grupo A				
TAXON: <i>phylum</i>	GRUPO CONTROL		GRUPO A	
	MEDIA	MUESTRAS	MEDIA	MUESTRAS
Actinobacteria	5.044	2	23.924	7
Bacteroidetes	3.465	2	1.600	4
Cyanobacteria	0	0	0.014	2
Euryarcheota	0.957	2	1.809	1
Firmicutes	89.455	2	73.103	7
Fusobacteria	0	0	0	0
Proteobacteria	1.079	2	1.279	7
Synergistetes	0	0	0	0
Tenericutes	0	0	0.008	1
Verrucomicrobia	0	0	0.381	3

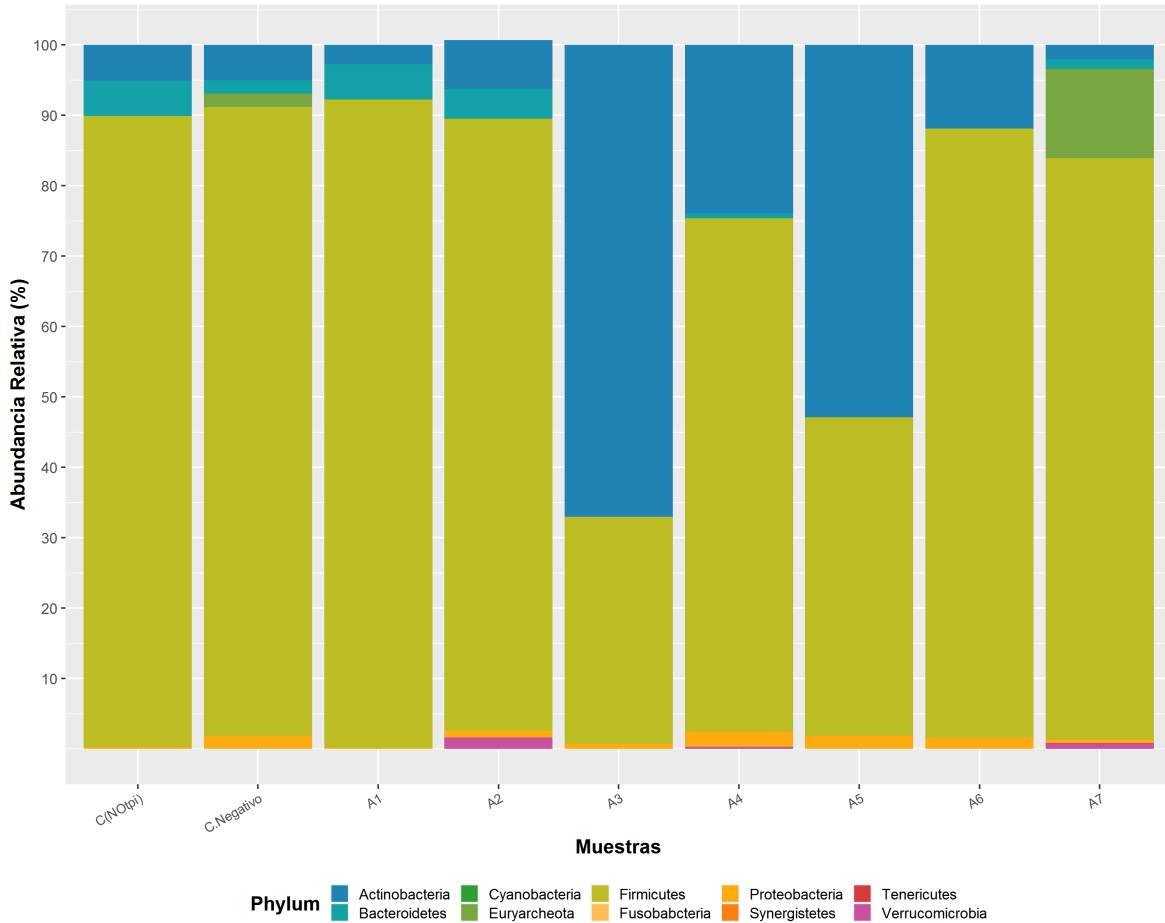


Figura 20. Gráfico de barras de la caracterización a nivel taxonómico de *phylum* de la microbiota intestinal mexicana de pacientes portadores asintomáticos a *C. difficile* y un controles negativos.

9.6.2. Diferencias a nivel de familia entre los grupos C y A

Se reportó un total de 17 familias en el grupo C mientras que en el grupo A se reportaron 25 familias (Anexo 13.5). Para el grupo C las familias con una mayor media de abundancia son *Lachnospiraceae* con 49.906, *Ruminococcaceae* con 16.706 y *Erysipelotrichaceae* 13.977, mientras que para el grupo A estas mismas familias se encuentran con una menor media de abundancia con 38.779, 1.101 y 11.432 respectivamente. Además en este grupo se reporta una media de abundancia mayor de *Bifidobacteriace* con 22.118 en comparación al grupo C que solo tiene 1.874 (Tabla 13). Los grupos minoritarios fueron excluidos debido a que apenas son visualizables en el gráfico, para la consulta la tabla de abundancia relativa de todos los géneros reportados ir al Anexo 13.6.

Dentro de las familias destacan el patrón en la abundancia en *Lachnospiraceae* en ambas muestras del grupo C, C.NOtpi con 54.029% , C.Negativo con 45.783% y en las muestras del grupo A, A1 con 60.706%, A2 con 57.228%, A5 con 45.014% y A6 con 43.309%. En la muestra C.Negativo se observa un aumento significativo de la familia *Ruminococcaceae* teniendo una abundancia de 32.913% frente a las demás muestras que su abundancia es casi nula. Se observa un patrón de abundancia en la familia *Erysipelotrichaceae* en las muestras C.NOtpi con 22.410%, A1 con 20.997%, A2 con 23.640% y A7 con 19.529%. Por último se reporta una abundancia de *Christensenellaceae* únicamente en las muestras C.NOtpi con y A7 con 11.547% (Figura 21).

Tabla 13. Cálculo de media de las abundancias relativas y número de muestras a nivel familia presentes en el grupo control y grupo A

	GRUPO CONTROL		GRUPO A	
	MEDIA	MUESTRAS	MEDIA	MUESTRAS
TAXON: familia				
Acidaminococcaceae	1.290	1	2.598	6
Actinomycetaceae	0	0	0.034	2
Bacteroidaceae	2.804	2	1.039	4
Bifidobacteriaceae	1.874	2	22.118	7
Christensenellaceae	2.785	1	1.783	3
Clostridiaceae	1.833	2	5.451	3
Coriobacteriaceae	3.171	2	1.637	6
Enterobacteriaceae	0.866	1	0.000	0
Enterococcaceae	0.557	2	0.103	3
Erysipelotrichaceae	13.977	2	11.432	7
Fusobacteriaceae	1.235	1	1.568	4
Lachnospiraceae	49.906	2	38.779	7
Micrococcaceae	0	0	0.000	0
Peptostreptococcaceae	0	0	0.010	1
Porphyromonadaceae	0.347	1	0.053	3
Prevotellaceae	0	0	0.407	4
Rikenellaceae	0.314	2	0.087	3
Ruminococcaceae	16.706	2	1.101	5
Streptococcaceae	0.511	1	4.246	7
Synergistaceae	0	0	0.294	3

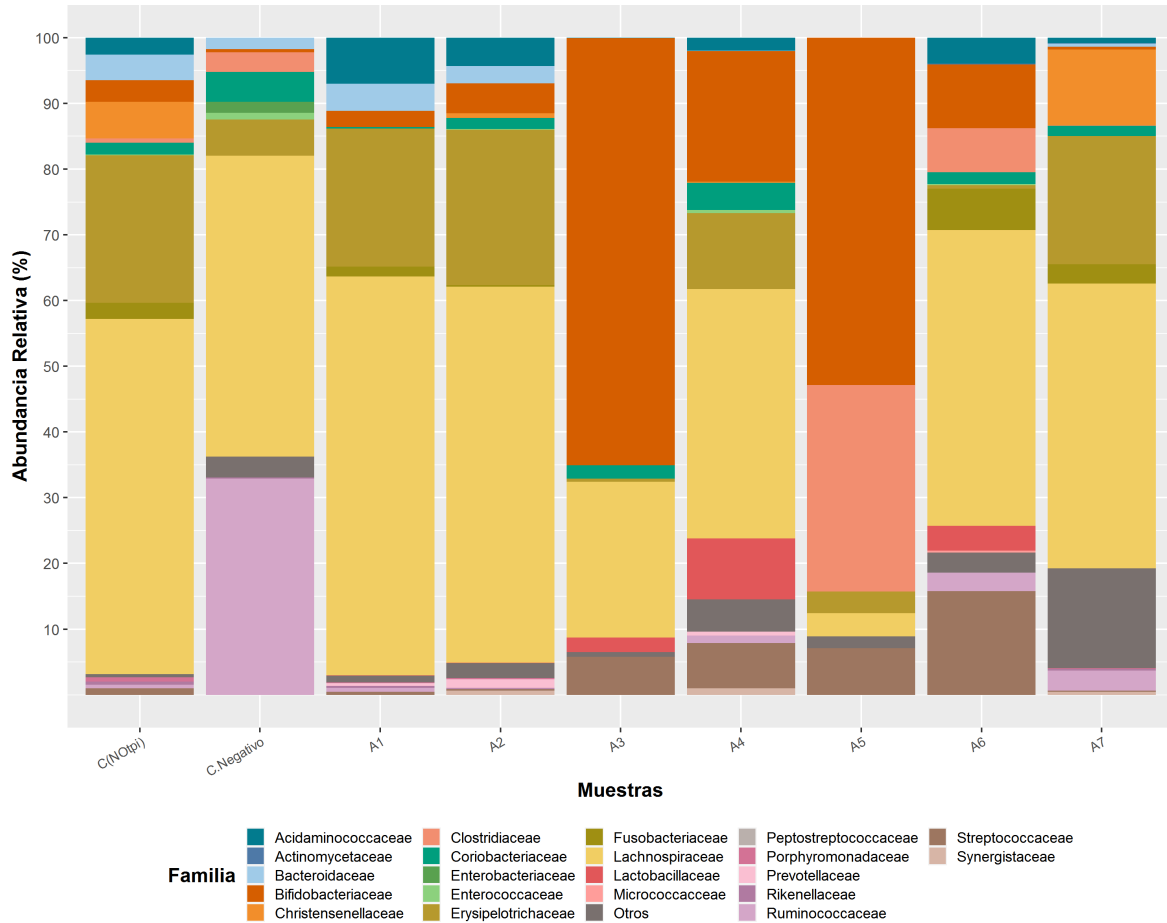


Figura 21. Gráfico de barras de la caracterización de la microbiota intestinal mexicana de pacientes portadores asintomáticos a *C. difficile* y un controles negativos a nivel taxonómico Familia.

9.6.3. Diferencias a nivel de género entre los grupos C y A

En el grupo C se reportaron 42 géneros mientras que en el grupo A se reportaron 66 géneros, de ellos los que presentaron una media de abundancia mayor en el grupo C fueron los géneros *Ruminococcus* con 9.875, *Dorea* con 9.737, *Blautia* con 8.245, *Peptoclostridium* con 5.342, y *Coprococcus* con 5.091; para el grupo A los géneros con mayo media de abundancia fueron *Bifidobacterium* con 22.118, *Dorea* on 12.328 y *Lachnospira* con 7.769. (Tabla 14). Los grupos minoritarios fueron excluidos debido a que apenas son visualizables en el gráfico, para la consulta la tabla de abundancia relativa de todos los géneros reportados ir al Anexo 13.7.

Tabla 14: Cálculo de las media de la abundancias relativas y numeros de muestras a nivel género presentes en el grupo S y grupo A

TAXON: género	GRUPO CONTROL		GRUPO A	
	MEDIA	MUESTRAS	MEDIA	MUESTRAS
Actinomyces	0	0	0.034	2
Akkermansia	0	0	0.023	1
Alistipes	0.078	2	0.125	2
Bacteroidetes	2.542	2	4.989	4
Bifidobacterium	1.874	2	22.118	7
Blautia	8.245	2	0.000	0
Clostridium	3.028	2	0.036	2
Collinsella	2.443	2	1.365	5
Copococcus	5.091	2	3.482	6
Dorea	9.737	2	12.328	7
Eggerthella	0.274	1	0.044	2
Enterococcus	0.048	2	0.033	1
Escherichia-Shigella	0	0	0.039	1
Faecalibacterium	2.531	2	0.010	1
Fusobacterium	0	0	0.010	1
Hungatella	0.028	1	0.022	2
Lachnospira	4.258	1	7.769	7
Peptoclostridium	5.342	1	5.303	6
Phascolarctobacterium	0.363	1	0.284	4
Ruminococcus	9.875	2	0.094	2
Streptococcus	0	0	0.060	1
Subdoligranulum	0.267	2	0	0

En cuanto a género en específico de las muestras, en *Blautia* se reporta en la muestra C.Negativo que representa 16.489% de abundancia mientras que estuvo ausente en el grupo A, para *Bifidobacterium* se presenta en 6 de las 7 muestras del grupo A con muestras donde se aprecia un aumento en la abundancia como en A3 con 65.010% y A5 con 52.882% frente a las muestras del grupo C en C(NOtpi) con 3.278% y en C.Negativo con 0.469%, para el género *Dorea* se produce un patrón de abundancia en las muestras C(NOtpi) con 13.292%, A3 con 14.280%, A4 con 13.042% y en A7 con 14.615%. Además se aprecia un aumento en la abundancia del género *Clostridium* en la muestra C.Negativo con 5.869% frente a que en el grupo A solo está presente en dos muestras con su abundancia casi nula A3 con 0.078% y A6 con 0.171%, este mismo comportamiento se observa para *Collinsella* para C.Negativo con 4.542% frente a las muestras del grupo A donde se encuentran en el rango de 1.193-2.047% de abundancia. Es importante destacar la presencia del género *Anaerostipes* para dos

muestras del grupo A en A5 con 31.375% y A6 con 6.712 de abundancia mientras que que las muestras del grupo C es casi nula (Figura 22).

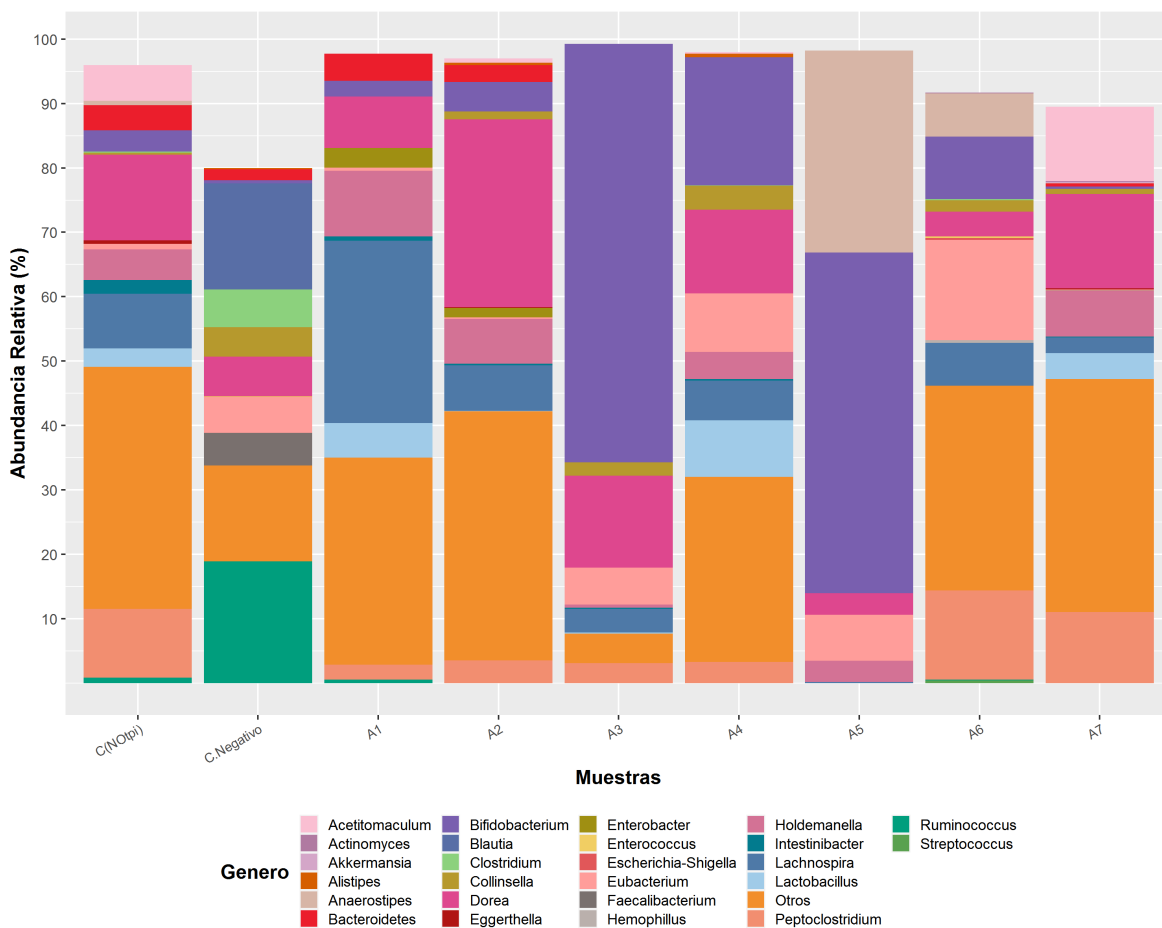


Figura 22. Gráfico de barras de la caracterización de la microbiota intestinal mexicana de pacientes portadores asintomáticos a *C. difficile* y un controles negativos a nivel taxonómico Género.

10. DISCUSIÓN

La incidencia de las enfermedades diarreicas asociadas a *C. difficile* han aumentado en los últimos años y se ha convertido en uno de los principales patógenos causantes de infecciones nosocomiales en países desarrollados. Sin embargo, su epidemiología ha cambiado puesto que la ICD estaba definida como una enfermedad nosocomial exclusiva pero el progresivo aumento de casos provenientes de la comunidad ha provocado una alerta ante el cambio en la epidemiología de esta bacteria patógena. En México y América Latina la incidencia de *C. difficile* es poco reportada por lo que este estudio es de ayuda en la generación de conocimiento epidemiológico. A la par no existen lo suficientes estudios específicos sobre la caracterización de la microbiota intestinal sana y su relación con ICD, así como estudios sobre la microbiota intestinal de portadores asintomáticos de *C. difficile* por lo que en este estudio de metagenómica el conocer la composición de la microbiota intestinal nos da un panorama hacia el impacto que pueden tener las bacterias comensales de nuestra microbiota intestinal sobre el desarrollo de ICD y la resistencia de las mismas para el pronóstico y tratamiento de esta enfermedad.

En este apartado se discuten los resultados obtenidos sobre las medias abundancias relativas entre los grupos de estudio S, A y C en los taxones a nivel filo, familia y género comparándolos con estudios previos basados en el estudio de la composición de la microbiota para buscar las posibles explicaciones del comportamiento de ciertas comunidades bacterianas reportadas y sus interacción con *C. difficile* en nuestra población de estudio.

- **Diferencias de composición de la microbiota intestinal mexicana en los grupos de estudio a nivel filo**

En el presente estudio se observa un descenso en el filo Actinobacteria del grupo S con 14.084 con respecto al grupo A con 23.924 . Esto es importante debido a que este filo engloba al género *Bifidobacterium* lo cual es importante para el estado de la microbiota intestinal de los pacientes colonizados por *C. difficile*. Milani et al., 2016, compararon pacientes con CDI frente a pacientes que no habían recibieron previo tratamiento con antibióticos como grupo control y observaron que se producía una reducción del género *Bifidobacterium* en el grupo CDI (Milani et al., 2016), esto concuerda con nuestros resultados. Jure Skraban et al., 2013, comparando muestras de heces de pacientes asintomáticos positivos a *C. difficile* encontraron

que *Bifidobacterium longum* era de mayor abundancia para el estado de portador asintomático de *C. difficile* considerándolo el mejor predictor (Jure Skraban, 2013). Weingarden et al., 2014, estudiando la microbiota intestinal en la CDI en pacientes sometidos a FMT con éxito y observaron que en las muestras de los pacientes después de su FMT se producía un aumento en Actinobacteria, lo que supone que son un filo importante en la restauración de la microbiota intestinal de los pacientes con ICD (Weingarden et al., 2014). Un hecho importante es que la abundancia relativa de *Bifidobacteriaceae* disminuye con la edad, ya que la microbiota intestinal de los bebés lactantes es rica en *Bifidobacterium* mientras que la microbiota intestinal de las personas mayores tiene proporciones reducidas de *Bifidobacterium*, *Ruminococcaceae*, *Lactobacillus* y *Faecalibacterium* y proporciones aumentadas de *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* y *Clostridium* permitiendo que la microbiota intestinal sea más sensible a infecciones oportunistas en la edad avanzada (Feuerstadt et al., 2022).

En el filo Firmicutes se observa una tendencia de disminución de la abundancia desde el grupo C con 89.455, el grupo A con 73.103, hasta el grupo S con 25.000. Esto es importante ya que debido a que la tendencia de disminución de Firmicutes tiene que ver con una pérdida de mecanismos de resistencia a la colonización (efecto barrera) y por ende esto conlleva al desarrollo de una ICD (Shahinas et al., 2012; Weingarden et al., 2014).

Es importante resaltar a Firmicutes como un filo fenotípicamente diverso, está compuesto por 26 familias y 223 géneros que en su mayoría son bacterias Gram positivas, pero también incluyen algunas Gram negativas. Además, dentro del filo Firmicutes se encuentran todas las bacterias que esporulan. Comprende a las clases *Erysipelotricha*, *Bacilli* y *Clostridia* siendo estas dos últimas las más importantes de la microbiota intestinal. En la clase *Bacilli* se encuentran 2 órdenes, *Bacillales* y *Lactobacillales*, para *Clostridia* engloba a *Clostridiales* y otros órdenes (Ludwig et al., 2009).

Los Firmicutes junto con Bacteroidetes son los filos más abundantes en una microbiota intestinal sana ya que tienen un papel importante en la digestión y metabolismo de componentes de la dieta como fibra y polisacáridos. Además, los Firmicutes participan en la fermentación anaerobia. La fermentación anaerobia en el colon es el proceso donde los carbohidratos, proteínas y otros residuos del hospedador o de la mucosa son metabolizados

en distintos productos finales. Esta vía metabólica permite a las bacterias la obtención de energía y el cumplimiento de sus funciones celulares. Unos productos finales importantes son los AGCC. Los *Clostridiales* son familias de bacterias importantes productoras de AGCC y debido a su disminución en los pacientes con ICD provoca la alteración de mecanismos de resistencia a la colonización de *C. difficile*. Los AGCC (principalmente el butirato) son importantes para la carga osmótica en el colon regulada por los colonocitos a través de su absorción y oxidación por lo que al no ser llevada esta acción se provoca una disminución en la carga osmótica provocando una diarrea osmótica, también este producto actúa directamente en el pH ácido del colon ayudando a la inactivación de enzimas microbianas y ciertos patógenos (Wu et al., 2011).

Otro papel importante de los AGCC es la regulación de secreción de citocinas proinflamatorias en las células inmunes del colon como TNF- α e IL-17, y IL-10 ya que este producto interactúa con los receptores de las células epiteliales del colon como el GPR41 y GPR43, este último ante la señalización es el encargado de la regulación de la respuesta inmune en el colon (Masui et al., 2013). Para la respuesta inmune adaptativa, varios estudios han descrito que el papel que los AGCC tienen en la producción y función de los linfocitos T reguladores, los cuales se encuentran en la lámina propia de la mucosa intestinal y pueden producir un efecto citotóxico (Linfocitos T CD8). O pueden secretar citocinas y controlar la respuesta inmunitaria (Linfocitos CD4) al momento de ser activados por los antígenos unidos al complejo mayor de histocompatibilidad de las células presentadoras de antígenos (Smith et al., 2013).

En el estudio de Han et al., 2019., describieron la composición de la microbiota intestinal de 20 controles sanos, 79 pacientes positivos a la toxina B de *C. difficile* y 58 pacientes con ICD mediante la secuenciación del gen 16S ARNr. En sus resultados se observa una leve disminución en Firmicutes y de Actinobacteria para todos los grupos, en control con 38.73, tcdB positivo con 34.02 y ICD con 33.19 (Han et al., 2019). A pesar de que las diferencias en la composición de los filos Firmicutes y Actinobacteria no fueron tan drásticas como en nuestros resultados, coinciden en la disminución de la abundancia de ambos filos ante la colonización de *C. difficile* y la exposición a sus toxinas antes del desarrollo de la ICD. Por otro lado, podemos ver que en la población que estamos estudiando, la mexicana, existe una

mayor cantidad mayor de Firmicutes y Actinobacterias tanto en el control (C.NOTpi y C.Negativo) como en nuestros portadores asintomáticos (A3, A4, A6 y A6) lo que podría representar una diferencia importante en las características de la microbiota intestinal mexicana con respecto a la de otros países y esta condición pudiera estar protegiendo a la población contra la ICD. Es importante notar que dentro de nuestros portadores asintomáticos tenemos pacientes que portan *C. difficile* toxigénico y no presentan enfermedad, pero si altos niveles de Firmicutes y Actinobacterias.

A diferencia del comportamiento de los filos anteriores, para el filo Proteobacteria se observó un drástico aumento en su abundancia, yendo del grupo C con 1.079 y en el grupo A con 1.279 al grupo S con 41.388 de abundancia. Este incremento del filo Proteobacteria se ha definido como un marcador de una disbiosis intestinal y como un criterio de diagnóstico para una patogénesis (Manges et al., 2010), de forma contraria se considera la ausencia de Proteobacterias como indicador de una microbiota intestinal sana. Esto se ha estudiado sobre todo en pacientes con inflamación intestinal severa como en la enfermedad inflamatoria intestinal, cáncer colorrectal y enterocolitis, así como en el síndrome metabólico y síndrome de colon tóxico (Shin et al., 2015). Por el otro lado, el aumento de Proteobacteria hace referencia al aumento de disponibilidad del oxígeno en el ambiente y de forma secundaria una pérdida de butirato o incluso la creación de un ambiente proinflamatorio intestinal (Litvak, 2017).

El alto predominio de anaerobios estrictos en el intestino y la limitación de oxígeno en el ambiente del colon tiene un impacto importante en el metabolismo y consumo de nutrientes por bacterias comensales de la microbiota intestinal. En el caso contrario, el aumento de la disponibilidad de oxígeno en el intestino grueso a consecuencia del cambio en la fisiología del epitelio intestinal por una exposición a antibiótico o la infección de patógenos entéricos, provoca la interrupción de la anaerobiosis y permite una ventaja selectiva para las bacterias anaerobias facultativas como las que pertenecen al filo Proteobacteria. Los colonocitos son la fuente principal de oxígeno en el colon y por otro lado las bacterias productoras de butirato como las que pertenecen al filo Firmicutes llevan a cabo la beta-oxidación de butirato mediante procesos fermentativos, este butirato es la principal fuente de energía de estas células que participan en el mantenimiento de la mucosa intestinal; por lo tanto ante una

disbiosis intestinal provoca un declive en las bacterias del filo Firmicutes conllevando un cambio en el metabolismo del colonocito que ahora llevará a cabo la glucólisis anaerobia, la cual utilizan menos oxígeno aumentando así la oxigenación en el ambiente del colon facilitando la expansión del filo Proteobacteria (Rivera-Chávez et al., 2017; Roberto Berni Canani et al., 2011). Además, la disminución de butirato en el colon provoca un ambiente proinflamatorio que conlleva a una hiperplasia en las criptas intestinales provocando un reemplazo de colonocitos hipóxicos a colonocitos indiferenciados normóxicos. Aunado a la inflamación del epitelio intestinal provocado por las toxinas A y B de *C. difficile* produce un aumento en las especies reactivas de oxígeno cuyo papel es oxidar compuestos de sulfuro endógenos a tetratoinato el cual actúa como aceptor de electrones permitiendo la expansión de anaerobios facultativos del filo de Proteobacteria (Winter et al., 2013). Por lo tanto, estos dos mecanismos, el aumento de la disponibilidad de oxígeno en el ambiente del colon, de compuestos aceptores de electrones, la disminución de butirato o la existencia de un ambiente proinflamatorio intestinal, produce el aumento de abundancia del filo Proteobacteria en los pacientes con ICD por efecto principal a la disbiosis de la microbiota intestinal.

Comparando nuestros resultados, Rea et al., 2012., por medio de la secuenciación 454 realizaron un análisis de pacientes portadores de *C. difficile* en función de la composición de la microbiota intestinal de 22 personas de la comunidad y de edad avanzada contra 123 personas como controles sanos. Los autores no reportaron una diferencia en la composición de la microbiota intestinal a nivel de filo a excepción de un leve aumento en la abundancia de Proteobacteria en el grupo de portadores de *C. difficile* con 4.3% contra 2.3% de abundancia que tuvieron sus controles sanos. A pesar de que sus resultados son diferentes a los nuestros en los cambios con otros filos, coinciden en el comportamiento del filo Proteobacteria con los mismos grupos que fueron comparados, esto permite confirmar la importancia de este filo en la disbiosis intestinal ante la colonización de *C. difficile* (Rea et al., 2012).

Con respecto al filo Verrucomicrobiota nosotros observamos un aumento en su abundancia en el grupo S 4.017 frente al grupo A con 0.381. Esto es importante debido a que a este filo pertenece la familia *Akkermansiaceae* y por ende el género *Akkermansia* siendo unos taxones

importantes en la microbiota intestinal predisponentes al desarrollo y patogénesis de la ICD (Weingarder et al., 2014; Sangster et al., 2016).

Por otro lado, Weingarder et al., 2014, evalúan la composición de la microbiota intestinal de pacientes con ICD antes y después de su tratamiento con TMF para comprobar la restauración de las comunidades microbianas y la composición metabólica del intestino y usando como controles sanos a los donantes de heces. Observaron que en las muestras después del TMF reportaron una disminución del género *Verrucomicrobiota* pero no igualando la abundancia que presentaron las muestras control que se encontraban en un nivel casi nulo, identificando a este filo como un biomarcador ante el desarrollo de una ICD (Weingarder et al., 2014).

En un estudio realizado por Sangster et al., 2016, caracterizaron los cambios en la microbiota intestinal ante una ICD para una mejor explicación de su patogenia. Ellos reportaron una abundancia significativa de una especie hasta entonces no antes mencionada en pacientes con ICD, *Akkermansia muciniphila*. Esta especie se ha relacionado directamente con un mecanismo de ayuda al desarrollo de ICD, ya que se ha reportado en diversos estudios que *A. muciniphila* es una bacteria degradadora de mucina una proteína de alto peso molecular que forma parte del moco en el colon. Un adecuado grosor de moco en el colon es esencial para el establecimiento y la conservación de bacterias comensales no patógenas y protectoras de la microbiota intestinal, por lo que ante una alta presencia de esta bacteria se altera la composición de la mucosidad proporcionando una ventaja selectiva para *C. difficile* para adherirse a las células epiteliales del colon e iniciar su colonización y por ende el desarrollo de la ICD (Sangster et al., 2016).

- **Diferencias de composición de la microbiota intestinal mexicana en los grupos de estudio nivel familia y género pertenecientes al phylum firmicutes**

En nuestros resultados se observa una disminución considerable en la abundancia de la familia *Ruminococcaceae* en el grupo A 1.101 con respecto al grupo C 16.706. En esta familia se encuentra el género *Subdoligranulum* el cual presenta una disminución respecto del grupo C con 0.267 frente a la nula abundancia reportada en el grupo A. De igual forma, observamos una disminución en la familia *Lachnospiraceae* desde el grupo C con 49.906 frente a 38.779 en el grupo A y 8.9 en el grupo S.

La reducción de la abundancia de las familias *Lachnospiraceae* y *Ruminococcaceae* se ha visto con anterioridad y se considera un comportamiento común en pacientes con ICD. En un estudio realizado con pirosecuenciación Roche 454 analizaron la composición de la microbiota intestinal de 39 pacientes con ICD, 36 pacientes con diarrea por nosocomial *C. difficile* negativa y 40 controles sanos, observaron una reducción de abundancia en *Lachnospiraceae* en el grupo con ICD con 11.2 y con diarrea nosocomial con 12.3 y en *Ruminococcaceae* con 3.0 y 2.8 respectivamente, ambas familias comensales intestinales normalmente son abundantes en controles sanos y reportaron abundancia en este grupo de 45.8 y 17.4 respectivamente (Antharam et al., 2013). Otro estudio metagenómico ahora realizado por shotgun compararon la microbiota intestinal en pacientes con ICD, pacientes con administración de antibiótico sin ICD previo, y sujetos controles sanos sin ICD y sin administración de antibióticos, reportó una reducción significativa de la familia *Lachnospiraceae* en los pacientes con ICD con 6.12 frente a los controles sanos con 13.64, al igual que en la familia *Ruminococcaceae* en los pacientes con ICD 0.13 frente a los controles sanos con 0.98; en este mismo estudio se realizó un modelo estadístico ajustado con la edad y variables clínicas de los pacientes con lo que pudieron determinar a *Ruminococcaceae* y *Subdoligranulum* como productores al desarrollo de ICD (Milani et al., 2016). Por último, en un estudio comparando pacientes con ICD, pacientes asintomáticos y pacientes controles sanos observaron una disminución significativa en *Lachnospiraceae* y *Ruminococcaceae* teniendo una mayor abundancia en los controles con 15.51 y 11.39 respectivamente frente a pacientes con ICD con 9.00 y 4.22 respectivamente, y pacientes asintomáticos con 10.91 y 6.86 respectivamente (Han et al., 2019). Nuestros resultados coinciden conforme a los cambios en la abundancia de una microbiota intestinal sana durante la colonización de *C. difficile* y el desarrollo de ICD, además nuestro grupo de A que son portadores de *C. difficile* presentan valores más cercanos a los de un control sano que a los de un enfermo con ICD.

En nuestros resultados de la familia *Erysipelotrichaceae* se observa un comportamiento interesante, un aumento en el grupo A con 11.432 con respecto al grupo S con 1.632 y una mayor abundancia en el grupo C con 13.997. Han et al., 2019., reportaron el mismo comportamiento para los mismos grupos de estudio en esta familia una disminución en su grupo de pacientes colonizados con 0.67 con respecto a su grupo de pacientes con ICD con

1.10 pero reportando una abundancia mayor en su grupo control de 1.13 pero no se le dio demasiada importancia para la discusión del resultado (Han et al., 2019). Por otra parte, el autor Kaakoush describió el papel de la familia *Erysipelotrichaceae* en la fisiología y enfermedad del huésped, ya que parecen ser altamente inmunogénicos y se han relacionado positivamente con los niveles del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α). Adicionalmente en un estudio con pacientes con infección crónica son capaces de prosperar después de una antibioterapia de amplio espectro observado en modelos murinos tratados con altas dosis de gentamicina (Kaakoush, 2015). Por otro lado, estudios de nutrición han descrito el papel de *Erysipelotrichaceae* en la grasa de la dieta y en trastornos metabólicos, por ejemplo, se han reportado niveles más altos de *Erysipelotrichaceae* en individuos obesos, al igual que una disminución de aproximadamente 2,5 veces en la abundancia de taxones de *Erysipelotrichaceae* en un modelo de hámster con hipercolesterolemia y que tuvo un tratamiento para mejorar la homeostasis del colesterol (Martínez et al., 2009; Zhang et al., 2009),

Con estos datos se puede intuir que la familia *Erysipelotrichaceae* podría tener impacto en el transcurso de una colonización por *C. difficile* asintomática al desarrollo de ICD explicando el aumento en la abundancia en el grupo A. Con respecto a nuestro grupo C, es probable que el aumento observado en los niveles de *Erysipelotrichaceae* en pacientes estén asociadas con los fenotipos de lípidos o colesterol del paciente y/o la dieta del paciente, pero esto no los descarta de tener un impacto significativo en la presentación y/o actividad de la ICD.

- **Diferencias de composición de la microbiota intestinal en los grupos de estudio a nivel familia y género pertenecientes al phylum bacteroidetes**

Dentro del filo Bacteroidetes, nosotros observamos un aumento en la familia *Bacteroidaceae* y del género *Bacteroides* a diferencia de lo que se ha reportado. En el grupo S con 7.691 frente a 1.039 del grupo A y 2.804 del grupo C. Del mismo modo el género *Bacteroides* se tiene un aumento en los grupos S con 5.387 y el grupo A con 4.989 frente al grupo C con 2.542.

El género *Bacteroides* ha sido muy estudiado debido a que se ha asociado con la pérdida de los mecanismos de resistencia a la colonización de *C. difficile* y el desarrollo de ICD. Zhang et al., 2016., en su estudio describieron las diferencias de la microbiota intestinal de 8

pacientes con ICD, 8 portadores asintomáticos de *C. difficile* y 8 pacientes sanos reportando una disminución del género *Bacteroides* en los pacientes con ICD con un puntaje de abundancia de 11 frente a los pacientes sanos con 31 de abundancia, sin embargo el grupo que tuvo una mayor abundancia fueron los pacientes portadores asintomáticos de *C. difficile* con 31 de abundancia (Zhang et al., 2016). En otro estudio también se describieron las diferencias de la microbiota intestinal pero esta vez con dos muestras de pacientes con ICD en la enfermedad y después de un TMF, en un principio recalcaron observar una gran diferencia entre las muestras esto debido a los diferentes ciclos de tratamiento por los que habían pasado los pacientes tratando de tener mejoría ante la ICD, también observaron que tras el TMF se produjo un incremento del género *Bacteroides* y a la par una reducción del género *Escherichia-Shigella* (Shahinas et al., 2012). Por último, Brown et al., 2018., desarrollaron un estudio para investigar la relación del cambio de la microbiota intestinal y los cambios metabólicos asociados al TMF en muestras de pacientes con ICD antes y después del TMF. Ellos determinaron los perfiles específicos de ácidos biliares primarios y secundarios y concluyeron que estos niveles están asociados con la diarrea asociada a *C. difficile*. Los autores no muestran el porcentaje de abundancia de las muestras estudiadas, sin embargo mencionan que el TMF provoca que la microbiota intestinal de los receptores recupere su abundancia y diversidad acercándose a la que observaron en las muestras de los donantes, también observaron que los géneros *Ruminococcus* y *Bacteroides* están intrínsecamente relacionados con el metabolismo de los ácidos biliares primarios por lo que ante una pérdida de estos géneros significa una pérdida de resistencia ante la colonización por *C. difficile* (Brown et al., 2018). Este último punto podría explicar el comportamiento del género visto en nuestras muestras al referirnos a la disminución de este género de 2.804 en el grupo C a 1.039 del grupo A, sin embargo, este género también ha sido considerado como un patógeno oportunista ya que tiene la capacidad de reconocer y metabolizar polisacáridos provenientes de la dieta del hospedador, los degrada y es capaz de adaptarse para generar carbohidratos más simples y que estos los puedan aprovechar otras bacterias presentes en la microbiota intestinal por lo que al aumentar su capacidad de supervivencia sumado a la adquisición de factores de virulencia puede provocar que un patógeno comensal pueda ser en un momento dado un patógeno oportunista explicando así el comportamiento que tiene el grupo S con 7.691 de abundancia para el género *Bacteroides* (Coney et al., 2001).

Dentro del filo Bacteroidetes, se observa un aumento en la familia *Rikenellaceae* el grupo S con 4.304 frente a los grupos A con 0.087 y el grupo C con 0.314, recalando la diferencia de abundancia entre los grupos S y A. Dentro de esta familia se encuentra *Alistipes* y se observa un pequeño aumento al comparar los tres grupos, en el grupo C con 0.078, grupo A con 0.213 y grupo S con 0.301. Este género es una bacteria comensal de la microbiota intestinal que se ha considerado como protector contra la ICD por diversos estudios realizados del análisis de la microbiota intestinal pues se ha descrito que hay pérdida de *Alistipes* ante la ICD, también en pacientes sometidos a TMF se ha visto que *Alistipes* ayuda a restaurar la microbiota de estos pacientes con éxito al aumentar su abundancia y disminuir la de géneros patógenos como *Escherichia-Shigella* (Shahinas, 2012; Milani et al., 2016). Zhang et al., 2015, reporta en su grupo de pacientes colonizados por *C. difficile* asintomáticos una disminución significativa para los géneros *Prevotella*, *Bacteroides* y *Alistipes* (Zhang et al., 2015). Nuestros resultados son discrepantes ante las evidencias descritas, sin embargo, nuevos estudios muestran que *Alistipes* es una bacteria que pudiera estar teniendo un papel en procesos de inflamación intestinal crónica, cáncer colorrectal y la salud mental asociado con signos mentales de depresión (Parker et al., 2020).

- **Diferencias de composición de la microbiota intestinal en los grupos de estudio a nivel familia y género pertenecientes al phylum Proteobacteria y Actinobacteria**

Dentro del filo Proteobacteria se encuentra la familia *Enterobacteriaceae* de la cual se observó una diferencia significativa en el grupo S con 36.721 con respecto al grupo C con 0.866, ligado a los incrementos del género *Escherichia-Shigella* en el grupo S con 36.763 frente al grupo A con 0.039 y el grupo C teniendo una nula abundancia de este género. Este comportamiento se reporta anteriormente por Milani et al., 2016. Ellos estudiaron metagenómicamente la microbiota intestinal en pacientes con ICD y pacientes que recibieron antibiótico sin ICD. Con respecto a este género, en su grupo de pacientes con ICD reportan un aumento de 10.69 frente a 0.92 de su grupo controles sanos (Milani et al., 2016). En otro estudio, Gu et al., 2016 evalúan los cambios en la microbiota intestinal en la ICD de pacientes adultos y pacientes infantiles reportando este mismo comportamiento del aumento de

Enterobacteriaceae y *Escherichia-Shigella* en su grupo con ICD con respecto a su grupo control (el porcentaje de abundancia no fue especificado por los autores) (Gu et al., 2016).

La familia *Enterobacteriaceae* es un grupo heterogéneo conformado de bacilos Gram negativos, aeróbicos o anaeróbicos facultativos, no formadores de esporas, móviles o inmóviles. El género *Escherichia-Shigella* coincide con todas estas características y se conocen 5 especies: *E. coli*, *E. hermannii*, *E. fergusonii*, *E. vulneris* y *E. blattae* (Brenner & Farmer, 2015). Gu et al., 2016, mediante estudios metagenómicos de *E. coli* reportaron su incremento en el grupo con ICD con respecto a su grupo controles, con lo que se puede intuir que el crecimiento del género *Escherichia-Shigella* ocurre a causa de la especie *E. coli* (Gu et al., 2016). Es muy reconocido que *E. coli* es un miembro de la microbiota intestinal de los seres humanos, es una de las primeras especie que coloniza a los infantes y que se convierte en una especie colonizadora durante toda la vida (Palmer, 2017). La colonización intestinal depende de la competencia de nutrientes con el resto de las bacterias que forman parte de la microbiota intestinal, sumando su capacidad de evitar la respuesta inmune del hospedador y su crecimiento rápido superior a la tasa de recambio de la capa mucosa del epitelio intestinal. Aunado a esto, *E. coli* puede establecer una relación simbiótica con otros géneros de la microbiota intestinal como con *Bacteroides*, este último es capaz de degradar polisacáridos complejos que *E. coli* no puede metabolizar (Conway, 2015). Estas evidencias explican en gran parte el incremento observado del género *Escherichia-Shigella* en el grupo S con respecto al grupo C y A.

Dentro el filo Actinobacteria se tiene a la familia *Bifidobacteriaceae*, reportándose en mayor abundancia el género *Bifidobacterium* en el grupo A con 22.118, seguido del grupo S con 11.678 y al último con una baja abundancia el grupo C con 1.874. En el género *Bifidobacterium* se ha reportado con propiedades protectoras debido a su alta y compleja relación con las bacterias comensales de la microbiota intestinal, su capacidad de producción de ácidos orgánicos, péptidos antimicrobianos, inhibidores de quorum-sensing y la estimulación de la respuesta inmune ante patógenos; debido a estas propiedades varias especies de este género han sido reportadas como compuestos probióticos para la prevención y tratamiento de enfermedades (Hidalgo-Cantabrana et al., 2018).

Sin embargo, la investigación de la relación entre las cepas de la familia *Bifidobacterium* con *C. difficile* es poca y no se tienen suficientes trabajos para tener un panorama claro de su relación. Yun et al., 2017., evaluaron los efectos de la cepa ATCC 15707 de *Bifidobacterium longum* sobre la ICD específicamente causada por la cepa 027 de *C. difficile* en un modelo murino, reportando tasas de supervivencia de los modelos que recibieron a *C. difficile* sólo, con células vivas y células muertas de *B. longum* de 40%, 70% y 60% respectivamente (Yun et al., 2017). Valdés-Varela et al., 2016 en su estudio determinaron el potencial de 3 cepas seleccionadas de *Bifidobacterium* para la inhibición de cultivos de *C. difficile* en las etapas de su crecimiento y secreción de toxinas. Sus resultados arrojaron a las cepas *B. longum* IPLA20022 y *B. breve* IPLA20006 con potencial para reducir significativamente el crecimiento y mostraron una mayor reducción en la toxicidad de *C. difficile*. La excepción fue la cepa *B. animalis* Bb12 ya que *C. difficile* demostró un crecimiento potenciado (Valdés-Varela et al., 2016). Wei et al., 2018, realizaron un estudio *in vitro* e *in vivo* donde examinaron los efectos de la cepa *B. longum* JDM301 en *C. difficile* ATCC 4355 y ATCC9589, una cepa probiótica comercial usada en China. En sus resultados reportaron que *B. longum* a mayores dosis inhibe el crecimiento y a la producción de toxinas de *C. difficile* *in vitro* conviviendo en el mismo ambiente, también comprobaron la inhibición del crecimiento de *C. difficile* mediante la simbiosis de las cepas de *Bifidobacterias* y cepas de *Lactobacillus* que fueron agregadas en otro experimento. Por último, reportaron que *B. longum* se puede usar para prevenir o tratar la ICD en un modelo murino al atenuar ICD *in vivo* y regular el proceso inflamatorio del colon durante la ICD al reducir la producción de interleucinas proinflamatorias como IL-6 y el TNF- α y aumentar la producción de la interleucina inmunosupresora IL-10 para un menor daño tisular intestinal (Wei et al., 2018). Otro mecanismo descrito que tienen que ver con la protección hacia *C. difficile* es la propiedad de adhesividad de las cepas de *Bifidobacterium* presentes en la microbiota intestinal, a través de estudios *in vivo* se reportó que estas bacterias se unen a la capa mucosa del colon y por ende a sus células epiteliales por lo que al ante una población mayor de *Bifidobacterium* se desarrolla una actividad antagonica frente a la adhesión de patógenos gastrointestinales a las células epiteliales (Servin, 2004).

En nuestros resultados observamos el doble de abundancia el género *Bifidobacterium* perteneciente a la familia *Bifidobacteriaceae* en el grupo A frente al grupo S lo cual indica

una diferencia que pudiera explicar por qué algunos de los portadores asintomáticos no padecen la enfermedad aún al portar *C. difficile* toxigénicos.

Resultados importantes consideramos resaltar son las muestras S2 y A5. S2 es muestra de un bebé menor de un año reportando *C. difficile* toxigénico (TcdA + y TcdB +), y la muestra A5 de también un bebé también, de un año reportando *C. difficile* toxigénico (TcdB +). Observamos una alta abundancia para ambas muestras en el filo Actinobacteria, para S2 67.533 y para A5 52.882, y en el género *Bifidobacterium* para S2 con 66.926 y para A5 con 52.882. Se ha reportado a la microbiota intestinal del bebé lactante como una estructura simple dominada principalmente por Bifidobacterias y que por una serie de factores a lo largo de su crecimiento su microbiota obtiene un patrón más complejo (Claesson et al., 2010). Palmer et al., 2007, observaron en su estudio la colonización temprana abundante por las especies de Bifidobacterias en bebés al tercer y cuarto día de nacidos con una dieta láctea exclusiva (Palmer et al., 2007). Como se mencionaba en la introducción la epidemiología de *C. difficile* ha sufrido cambios los cuales han llevado a buscar nuevos reservorios y vectores de este patógeno en la comunidad, uno de ellos son los bebés lactantes ya que se ha identificado la colonización por *C. difficile* con una prevalencia del 2 al 75% sobre todo en los primeros 2 años y de manera asintomática (Rousseau et al., 2012). Rousseau et al., 2012, en su estudio investigaron la colonización intestinal por *C. difficile* en bebés sanos de la comunidad y demostraron que la adquisición de este patógeno tiene lugar en períodos específicos durante el primer año de vida, ya sea en el período neonatal (adquisición temprana) o en el período entre el cuarto y el sexto mes de vida (adquisición tardía). La adquisición temprana se describió en recién nacidos en salas de maternidad de los hospitales en donde nacieron o en los lactantes que asisten a guarderías mientras que la adquisición tardía puede estar relacionada con las modificaciones en la composición de la microbiota intestinal durante el período de destete y el inicio de la alimentación complementaria, en especial, con una colonización menos frecuente por organismos *Bifidobacterium*. De igual forma, identificaron importantes tasas de portación del 45% para todos los *C. difficile* en lactantes que asistían a guarderías reportando un 13% para las cepas toxigénicas (Rousseau et al., 2012).

Con esto podemos concluir que los bebés son unos importantes reservorios de *C. difficile* toxigénico, sin embargo, debido a su microbiota conformada principalmente por Bifidobacterias y por los mecanismos de defensa mencionado de este género les otorga la capacidad para estar en un estado de portador asintomático. Nuestros resultados concuerdan con la composición de la microbiota de esos pacientes al estar reportando un *C. difficile* toxigénico en las muestras A5 y en especial para S2 debido a la carga de este género de bacterias podemos intuir que la consistencia líquida que presentó esta muestra siendo un indicativo de diarrea pudiese tratarse de otra bacteria patógena diferente a *C. difficile* al ser esa muestra tomada de una unidad de cuidados intensivo del Hospital MAC o incluso estar relacionado con una intolerancia a y/o adaptación por parte del bebé a la dieta que se esté llevando en ese momento.

Siguiendo con el filo *Verrucomicrobiota* se observó una diferencia en el género *Akkermansia* entre los grupos S con 0.148 frente a 0.023 del grupo A. Como ya se habían mencionado antes y para recapitular, la característica más importante de este género es su capacidad de fermentar la mucina de la capa mucosa intestinal por lo que ante una alta presencia de esta bacteria se altera la composición de la mucosidad proporcionando una ventaja selectiva para *C. difficile* para adherirse a las células epiteliales del colon facilitando la transición de un estado de colonizador asintomático al desarrollo de ICD con datos clínicos (Sangster et al., 2016). La mucina de la mucosa intestinal se encuentra aglomerada en complejos de glicoproteínas estructurales con glucanos ligados a O específicos (O-glicanos) producidos por las células caliciformes del epitelio intestinal que a su vez se ensamblan en una estructura que forma una capa interna densa adherida a las células que no va a permitir la penetración de las bacterias (Sicard et al., 2017). Por lo que la competencia por este nicho ecológico es muy importante en las bacterias comensales y patógenas de la microbiota intestinal, a la par de este punto ante un incremento en específico de *A. muciniphila* en los pacientes con ICD reflejan una mayor degradación de la capa mucosa intestinal lo que es un paso importante en el desarrollo de esta enfermedad concordando con los datos de nuestros resultados.

11. CONCLUSIÓN

- Los grupos de pacientes sintomáticos a ICD (S) y los pacientes portadores asintomáticos a *C. difficile* (A) presenta una microbiota intestinal con una diversidad y riqueza diferente a la del grupo controles sanos (C) aunque existen algunas similitudes entre ellos.
 - Hay una disminución del filo Firmicutes del grupo C con respecto al grupo A y hasta en el grupo S. Esto es importante ya que la tendencia de disminución de Firmicutes tiene que ver con una pérdida de mecanismos de resistencia a la colonización (efecto barrera) y por ende esto conlleva al desarrollo de una ICD.
- La presencia de ciertos grupos taxonómicos como la familia Bifidobacterium del género Actinobacteria, están relacionados con la inhibición de la transición de un estado de colonización asintomática de *C. difficile* a ICD
 - Se observa una diferencia en el filo Actinobacteria del grupo A con respecto al grupo S, teniendo en cuenta que el género *Bifidobacterium* perteneciente al filo Actinobacteria es considerándolo el mejor predictor de estado de portador asintomático de *C. difficile*.
 - El incremento del filo Proteobacteria en el grupo C y el grupo A contra el grupo S, se ha definido como un marcador de una disbiosis intestinal considerando la ausencia de Proteobacterias como indicador de una microbiota intestinal sana.
 -
- Se describieron las interacciones de las comunidades bacterianas presentes en la microbiota intestinal y algunos de sus metabolitos que tiene un efecto importante en la mucosa del epitelio intestinal para el mantenimiento de una microbiota intestinal equilibrada
 - Los Firmicutes junto con Bacteroidetes son los filos más abundantes en una microbiota intestinal sana con un papel importante en la fermentación anaerobia en el colon, esta vía metabólica permite a las bacterias la obtención de energía mediante

- Los AGCC participan en la regulación de secreción de citocinas proinflamatorias en las células inmunes del colon como los linfocitos T reguladores, los cuales se encuentran en la lámina propia de la mucosa intestinal
- El aumento de disponibilidad del oxígeno en el ambiente y de forma secundaria una pérdida de butirato o incluso la creación de un ambiente proinflamatorio intestinal, a consecuencia del cambio en la fisiología del epitelio intestinal por una exposición a antibiótico o la infección de patógenos entéricos, provocando la interrupción de la anaerobiosis y permitiendo una ventaja selectiva para las bacterias anaerobias facultativas como las que pertenecen al filo Proteobacteria
- Se definieron mecanismos de ciertos grupos taxonómicos como el género *Roseburia*, *Akkermansia muciniphila* o la familia Erysipelotrichaceae entre otros mencionados, que ayudan a una mejor colonización de *C. difficile* y por ende al desarrollo de la ICD.
 - la familia *Erysipelotrichaceae* podría tener impacto en el transcurso de una colonización por *C. difficile* asintomática al desarrollo de ICD explicando el aumento en la abundancia en el grupo A. Con respecto a nuestro grupo C, es probable que el aumento observado en los niveles de *Erysipelotrichaceae* en pacientes estén asociadas con los fenotipos de lípidos o colesterol del paciente y/o la dieta del paciente, pero esto no los descarta de tener un impacto significativo en la presentación y/o actividad de la ICD.
 - La disminución de los géneros *Ruminococcus* y *Bacteroides* en el grupo A frente al grupo C está relacionada con el metabolismo de los ácidos biliares primarios por lo que ante una pérdida de estos géneros significa una pérdida de resistencia ante la colonización por *C. difficile*

12. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A., & Zackular, J. P. (2020). Microbe–microbe interactions during *Clostridioides difficile* infection. 53, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2020.01.016>
- Abt, M. C., McKenney, P. T., & Pamer, E. G. (2016). *Clostridium difficile* colitis: pathogenesis and host defence. *Nature Reviews Microbiology*, 14(10), 609–620. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.108>
- Adrián Camacho-Ortíz, Eva María Gutiérrez-Delgado, García-Mazcorro, J. F., Mendoza-Olazarán, S., Adrián Martínez-Meléndez, Paláu-Dávila, L., Baines, S. D., Héctor Jesús Maldonado-Garza, & Garza-González, E. (2017). Randomized clinical trial to evaluate the effect of fecal microbiota transplant for initial *Clostridium difficile* infection in intestinal microbiome. PLOS ONE, 12(12), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189768>
- Alcalá Hernández L, Marín Arriaza M, Mena Ribas A, Niubó Bosh J. (2015). Diagnóstico microbiológico de la infección por *Clostridium difficile*. 53. Alcalá Hernández L (coordinador). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).
- Alcalá-Hernández, L., Mena-Ribas, A., Jordi Niubó-Bosh, & Marín-Arriaza, M. (2016). Diagnóstico microbiológico de la infección por *Clostridium difficile*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2015.09.004>
- Álvarez, J., José Antonio Real, Guarner, F., Gueimonde, M., Rodríguez, J. M., Saenz, M., & Sanz, Y. (2021). Microbiota intestinal y salud. 44(7), 519–535. <https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2021.01.009>
- Ananthakrishnan, A. N. (2010). *Clostridium difficile* infection: epidemiology, risk factors and management. 8(1), 17–26. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2010.190>
- Antharam, V. C., Li, E. C., Ishmael, A., Sharma, A., Mai, V., Rand, K. H., & Wang, G. P. (2013). Intestinal dysbiosis and depletion of butyrogenic bacteria in *Clostridium difficile* infection and nosocomial diarrhea. *Journal of clinical microbiology*, 51(9), 2884-2892. <https://doi.org/10.1128/jcm.00845-13>
- Archie, Soares, R. J., Tatem, A. J., Paterson, D. L., & Riley, T. V. (2010). *Clostridium difficile* PCR ribotype 027: assessing the risks of further worldwide spread. 10(6), 395–404. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(10\)70080-3](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(10)70080-3)
- Awad, M. M., Johanesen, P. A., Carter, G. P., Edward, & Lyras, D. (2014). *Clostridium difficile* virulence factors: Insights into an anaerobic spore-forming pathogen. 5(5), 579–593. <https://doi.org/10.4161/19490976.2014.969632>
- Bartlett, J. G., & Gerding, D. N. (2008). Clinical Recognition and Diagnosis of *Clostridium difficile* Infection. 46(s1), S12–S18. <https://doi.org/10.1086/521863>
- Benoit Guery, Galperine, T., & Frédéric Barbut. (2019). *Clostridioides difficile*: diagnosis and treatments. 14609–14609. <https://doi.org/10.1136/bmj.l4609>
- Brenner, D. J., & Farmer, J. J. (2015). Enterobacteriaceae. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1–24. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.fbm00222>

- Britton, R. A., & Young, V. B. (2012). Interaction between the intestinal microbiota and host in *Clostridium difficile* colonization resistance. 20(7), 313–319. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.04.001>
- Brown, J. R., Flemer, B., Joyce, S. A., Akbar Zulquernain, Sheehan, D., Shanahan, F., & O’Toole, P. W. (2018). Changes in microbiota composition, bile and fatty acid metabolism, in successful faecal microbiota transplantation for *Clostridioides difficile* infection. *BMC Gastroenterology*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12876-018-0860-5>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. J., Johnson, A. J., & Holmes, S. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. 13(7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Calvo, J., & Martínez-Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. 27(1), 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.11.001>
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., & Bushman, F. D. (2010). Costello 645 EK, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat*, 466, 335–6.
- Carroll, K. C., & Mizusawa, M. (2020). Laboratory Tests for the Diagnosis of *Clostridium difficile*. 33(02), 073–081. <https://doi.org/10.1055/s-0039-3400476>
- Chen, S., Gu, H., Sun, C., Wang, H., & Wang, J. (2017). Rapid detection of *Clostridium difficile* toxins and laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infections. *Infection*, 45(3), 255–262. <https://doi.org/10.1007/s15010-016-0940-9>
- Claesson, M. J., Cusack, S., Orla O’Sullivan, Greene-Diniz, R., Heleen de Weerd, Flannery, E., Marchesi, J. R., Falush, D., Dinan, T. G., Fitzgerald, G. F., Stanton, C., Douwe van Sinderen, O’Connor, M., Harnedy, N., Kieran O’Connor, Henry, C., O’Mahony, D., Fitzgerald, A. P., Shanahan, F., & Twomey, C. (2010). Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 4586–4591. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000097107>
- Claesson, M. J., Jeffery, I. B., Conde, S., Power, S., O’Connor, E. M., Cusack, S., Hugh, Coakley, M., Bhuvaneshwari Lakshminarayanan, Orla O’Sullivan, Fitzgerald, G. F., Deane, J., O’Connor, M., Harnedy, N., Kieran O’Connor, O’Mahony, D., Douwe van Sinderen, Wallace, M., Brennan, L., & Stanton, C. (2012). Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature*, 488(7410), 178–184. <https://doi.org/10.1038/nature11319>
- Cohen, S. H., Gerding, D. N., Johnson, S., Kelly, C. P., Loo, V. G., L. Clifford McDonald, Pépin, J., & Wilcox, M. H. (2010). Clinical Practice Guidelines for *Clostridium difficile* Infection in Adults: 2010 Update by the Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA) and the Infectious Diseases Society of America (IDSA). 31(05), 431–455. <https://doi.org/10.1086/651706>
- Cornely, O. A., Dilip Nathwani, Ivanescu, C., O. Odufowora-Sita, Peny Retsa, & Odeyemi, I. (2014). Clinical efficacy of fidaxomicin compared with vancomycin and metronidazole in *Clostridium difficile* infections: a meta-analysis and indirect treatment comparison. 69(11), 2892–2900. <https://doi.org/10.1093/jac/dku261>

- Coyne, M. J., Tzianabos, A. O., Mallory, B. C., Carey, V. J., Kasper, D. L., & Comstock, L. E. (2001). Polysaccharide biosynthesis locus required for virulence of *Bacteroides fragilis*. *Infection and immunity*, 69(7), 4342-4350. <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/iai.69.7.4342-4350.2001>
- Curry, S. R. (2017). *Clostridium difficile*. 37(2), 341–369. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2017.01.007>
- Czepiel, J., Drozd, M., Pituch, H., Kuijper, E. J., Perucki, W., Aleksandra Mielimonka, Goldman, S., Dorota Wultańska, Aleksander Garlicki, & Biesiada, G. (2019). *Clostridium difficile* infection: review. 38(7), 1211–1221. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03539-6>
- Czepiel, J., Jolanta Kedzierska, Biesiada, G., Malwina Birczyńska, Perucki, W., Nowak, P., & Aleksander Garlicki. (2015). Epidemiology of *Clostridium difficile* infection: results of a hospital-based study in Krakow, Poland. 143(15), 3235–3243. <https://doi.org/10.1017/s0950268815000552>
- Dapa, T., Dapa, T., Leuzzi, R., Ng, Y. K., Baban, S. T., Adamo, R., Kuehne, S. A., Scarselli, M., Minton, N. P., Serruto, D., & Unnikrishnan, M. (2013). Multiple factors modulate biofilm formation by the anaerobic pathogen *Clostridium difficile*. *J Bacteriol*, 195(3), 545-555. <https://doi.org/10.1128/JB.01980-12>
- Debast, S. B., Bauer, M., & Kuijper, E. J. (2014). European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: Update of the Treatment Guidance Document for *Clostridium difficile* Infection. 20, 1–26. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12418>
- DePestel, D. D. (2013). Epidemiology of *Clostridium difficile* Infection - Daryl D. DePestel, David M. Aronoff, 2013. *Journal of Pharmacy Practice*. <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/0897190013499521>
- Dhalluin, A., Ludovic Lemée, Pestel-Caron, M., Mory, F., G Leluan, J.F. Lemeland, & Pons, J.-L. (2003). Genotypic Differentiation of Twelve *Clostridium* Species by Polymorphism Analysis of the Triosephosphate Isomerase (tpi) Gene. *Systematic and Applied Microbiology*, 26(1), 90–96. <https://doi.org/10.1078/072320203322337362>
- Diggs, N. G., & Surawicz, C. M. (2009). Evolving concepts in *Clostridium difficile* colitis. <https://doi.org/10.1007/s11894-009-0060-0>
- DM Lyerly, KE Saum, DK MacDonald, TD Wilkins. (1985). Effects of *Clostridium difficile* toxins given intragastrically to animals. *Infection and immunity* 47:2, 349-352. <https://doi.org/10.1128/iai.47.2.349-352.1985>
- Donskey, C. J., Kundrapu, S., & Deshpande, A. (2015). Colonization versus carriage of *Clostridium difficile*. *Infect Dis Clin North Am*, 29(1), 13-28. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2014.11.001>
- Drudy, D., Fanning, S., & Kyne, L. (2007). Toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile*. 11(1), 5–10. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2006.04.003>
- Evans CT, Johnson S (2015) Prevention of *Clostridium difficile* infection with probiotics. *Clin Infect Dis* 60:122–128. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-157-12-201212180-00563>
- Feuerstadt, P., Louie, T., Lashner, B. A., Elaine, Diao, L., Bryant, J. A., Sims, M., Kraft, C. S., Cohen, S. H., Berenson, C. S., Korman, L. Y., Ford, C. B., Litcofsky, K., Lombardo, M.-J., Wortman, J., Wu, H., Aunins, J. G., McChalicher, C., Winkler, J., & McGovern, B. (2022). SER-109,

- an Oral Microbiome Therapy for Recurrent *Clostridioides difficile* Infection. *The New England Journal of Medicine*, 386(3), 220–229. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2106516>
- Flores Reyes Roberto & Deurey Alzerreca Oscar. (2017). Diagnóstico Microbiológico de *Clostridium difficile*. Departamento de laboratorio Biomédico nacional y de referencia. Instituto de Salud Pública, Gobierno de Chile. Consultado de https://www.ispch.cl/sites/default/files/Diagnostico_Microbiologico_de_C_difficile.pdf
- Freeman, J., Bauer, M. P., Baines, S. D., Corver, J., Fawley, W. N., Goorhuis, B. & Wilcox, M. H. (2010). The changing epidemiology of *Clostridium difficile* infections. *Clinical microbiology reviews*, 23(3), 529-549. <https://doi.org/10.1128/cmr.00082-09>
- Gateau, C., Couturier, J., Coia, J., & Frédéric Barbut. (2018). How to: diagnose infection caused by *Clostridium difficile*. *Clinical Microbiology and Infection*, 24(5), 463–468. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.12.005>
- Gerding, D. N., Meyer, T. J., Lee, C. U., Cohen, S. H., Murthy, U. K., Poirier, A., Van, T. C., Pardi, D. S., Ramos, A. J., Barron, M. A., Chen, H., & Villano, S. (2015). Administration of Spores of Nontoxigenic *Clostridium difficile* Strain M3 for Prevention of Recurrent *C. difficile* Infection. 313(17), 1719–1719. <https://doi.org/10.1001/jama.2015.3725>
- Goodwin, S., John Douglas McPherson, & W. Richard McCombie. (2016). Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. 17(6), 333–351. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.49>
- Gu, S., Chen, Y., Zhang, X., Lu, H., Tao Lv, Shen, P., Longxian Lv, Zheng, B., Jiang, X., & Li, L. (2016). Identification of key taxa that favor intestinal colonization of *Clostridium difficile* in an adult Chinese population. *Microbes and Infection*, 18(1), 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2015.09.008>
- Han, S. H., Yi, J., Kim, J. H., Lee, S., & Moon, H. W. (2019). Composition of gut microbiota in patients with toxigenic *Clostridioides (Clostridium) difficile*: Comparison between subgroups according to clinical criteria and toxin gene load. *PloS one*, 14(2), e0212626. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212626>
- Hensgens, M. P. M., Goorhuis, A., Dekkers, O. M., & Kuijper, E. J. (2011). Time interval of increased risk for *Clostridium difficile* infection after exposure to antibiotics. 67(3), 742–748. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr508>
- Hidalgo-Cantabrana, C., Delgado, S., Ruiz, L., Ruas-Madiedo, P., Borja Sánchez, & Abelardo Margolles. (2018). Bifidobacteria and Their Health-Promoting Effects. ASM Press eBooks, 73–98. <https://doi.org/10.1128/9781555819705.ch3>
- Jank, T., & Klaus Aktories. (2008). Structure and mode of action of clostridial glucosylating toxins: the ABCD model. 16(5), 222–229. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.01.011>
- Janoir C, Pechine S, Grosdidier C, Collignon A. Cwp84, a surface-associated protein of *Clostridium difficile*, is a cysteine protease with degrading activity on extracellular matrix proteins. *J Bacteriol*. 2007; 189: 7174-80. <https://doi.org/10.1128/jb.00578-07>
- Janoir, C. (2016). Virulence factors of *Clostridium difficile* and their role during infection. 37, 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.10.009>

- Johnson, S., Pierre-Jean Maziade, McFarland, L. V., Trick, W. E., Donskey, C. J., Currie, B. S., Low, D. E., & Ellie. (2012). Is primary prevention of *Clostridium difficile* infection possible with specific probiotics? 16(11), e786–e792. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2012.06.005>
- Jure Škraban, Sašo Džeroski, Ženko, B., Domen Mongus, Gangl, S., & Rupnik, M. (2013). Gut Microbiota Patterns Associated with Colonization of Different *Clostridium difficile* Ribotypes. PLOS ONE, 8(2), e58005–e58005. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058005>
- Kaakoush, N. O. (2015). Insights into the Role of Erysipelotrichaceae in the Human Host. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00084>
- Koen Wortelboer, Koopen, A. M., Herrema, H., Willem, Nieuwdorp, M., & E. Marleen Kemper. (2022). From fecal microbiota transplantation toward next-generation beneficial microbes: The case of *Anaerobutyricum soehngeni*. *Frontiers in Medicine*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.1077275>
- Kyne, L., Warny, M., Qamar, A. A., & Kelly, C. P. (2000). Asymptomatic Carriage of *Clostridium difficile* and Serum Levels of IgG Antibody against Toxin A. 342(6), 390–397. <https://doi.org/10.1056/nejm200002103420604>
- L. Clifford McDonald, Gerding, D. N., Johnson, S., Bakken, J. S., Carroll, K. C., Coffin, S. E., Dubberke, E. R., Garey, K. W., Gould, C. V., Kelly, C. P., Loo, V. G., Sammons, J. S., Sandora, T. J., & Wilcox, M. H. (2018). Clinical Practice Guidelines for *Clostridium difficile* Infection in Adults and Children: 2017 Update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA). 66(7), e1–e48. <https://doi.org/10.1093/cid/cix1085>
- Lee, H., Plechot, K. T., Gohil, S. K., & Le, J. (2021). *Clostridium difficile*: Diagnosis and the Consequence of Over Diagnosis. 10(2), 687–697. <https://doi.org/10.1007/s40121-021-00417-7>
- Lee, Y.-J., Es, A., Jenq, R. R., Littmann, E. R., Kim, G. N., Miller, L., Ling, L., C. Alberto Figueroa, Robilotti, E., Perales, M.-A., Barker, J., Giralt, S., van, Pamer, E. G., & Taur, Y. (2017). Protective Factors in the Intestinal Microbiome Against *Clostridium difficile* Infection in Recipients of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. 215(7), 1117–1123. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix011>
- Lee, J. W., Cowley, E. S., Wolf, P. G., Doden, H. L., Murai, T., Caicedo, K. Y. O., ... & Ridlon, J. M. (2022). Formation of secondary allo-bile acids by novel enzymes from gut Firmicutes. *Gut Microbes*, 14(1), 2132903. <https://doi.org/10.1080/19490976.2022.2132903>
- Lemee, L., Dhalluin, A., Testelin, S., Mattrat, M. A., Maillard, K., Lemeland, J. F., & Pons, J. L. (2004). Multiplex PCR targeting *tpi* (triose phosphate isomerase), *tcdA* (Toxin A), and *tcdB* (Toxin B) genes for toxigenic culture of *Clostridium difficile*. *Journal of clinical microbiology*, 42(12), 5710-5714. <https://doi.org/10.1128/jcm.42.12.5710-5714.2004>
- Lessa, F. C., Gould, C. V., & L. Clifford McDonald. (2012). Current Status of *Clostridium difficile* Infection Epidemiology. 55(suppl 2), S65–S70. <https://doi.org/10.1093/cid/cis319>
- Lessa, F. C., Mu, Y., Bamberg, W., Beldavs, Z. G., Ghinwa Dumyati, Dunn, J. M., Farley, M. M., Holzbauer, S., Meek, J., Phipps, E. C., Wilson, L. E., Winston, L. G., Cohen, J., Limbago, B., Fridkin, S. K., Gerding, D. N., & L. Clifford McDonald. (2015). Burden of *Clostridium*

- difficile Infection in the United States. 372(9), 825–834.
<https://doi.org/10.1056/nejmoa1408913>
- Ludwig, W., Schleifer, K.-H., & Whitman, W. B. (2009). Revised road map to the phylum Firmicutes. 1–13. https://doi.org/10.1007/978-0-387-68489-5_1
- Manges, A. R., Labbe, A., Loo, V. G., Atherton, J., Behr, M. A., Masson, L., Tellis, P., & Brousseau, R. (2010). Comparative Metagenomic Study of Alterations to the Intestinal Microbiota and Risk of Nosocomial *Clostridium difficile*-Associated Disease. *The Journal of Infectious Diseases*, 202(12), 1877–1884. <https://doi.org/10.1086/657319>
- M.E. Icaza-Chávez. (2013). Microbiota intestinal en la salud y la enfermedad. 78(4), 240–248. <https://doi.org/10.1016/j.rgm.2013.04.004>
- M.R. Canales-Simón, Gil, & A.M. Vázquez Medrano. (2010). Colitis pseudomembranosa en atención primaria. 36(10), 593–596. <https://doi.org/10.1016/j.sem.2010.04.007>
- Maldarelli, G. A., Piepenbrink, K. H., Scott, A., Freiberg, J. A., Song, Y., Achermann, Y., Ernst, R. K., Shirliff, M. E., Sundberg, E. J., Sonnenberg, M. S., & Erik. (2016). Type IV pili promote early biofilm formation by *Clostridium difficile*. 74(6), ftw061–ftw061. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftw061>
- Malin, Phillipson, M., Petersson, J., Velcich, A., Holm, L., & Hansson, G. C. (2008). The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. 105(39), 15064–15069. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803124105>
- Martin, J. L., Monaghan, T., & Wilcox, M. H. (2016). *Clostridium difficile* infection: epidemiology, diagnosis and understanding transmission. 13(4), 206–216. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.25>
- Masui, R., Sasaki, M., Funaki, Y., Ogasawara, N., Mizuno, M., Iida, A., Izawa, S., Kondo, Y., Ito, Y., Tamura, Y., Kenichiro Yanamoto, Noda, H., Tanabe, A., Okaniwa, N., Yamaguchi, Y., Iwamoto, T., & Kunio Kasugai. (2013). G Protein-Coupled Receptor 43 Moderates Gut Inflammation Through Cytokine Regulation from Mononuclear Cells. 19(13), 2848–2856. <https://doi.org/10.1097/01.mib.0000435444.14860.ea>
- Mateu, L., Fernández-Rivas, G., & Sopena, N. (2020). Diagnóstico y tratamiento de la infección por *Clostridioides difficile*. 155(1), 30–35. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2020.02.005>
- Menéndez, M., Batista, N., Bálamo, A., & Seija, V. (2016). Predictores de riesgo para desarrollo de infección por *Clostridium difficile*. *Revista Médica Del Uruguay*, 32(3), 159–165. http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?pid=S1688-03902016000300005&script=sci_arttext
- Milani, C., Ticinesi, A., Gerritsen, J., Nouvenne, A., Gabriele Andrea Lugli, Mancabelli, L., Turrioni, F., Duranti, S., Mangifesta, M., Viappiani, A., Ferrario, C., Maggio, M., Fulvio Lauretani, Willem, Douwe van Sinderen, Meschi, T., & Ventura, M. (2016). Gut microbiota composition and *Clostridium difficile* infection in hospitalized elderly individuals: a metagenomic study. *Scientific Reports*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/srep25945>
- Milena M Awad, Priscilla A Johanesen, Glen P Carter, Edward Rose y Dena Lyras (2014) Factores de virulencia de *Clostridium difficile* : Información sobre un patógeno anaeróbico formador de esporas, *Gut Microbes*, 5:5, 579-593, DOI: 10.4161/19490976.2014 .969632

- Mullane, K. M., Miller, M. W., Karl Heinz Weiss, Lentnek, A., Golan, Y., Sears, P., Shue, Y.-K., Louie, T. J., & Gorbach, S. L. (2011). Efficacy of Fidaxomicin Versus Vancomycin as Therapy for *Clostridium difficile* Infection in Individuals Taking Concomitant Antibiotics for Other Concurrent Infections. 53(5), 440–447. <https://doi.org/10.1093/cid/cir404>
- Natarajan, M., Walk, S. T., Young, V. B., & Aronoff, D. M. (2013). A clinical and epidemiological review of non-toxicogenic *Clostridium difficile*. 22, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.05.005>
- Nohemí Gabriela Cortés-López, Perla Lucía Ordóñez-Baquera, & Domínguez-Viveros, J. (2020). Herramientas moleculares utilizadas para el análisis metagenómico. Revisión. 11(4), 1150–1173. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v11i4.5202>
- Nuria González-García, Gómez-Pavón, J., & José Luis Martínez-Porras. (2005). Diagnóstico, tratamiento y control de la infección causada por *Clostridium difficile*. 40(5), 310–319. [https://doi.org/10.1016/s0211-139x\(05\)74875-7](https://doi.org/10.1016/s0211-139x(05)74875-7)
- Parker, B. J., Wearsch, P. A., Veloo, A., & Rodriguez-Palacios, A. (2020). The Genus *Alistipes*: Gut Bacteria With Emerging Implications to Inflammation, Cancer, and Mental Health. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00906>
- Pérez-Trallero, E., & Luis García Iglesias. (2010). Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. 28(2), 122–130. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2009.10.002>
- Poxton, I. R., McCoubrey, J., & Blair, G. A. (2001). The pathogenicity of *Clostridium difficile*. 7(8), 421–427. <https://doi.org/10.1046/j.1198-743x.2001.00287.x>
- Rea, M. C., Dobson, A., Orla O'Sullivan, Crispie, F., Fouhy, F., Cotter, P. D., Shanahan, F., Kiely, B., Hill, C., & R. Paul Ross. (2010). Effect of broad- and narrow-spectrum antimicrobials on *Clostridium difficile* and microbial diversity in a model of the distal colon. 108(supplement_1), 4639–4644. <https://doi.org/10.1073/pnas.1001224107>
- Rea, M. C., O'Sullivan, O., Shanahan, F., O'Toole, P. W., Stanton, C., Ross, R. P., & Hill, C. (2012). *Clostridium difficile* carriage in elderly subjects and associated changes in the intestinal microbiota. *Journal of clinical microbiology*, 50(3), 867-875. <https://doi.org/10.1128/jcm.05176-11>
- Reynolds, C. J., Emerson, J. E., Saldaña-de, L., Fagan, R. P., & Fairweather, N. F. (2011). The *Clostridium difficile* Cell Wall Protein CwpV is Antigenically Variable between Strains, but Exhibits Conserved Aggregation-Promoting Function. 7(4), e1002024–e1002024. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002024>
- Rineh, A., Kelso, M. J., Vatansever, F., Tegos, G. P., & Hamblin, M. R. (2014). *Clostridium difficile* infection: molecular pathogenesis and novel therapeutics. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 12(1), 131-150. <https://doi.org/10.1586/14787210.2014.866515>
- Rivera-Chávez, F., Lopez, C. A., & Bäumlér, A. J. (2017). Oxygen as a driver of gut dysbiosis. 105, 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.09.022>
- Roberto Berni Canani, Margherita Di Costanzo, Leone, L., Pedata, M., Meli, R., & Calignano, A. (2011). Potential beneficial effects of butyrate in intestinal and extraintestinal diseases. 17(12), 1519–1519. <https://doi.org/10.3748/wjg.v17.i12.1519>

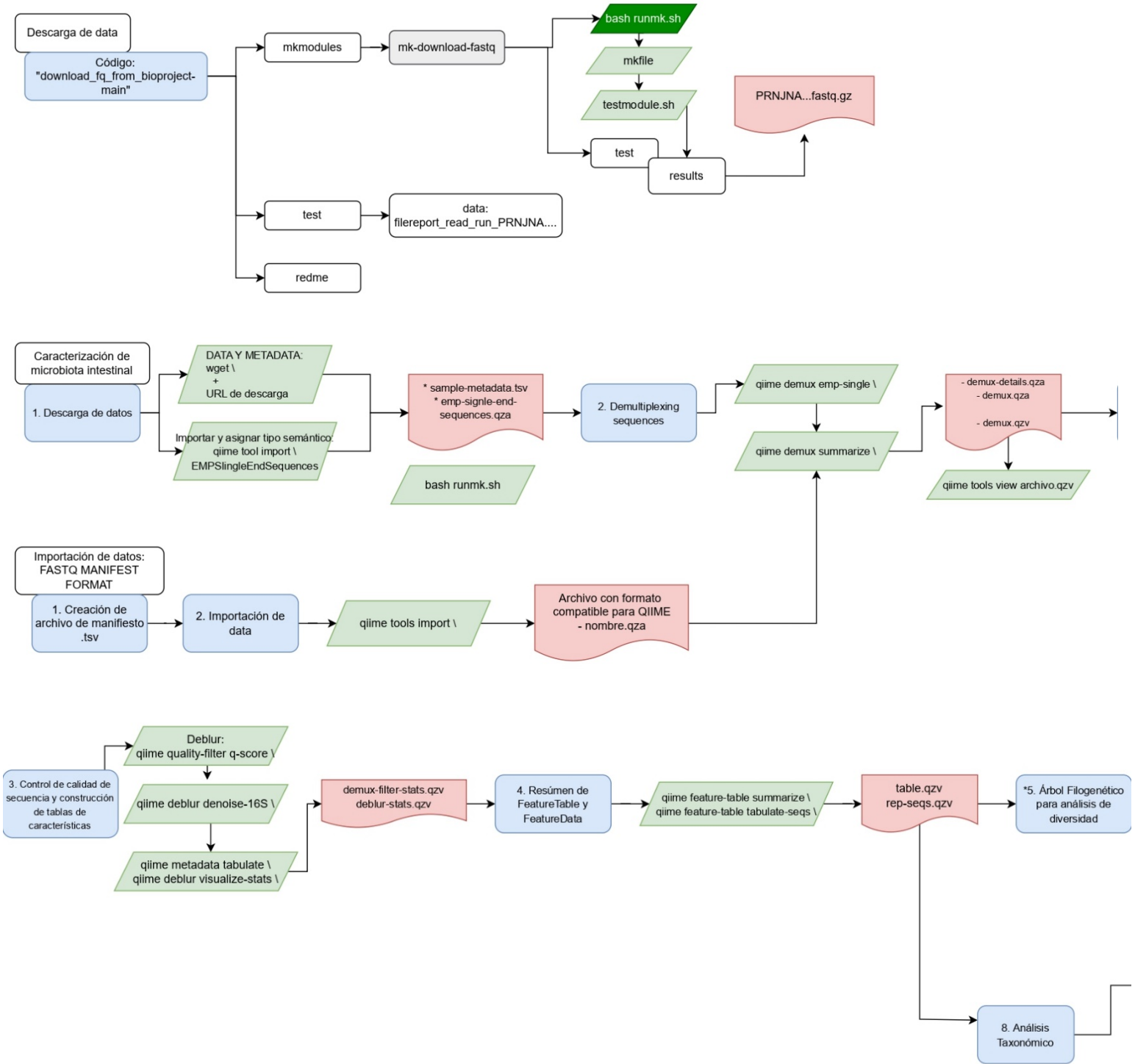
- Rodríguez-Pardo, D., Mirelis, B., & Navarro, F. (2013). Infecciones producidas por *Clostridium difficile*. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 31(4), 254–263. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2012.12.010>
- Rousseau, C., I. Poilane, Loïc de Pontual, Anne-Claire Maherault, Alban Le Monnier, & Collignon, A. (2012). *Clostridium difficile* Carriage in Healthy Infants in the Community: A Potential Reservoir for Pathogenic Strains. *Clinical Infectious Diseases*, 55(9), 1209–1215. <https://doi.org/10.1093/cid/cis637>
- Rupnik, M., Wilcox, M. H., & Gerding, D. N. (2009). *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. 7(7), 526–536. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2164>
- S. Lital Meyer, A. Ricardo Espinoza, & P. Rodrigo Quera. (2014). Infección por *clostridium difficile*: epidemiología, diagnóstico y estrategias terapéuticas. 25(3), 473–484. [https://doi.org/10.1016/s0716-8640\(14\)70064-1](https://doi.org/10.1016/s0716-8640(14)70064-1)
- S. Vaishnava, M. Yamamoto, K.M. Severson, K.A. Ruhn, X. Yu, O. Koren, et al. The Antibacterial Lectin RegIII Promotes the Spatial Segregation of Microbiota and Host in the Intestine *Science*, 334 (2011), pp. 255-258. DOI: 10.1126/science.1209791
- Sánchez-Hurtado, K., Corretge, M., Mutlu, E., Rowan McIlhagger, Starr, J. M., & Poxton, I. R. (2008). Systemic antibody response to *Clostridium difficile* in colonized patients with and without symptoms and matched controls. 57(6), 717–724. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47713-0>
- Sandhu, B. K., & McBride, S. M. (2018). *Clostridioides difficile*. 26(12), 1049–1050. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.09.004>
- Sangster, W., Hegarty, J. P., Schieffer, K. M., Wright, J., Hackman, J., Toole, D. R., Lamendella, R., & Stewart, D. B. (2016). Bacterial and Fungal Microbiota Changes Distinguish *C. difficile* Infection from Other Forms of Diarrhea: Results of a Prospective Inpatient Study. 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00789>
- Servin, A. L. (2004). Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *PubMed*, 28(4), 405–440. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.01.003>
- Shahinas, D., Silverman, M., Sittler, T., Chiu, C., Kim, P., Allen-Vercoe, E., & Pillai, D. R. (2012). Toward an understanding of changes in diversity associated with fecal microbiome transplantation based on 16S rRNA gene deep sequencing. *MBio*, 3(5), 10-1128. <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/mbio.00338-12>
- Shim, J. K., Johnson, S., Samore, M. H., Bliss, D. Z., & Gerding, D. N. (1998). Primary symptomless colonisation by *Clostridium difficile* and decreased risk of subsequent diarrhoea. 351(9103), 633–636. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(97\)08062-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(97)08062-8)
- Shin, B. M., Eun Joo Lee, Jang Bae Moon, & Seon Yeong Lee. (2016). Evaluation of the VIDAS glutamate dehydrogenase assay for the detection of *Clostridium difficile*. *Anaerobe*, 40, 68–72. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.06.001>
- Shin, N., Tae Woong Whon, & Bae, J.-W. (2015). Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. 33(9), 496–503. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.06.011>

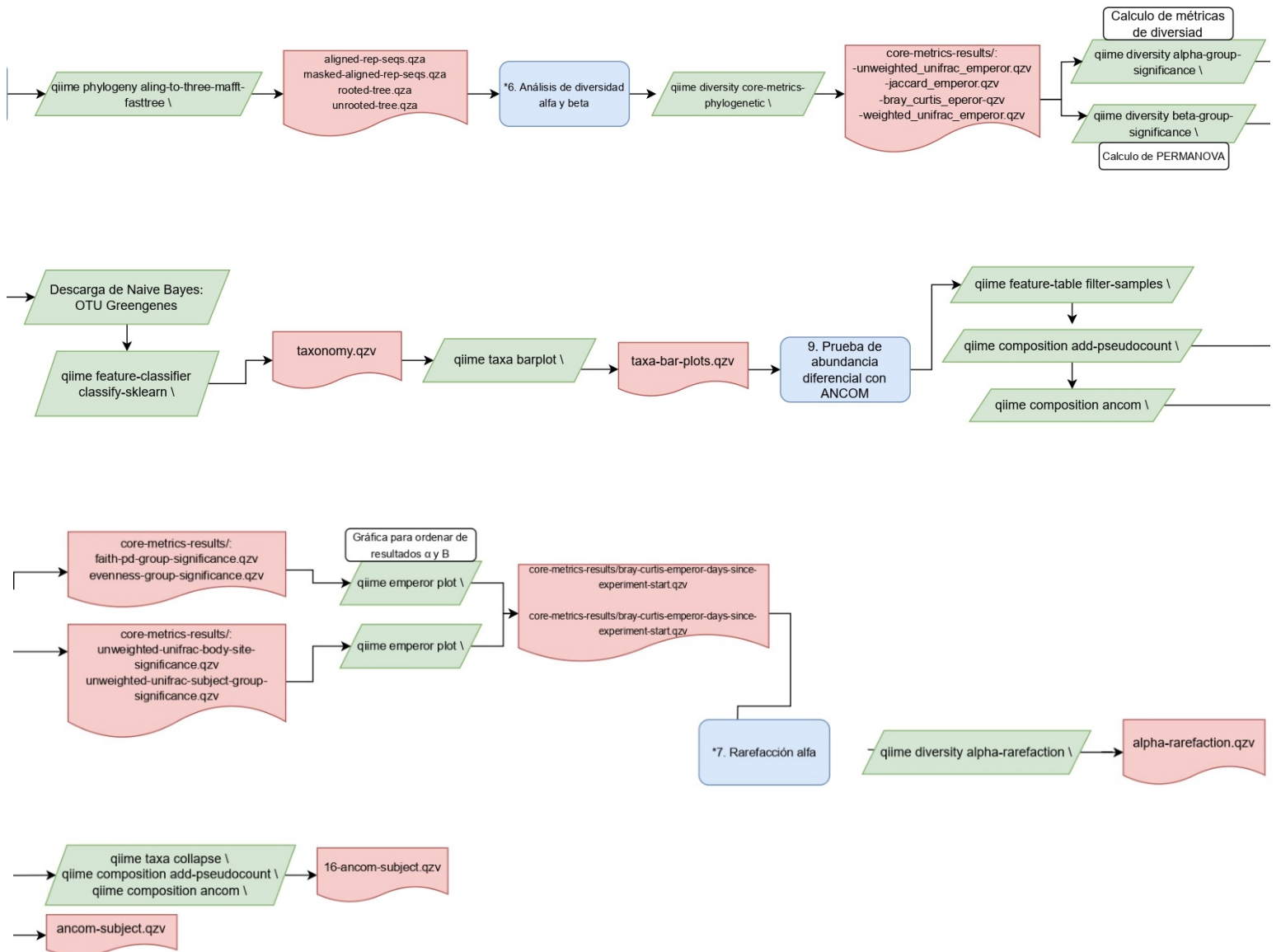
- Sicard, J.-F., Guillaume Le Bihan, Philippe Vogeleer, Jacques, M., & Harel, J. (2017). Interactions of Intestinal Bacteria with Components of the Intestinal Mucus. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00387>
- Smith, P. M., Howitt, M. R., Panikov, N., Michaud, M., Gallini, C. A., Bohlooly-y, M., ... & Garrett, W. S. (2013). The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science*, 341(6145), 569-573. DOI: 10.1126/science.1241165
- Soza Tharwat Baban, Kuehne, S. A., Barketi-Klai, A., Cartman, S. T., Kelly, M. L., Hardie, K. R., Imad Kansau, Collignon, A., & Minton, N. P. (2013). The Role of Flagella in *Clostridium difficile* Pathogenesis: Comparison between a Non-Epidemic and an Epidemic Strain. 8(9), e73026–e73026. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073026>
- Stevenson, E. C., Minton, N. P., & Kuehne, S. A. (2015). The role of flagella in *Clostridium difficile* pathogenicity. 23(5), 275–282. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.01.004>
- Surawicz, C. M., Brandt, L. J., Binion, D. G., Ananthakrishnan, A. N., Curry, S. R., Gilligan, P. H., McFarland, L. V., Mellow, M., & Zuckerbraun, B. S. (2013). Guidelines for Diagnosis, Treatment, and Prevention of *Clostridium difficile* Infections. 108(4), 478–498. <https://doi.org/10.1038/ajg.2013.4>
- Tasteyre, A., Karjalainen, T., Avesani, V., Delmée, M., Collignon, A., Bourlioux, P., & Barc, M. C. (2001). Molecular characterization of *fliD* gene encoding flagellar cap and its expression among *Clostridium difficile* isolates from different serogroups. *J Clin Microbiol*, 39(3), 1178-1183. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.3.1178-1183.2001>
- Valdés-Varela, L., Ana María Hernández-Barranco, Ruas-Madiedo, P., & Gueimonde, M. (2016). Effect of *Bifidobacterium* upon *Clostridium difficile* Growth and Toxicity When Co-cultured in Different Prebiotic Substrates. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00738>
- Vaustat, D., & Rollet, R. (2018). Glutamato deshidrogenasa. Su valor diagnóstico en la diarrea por *Clostridioides difficile*. *Revista Argentina de Microbiología*. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.08.006>
- Voth, D. E., & Ballard, J. D. (2005). *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. *Clin Microbiol Rev*, 18(2), 247-263. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.2.247-263.2005>
- Wei, Y., Yang, F., Wu, Q., Liu, W., Liu, C., Guo, X., Sharmila Suwal, Kou, Y., Zhang, B., Wang, Y., Zheng, K., & Tang, R. (2018). Protective Effects of *Bifidobacterial* Strains Against Toxigenic *Clostridium difficile*. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00888>
- Weingarden AR, Chen C, Bobr A, Yao D, Lu Y, Nelson V, Michael JS & Khoruts A. 2014. Microbiota transplantation restores normal fecal bile acid composition in recurrent *Clostridium difficile* infection. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 306(4): 310–19. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00282.2013>
- Weingarden AR, Chen C, Bobr A, Yao D, LuY, NelsonV et al. Microbiota transplantation restores normal fecal bile acid composition in recurrent *Clostridium difficile* infection. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2014; 306(4): 310–19. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00282.2013>

- Wiep Klaas Smits, Lyras, D., D. Borden Lacy, Wilcox, M. H., & Kuijper, E. J. (2016). Clostridium difficile infection. 2(1). <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.20>
- Winter, S., Lopez, C. A., & Bäumlér, A. J. (2013). The dynamics of gut-associated microbial communities during inflammation. 14(4), 319–327. <https://doi.org/10.1038/embor.2013.27>
- Wu, F., Guo, X., Zhang, J., Zhang, M., Ou, Z., & Peng, Y. (2017). Phascolarctobacterium faecium abundant colonization in human gastrointestinal tract. Experimental and Therapeutic Medicine, 14(4), 3122–3126. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.4878>
- Wu, G. D., Chen, J., Hoffmann, C., Bittinger, K., Chen, Y. Y., Keilbaugh, S. A., ... & Lewis, J. D. (2011). Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. Science, 334(6052), 105-108. DOI: 10.1126/science.1208344
- Youngster, I., Russell, G. H., Pindar, C., Ziv-Baran, T., Sauk, J., & Hohmann, E. L. (2014). Oral, capsulized, frozen fecal microbiota transplantation for relapsing Clostridium difficile infection. JAMA, 312(17), 1772-1778. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.13875>
- Yun, B., Song, M., Park, D.-J., & Oh, S. (2017). Beneficial Effect of Bifidobacterium longum ATCC 15707 on Survival Rate of Clostridium difficile Infection in Mice. Korean Journal for Food Science of Animal Resources, 37(3), 368–375. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2017.37.3.368>
- Zhang, L., Dong, D., Jiang, C., Li, Z., Wang, X., & Peng, Y. (2015). Insight into alteration of gut microbiota in Clostridium difficile infection and asymptomatic C. difficile colonization. 34, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.03.008>
- Zhang, X., Zhao, Y., Xu, J.-Q., Xue, Z., Zhang, M., Pang, X., Zhang, X., & Zhao, L. (2015). Modulation of gut microbiota by berberine and metformin during the treatment of high-fat diet-induced obesity in rats. Scientific Reports, 5(1). <https://doi.org/10.1038/srep14405>

13. ANEXOS

13.1. Diagrama de trabajo para QIIME2





13.2. Scrip para análisis metagenómico y asignación taxonómica a microbiota intestinal en QIIME2

Para realizar el análisis bioinformático con el software se siguió la guía del tutorial “Moving Pictures” guiándonos en el diagrama de trabajo del apartado anterior realizado después de la lectura de la guía del tutorial.

Todos los comandos para este análisis y dudas respecto a la instalación de QIIME2 y terminología se encuentran en “Moving Pictures” tutorial—QIIME2 2022.2.0 documentation. (2022). Qiime2.org. <https://docs.qiime2.org/2022.2/tutorials/moving-pictures/>

13.3. Scrip para generar gráficos de barra de abundancia relativa de “x” taxon en RStudio

```
##SCRIP PARA GENERAR GRÁFICO DE BARRAS DE ABUNDANCIA DE "X" TAXON
##APARTIR RESULTADO DE PIPILINE QIIME2: nivel-1.csv

#*Cargar librerias
#

#llamar al archivo
data <- read.delim(file="nivel-1.csv", head(TRUE))

#reorganizar tabla y renombrar filas
tabla <- as.matrix(data.frame(data[,2:11]))
rownames(tabla) <- data$OTU.ID

#exportar matriz de abundancia modificada
write.table(tabla, file ="integrated_matrix.txt")

#añadir los nombre de los taxones a un objeto
asignacion_taxonomica <- data.frame(completo=rownames(tabla))

#en consola hacer el valor x
# x <- asignacion_taxonomica$completo[1]

#asignar taxa a su nivel taxonomico correspondiente
asignacion_taxonomica$Bacteria <- sapply(as.character(asignacion_taxonomica$completo), function(x){strsplit(x, ";")[[1]][1]})
asignacion_taxonomica$Domain <- sapply(as.character(asignacion_taxonomica$completo), function(x){strsplit(x, ";")[[1]][2]})
asignacion_taxonomica$Phylum <- sapply(as.character(asignacion_taxonomica$completo), function(x){strsplit(x, ";")[[1]][3]})
asignacion_taxonomica$Class <- sapply(as.character(asignacion_taxonomica$completo), function(x){strsplit(x, ";")[[1]][4]})
asignacion_taxonomica$Order <- sapply(as.character(asignacion_taxonomica$completo), function(x){strsplit(x, ";")[[1]][5]})
asignacion_taxonomica$Family <- sapply(as.character(asignacion_taxonomica$completo), function(x){strsplit(x, ";")[[1]][6]})
asignacion_taxonomica$Genus <- sapply(as.character(asignacion_taxonomica$completo), function(x){strsplit(x, ";")[[1]][7]})

##HACER TABLA CON LA ABUNDANCIA DE UN NIVEL TAXONÓMICO ESPECÍFICO
#comprimir matriz a los distintos niveles taxonomicos EJEMPLO:phylum
asig_unicas <- unique(asignacion_taxonomica$Phylum)
#antes de correr linea verificar dim(tabla)[#] que seran el numero de columnas(muestras)
taxa_level <- matrix(data = 0, nrow = length(asig_unicas) , ncol = dim(tabla)[2])

colnames(taxa_level) <- colnames(tabla)
rownames(taxa_level) <- unique(asignacion_taxonomica$Phylum)
#dimension de la nueva tabla
dim(taxa_level)

#ciclo para cada elemento de tabla para asignar la abundancia
#primero asignar en consola elemento i <- 1 y j <- 1
for (i in 1:dim(taxa_level)[1]) {
  bicho <- rownames(taxa_level)[i]
  nums <- which(asignacion_taxonomica$Phylum== bicho)
  for (j in 1:dim(taxa_level)[2]) {
    taxa_level[i,j] <- sum(tabla[nums,j])
  }
}

}

##ABUNDANCIA RELATIVA
#se ocupara la tabla
#1. sacar conteos totales por muestra
totales <- colSums(tabla)
totales #vizulizar el conteo
```

```

#generar matriz de abundancia relativa
tabla_rel <- matrix(nrow=dim(tabla)[1], ncol=dim(tabla)[2])
#asignar mismo nombres para las columnas y filas
colnames(tabla_rel) <- colnames(tabla)
rownames(tabla_rel) <- rownames(tabla)

#ciclo para convertir al porcentaje de abundancia
for (i in 1:dim(tabla)[1]){
  for (j in 1:dim(tabla)[2]){
    tabla_rel[i,j] <- (tabla[i,j]/totales[j])*100
  }
}

#guardar nueva tabla creada
write.table(tabla_rel, file = "tabla-de-matriz-abundancia-porcentual-Phylum.txt")

##CREACIÓN DE GRÁFICO DE BARRAS
# Cargar matriz a nivel de clase en abundancias relativas
tabla <- as.matrix(read.table("tabla-de-matriz-abundancia-porcentual-Phylum.txt", sep=" "))

# Contraer la informacion de la matrix en dos columnas (Fusionar la matriz)
melt_subtable <- melt(tabla)

# Añadir los nombres de los taxa en una columna extra
#melt_subtable$Taxa <- as.character(rep(rownames(tabla), dim(tabla)[2]))

# Ordene los nombres de los taxa de acuerdo a un orden alfabetico
#melt_subtable$Taxa <- factor(melt_subtable$Taxa, levels=sort(rownames(tabla)))

# Generar un vector de colores al azar
#color = grDevices::colors()[grep('gr(a|e)y', grDevices::colors(), invert = T)]
#my_color= sample(color, dim(tabla)[1], replace=FALSE)

#Cambiar nombre de la segunda columna
#names(melt_subtable)[2] <- "variable"

##GRAFICO DE BARRAS GENERO
png("figura17.png", width = 10*300, height = 8*300, res = 300, pointsize = 8)
ggplot(melt_subtable, aes(x=variable, y=value, fill=Taxa)) + geom_bar(stat="identity") +
  scale_fill_manual(values=c("#FABFD2", "#B07AA1", "#D4A6C8", "#D55E00", "#D7B5A6", "#EB1E2C", "#795FAF", "#586EA6",
    "#8CD17D", "#B6992D", "#DE478E", "#B01513", "#9F8F12", "#F1CE63", "#E15759", "#FF9D9A",
    "#79706E", "#BAB0AC", "#D37295", "#027B8E", "#4E79A7", "#A0CBE8", "#F28E2B", "#28E70",
    "#009E7D", "#59A14F", "#9D7660")) +
  theme(axis.text.x = element_text(angle=30, hjust=1, vjust=1, size=8), legend.position="bottom") +
  theme(legend.title=element_text( color='black', hjust=0.5, size=12, face = "bold" ))+
  labs(x = "Muestras", y = "Abundancia Relativa (%)", fill="Genero") +
  theme(axis.title = element_text(size=12, face = "bold")) +

#GRAFICO DE BARRAS PARA PHYLUM
png("figura20.png", width = 10*300, height = 8*300, res = 300, pointsize = 8)
ggplot(melt_subtable, aes(x=variable, y=value, fill=Taxa)) + geom_bar(stat="identity") +
  scale_fill_manual(values= paletteer_d("ggsci::default_igv")) +
  theme(axis.text.x = element_text(angle=30, hjust=1, vjust=1, size=8), legend.position="bottom") +
  theme(legend.title=element_text( color='black', hjust=0.5, size=12, face = "bold" ))+
  labs(x = "Muestras", y = "Abundancia Relativa (%)", fill="Phylum") +
  theme(axis.title = element_text(size=12, face = "bold")) +
  scale_y_continuous(breaks=c(10, 20,30, 40,50, 60,70, 80,90, 100))
dev.off()

#GRAFICO DE BARRAS PARA FAMILIA
png("figura17.png", width = 10*300, height = 8*300, res = 300, pointsize = 8)
ggplot(melt_subtable, aes(x=variable, y=value, fill=Taxa)) + geom_bar(stat="identity") +
  scale_fill_manual(values=c("#027B8E", "#4E79A7", "#A0CBE8", "#D55E00", "#F28E2B", "#F28E70", "#009E7D", "#59A14F",
    "#8CD17D", "#B6992D", "#9F8F12", "#F1CE63", "#E15759", "#FF9D9A", "#79706E", "#BAB0AC", "#D37295",
    "#FABFD2", "#B07AA1", "#D4A6C8", "#9D7660", "#D7B5A6")) +
  theme(axis.text.x = element_text(angle=30, hjust=1, vjust=1, size=8), legend.position="bottom") +
  theme(legend.title=element_text( color='black', hjust=0.5, size=12, face = "bold" ))+
  labs(x = "Muestras", y = "Abundancia Relativa (%)", fill="Familia") +
  theme(axis.title = element_text(size=12, face = "bold")) +
  scale_y_continuous(breaks=c(10, 20,30, 40,50, 60,70, 80,90, 100))
dev.off()

```

13.4. Tablas 9 y 12 COMPLETAS. Cálculos de media de las abundancias relativas y número de muestras de phylum presentes en los grupos Control, S, A y suma de los grupos S y A.

TAXON: <i>phylum</i>	MUESTRAS											
	C(NOtpi)	C.Negativo	MEDIA	CONTEO	S1	S2	S3	S4	S5	S6	MEDIA	CONTEO
Actinobacteria	5.078	5.010	5.044	2	2.741	67.535	3.433	3.068	5.604	2.099	14.080	6
Bacteroidetes	5.042	1.887	3.465	2	43.191	0	0.239	12.302	7.724	16.157	13.269	5
Cyanobacteria	0	0	0	0	0	0	0.061	0.017	0.037	0.039	0.026	4
Euryarcheota	0	1.913	0.957	2	0	0	0	0	0.011	0.013	0.004	2
Firmicutes	89.581	89.328	89.455	2	27.108	28.086	24.252	32.045	15.463	26.621	25.596	6
Fusobacteria	0	0	0	0	1.280	0	0	1.499	0.016	1.637	0.886	4
Proteobacteria	0.297	1.861	1.079	2	1.762	1.312	71.844	50.194	70.762	52.432	41.384	6
Synergistetes	0	0	0	0	2.624	0	0	0	0	0	0.437	1
Tenericutes	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.000	0
Verrucomicrobia	0	0	0	0	21.289	3.067	0.001	0.157	0.072	0.031	4.103	5
SUMA	99.998	99.999			99.995	100	99.83	99.282	99.689	99.029		
CONTEO	4	5			7	4	5	7	8	8		

TAXON: <i>phylum</i>								AMBOS GRUPOS			
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	MEDIA	CONTEO	PROMEDIO	CONTEO
Actinobacteria	2.706	6.786	67.058	23.972	52.882	11.896	2.055	23.908	7	18.994	13
Bacteroidetes	5.069	4.097	0	0.634	0	0	1.28	1.583	4	7.426	9
Cyanobacteria	0	0.042	0	0	0	0	0.053	0.014	2	0.020	6
Euryarcheota	0	0	0	0	0	0	12.663	1.809	1	0.907	3
Firmicutes	92.076	86.795	32.22	72.916	45.329	86.532	82.636	71.215	7	48.405	13
Fusobacteria	0	0	0	0	0	0	0	0.000	0	0.443	4
Proteobacteria	0.146	0.859	0.719	2.211	1.788	1.570	0.481	1.111	7	21.247	13
Synergistetes	0	0	0	0	0	0	0	0.000	0	0.219	1
Tenericutes	0	0	0	0	0	0	0.053	0.008	1	0.004	1
Verrucomicrobia	0	1.519	0	0.264	0	0	0.775	0.365	3	2.234	8
SUMA	99.997	100.098	99.997	99.997	99.999	99.998	99.996				
CONTEO	4	6	3	5	3	3	8				

13.5. Tablas 10 y 13 COMPLETAS. Cálculo de media de las abundancias relativas y número de muestras de familias presentes en los grupos Control, S, A y suma de los grupos S y A.

	MUESTRAS												
	C(NOtpi)	C.Negativo	MEDIA	CONTEO	S1	S2	S3	S4	S5	S6	MEDIA	CONTEO	
TAXON: familia													
1 Acidaminococcaceae	2.580	0.000	1.290	1	6.262	4.914	0.239	0.187	3.815	0.277	2.616	6	
2 Actinomycetaceae	0	0	0	0	0.221	0.063	0.71	0.019	0.292	0.026	0.222	6	
3 Alcaligenaceae	0	0	0	0	1.280	0	0	0	0	0	0.213	1	
4 Bacillaceae	0	0	0	0	0.000	0	0.11	0.095	0.125	0.176	0.084	4	
5 Bacteroidaceae	3.877	1.731	2.804	2	18.203	0	0.185	9.162	7.481	11.117	7.691	5	
6 Bifidobacteriaceae	3.278	0.469	1.874	2	0	66.926	2.150	0.374	0.487	0.128	11.678	5	
7 Carnobacteriaceae	0	0	0	0	0	0	0.021	0	0.001	0.001	0.004	1	
8 Chitinophagaceae		0	0	0	0	0	0.002	0.001	0.044	0	0.008	2	
9 Christensenellaceae	5.569	0	2.785	1	0	0	0.005	0.060	0.007	0.028	0.017	4	
10 Clostridiaceae	0.673	2.993	1.833	2	0	0.216	0.017	2.027	0.073	2.280	0.769	5	
11 Coriobacteriaceae	1.799	4.542	3.171	2	2.521	0.567	0.019	0.334	3.301	0.025	1.128	6	
12 Enterobacteriaceae	0	1.731	0.866	1	0.111	0	71.285	42.757	69.45	51.341	36.721	4	
13 Enterococcaceae	0.150	0.963	0.557	2	3.231	0.804	1.508	16.437	1.305	0.868	4.026	6	
14 Erysipelotrichaceae	22.410	5.544	13.977	2	5.989	0.351	0.063	0.799	2.116	0.420	1.623	6	
15 Fusobacteriaceae	2.469	0	1.235	1	0	0	1.452	0.004	0.005	1.542	0.501	4	
16 Lachnospiraceae	54.029	45.783	49.906	2	5.694	20.775	12.656	0.588	3.13	10.558	8.900	6	
17 Lactobacillaceae	0	0	0	0	0.260	0	0.087	0.46	2.255	0.12	0.530	5	
18 Leuconostocaceae	0	0	0	0	0	0	0.007	0.237	0.011	0.011	0.044	4	
19 Listeriaceae	0	0	0	0	0	0	0	0.087	0	0	0.015	1	
20 Nocardiodaceae	0	0	0	0	0	0	0.037	0.044	0.077	0.049	0.035	4	
21 Methanobacteriaceae	0	1.913	1	1	0	0	0	0	0.027	0.002	0.005	2	
22 Microbacteriaceae	0	0	0	0	0	0	0.002	0.232	0.002	0.085	0.054	4	
23 Micrococcaceae	0	0	0	0	0	0	0.114	0.142	0.187	0.255	0.116	4	
24 Moraxellaceae	0	0	0	0	0	0	0.051	2.540	0.064	0.071	0.454	4	
25 Pasteurellaceae	0.186	0.130	0.158	2	1.762	1.330	0.001	0.028	0.001	0.001	0.521	3	
26 Peptococcaceae	0	0	0	0	0	0	0	0.105	0.028	0.017	0.025	3	
27 Peptostreptococcaceae	0	0	0	0	0	0	0.014	1.882	0.006	2.169	0.679	4	
28 Porphyromonadaceae	0.693	0	0.347	1	0.922	0	0.001	0	0	0.003	0.154	2	
29 Pseudomonadaceae		0	0	0			0.184	2.076	0.72	0.293	0.818	4	
30 Prevotellaceae	0	0	0	0	0.045	0	0.017	0.555	0.08	0.55	0.208	5	
31 Oscillospiraceae	0	0	0	0	0	0	0.030	3.257	0.174	2.795	1.043	4	
32 Rikenellaceae	0.471	0.156	0.314	2	24.02	0	0.001	0.805	0.013	0.983	4.304	4	
33 Ruminococcaceae	0.499	32.913	16.706	2	4.796	0.186	0.337	3.527	0.774	2.620	2.040	6	
34 Streptococcaceae	1.022	0	0.511	1	0.194	0.766	5.747	3.006	1.009	1.833	2.093	6	
35 Streptomycetaceae	0	0	0	0	0	0	0.021	0.017	0.094	0.044	0.029	4	
36 Synergistaceae	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.022	0.004	1	
37 Tannerellaceae	0	0	0	0	0	0	0.019	1.207	0.0804	2.755	0.677	4	
38 Veillonellaceae	0	0	0	0	0.643	0	0	0	0	0	0.107	1	
39 Verrucomicrobiaceae	0	0	0	0	2.624	0	0	0	0	0	0.437	1	
CONTEO	99.705	98.868			78.778	96.898	97.092	93.051	97.234	93.465			
SUMA	15	12			18	11	29	31	31	32			

	MUESTRAS								GRUPOS Y A			
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	MEDIA	CONTEO	MEDIA	CONTEO	
TAXON: familia												
1 Acidaminococcaceae	7.037	4.294	0.063	2.010	0	3.962	0.821	2.598	6	2.607	12	
2 Actinomycetaceae	0	0	0	0	0	0.132	0.106	0.034	2	0.128	8	
3 Alcaligenaceae	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.107	1	
4 Bacillaceae	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.042	4	
5 Bacteroidaceae	4.108	2.637	0	0.044	0	0	0.485	1.039	4	4.365	9	
6 Bifidobacteriaceae	2.457	4.586	65.010	19.843	52.882	9.662	0.389	22.118	7	16.898	12	
7 Carnobacteriaceae	0	0.042	0	0	0	0.167	0	0.030	2	0.017	3	
8 Chitinophagaceae	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.004	2	
9 Christensenellaceae	0	0.716	0	0.216	0	0	11.547	1.783	3	0.900	7	
10 Clostridiaceae	0	0	0	0	31.375	7	0.072	5.451	3	3.110	8	
11 Coriobacteriaceae	0.248	1.650	2.047	4.129	0	1.829	1.559	1.637	6	1.383	12	
12 Enterobacteriaceae	0	0	0	0	0	0	0	0	0	18.360	4	
13 Enterococcaceae	0	0.107	0	0.484	0	0.132	0	0.103	3	2.064	9	
14 Erysipelotrichaceae	20.997	23.640	0.486	11.506	3.317	0.550	19.529	11.432	7	6.528	13	
15 Fusobacteriaceae	1.493	0.259	0	0	0	6.314	2.907	1.568	4	1.034	8	
16 Lachnospiraceae	60.706	57.228	23.670	37.989	3.534	45.014	43.309	38.779	7	23.839	13	
17 Lactobacillaceae	0.053	0.059	2.233	9.227	0	3.770	0	2.192	5	1.361	10	
18 Leuconostocaceae	0	0	0	0	0	0.422	0	0.060	1	0.052	5	
19 Listeriaceae	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.007	1	
20 Nocardiodaceae	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.017	4	
21 Methanobacteriaceae	0	0	0	0	0	0	12.663	1.809	1	0.907	3	
22 Microbacteriaceae	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.027	4	
23 Micrococcaceae	0	0	0	0	0	0.272	0	0.039	1	0.078	5	
24 Moraxellaceae	0	0	0	0	0	0	0	0.000	0	0.227	4	
25 Pasteurellaceae	0	0.361	0.719	1.171	1.788	1.570	0	0.801	5	0.661	8	
26 Peptococcaceae	0.644	0.101	0	1.085	0	0.041	0	0.267	4	0.146	7	
27 Peptostreptococcaceae	0	0	0	0	0	0	0.068	0.010	1	0.344	5	
28 Porphyromonadaceae	0.146	0.175	0	0	0	0	0.053	0.053	3	0.104	5	
29 Pseudomonadaceae	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.409	4	
30 Prevotellaceae	0.391	1.33	0	0.589	0	0	0.542	0.407	4	0.308	9	
31 Oscillospiraceae	0	0	0	0	0	0	0	0.000	0	0.521	4	
32 Rikenellaceae	0.322	0.091	0	0	0	0	0.198	0.087	3	2.195	7	
33 Ruminococcaceae	0.595	0.059	0	1.16	0	2.855	3.037	1.101	5	1.570	11	
34 Streptococcaceae	0.461	0.294	5.768	6.899	7.102	15.767	0.183	5.211	7	3.652	13	
35 Streptomycetaceae	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.015	4	
36 Synergistaceae	0	0.607	0	0.973	0	0	0.481	0.294	3	0.149	4	
37 Tannerellaceae	0	0	0	0	0	0	0	0.000	0	0.338	4	
38 Veillonellaceae	0	0	0	0	0	0	1.164	0.166	1	0.137	2	
39 Verrucomicrobiaceae	0	0	0	0	0	0	0	0.000	0	0.219	1	
CONTEO	99.658	98.236	99.996	97.325	99.998	99.171	99.113					
SUMA	14	19	8	15	6	17	19					

13.6. Tablas 11 y 14 COMPLETAS. Cálculo de media de las abundancias relativas y número de muestras de géneros presentes en los grupos Control, S, A y suma de los grupos S y A.

	MUESTRAS											
	C(NOpti)	C.Negativo	MEDIA	CONTEO	S1	S2	S3	S4	S5	S6	MEDIA	CONTEO
TAXON: género												
1 Acetitomaculum	5.569	0	2.785	1	0	0	0	0	0	0	0	0
2 Actinomyces	0	0	0	0	0.220	0.063	0.709	0.019	0.292	0.026	0.222	6
Adlercreutzia-												
3 Asaccharobacter	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4 Akkermansia	0	0	0	0	0.643	0	0	0.156	0.070	0.019	0.148	4
5 Alistipes	0	0.156	0.078	2	0	0	0.002	0.805	0.013	0.983	0.301	4
6 Anaerostipes	0.673	0	0.337	1	0	0.216	0.034	0.687	0.051	0.647	0.273	5
7 Anaerotruncus	0	0	0	0	0	0	0	0.067	0.040	0.023	0.022	3
8 Bacteroidetes	3.877	1.731	2.804	2	18.203	0	0.185	9.162	7.481	11.117	7.691	5
9 Barnesiella	0.198	0	0.099	1	0	0	0	0	0	0.005	0.001	1
10 Bifidobacterium	3.278	0.469	1.874	2	0	66.926	2.135	0.298	0.374	0.025	11.626	5
11 Blautia	0	16.489	8.245	2	0.036	0	0.100	1.934	0.793	0.266	0.522	5
Blautia-												
12 Lachnoclostridium	0.174	0	0.087	1	0	0	0	0	0	0	0	0
13 Butyrivibrio	0.055	0	0.028	1	0	0	0	0	0	0	0	0
14 Citrobacter	0	0	0	0	0	0	0	1.205	0	0.764	0.328	2
15 Clostridium	0.186	5.869	3.028	2	0	0.423	0.003	0.620	0.006	1.124	0.363	5
16 Collinsella	0.344	4.542	2.443	2	0	0	0.019	0.334	3.301	0.025	0.613	4
17 Coprococcus	4.975	5.206	5.091	2	0.403	0.241	0	0.262	0.015	0	0.154	4
18 Dialister	0	0	0	0	0	0	0	0	0.008	0.112	0.020	2
19 Dorea	13.292	6.182	9.737	2	0.136	20.478	0.009	0.481	0.020	0.004	3.521	6
20 Eggerthella	0.547	0	0.274	1	2.117	0.567	0.009	0.712	0.484	0.740	0.772	6
21 Enterobacter	0	0	0	0	0	0	0.01	1.028	0.010	1.294	0.390	4
22 Enterococcus	0	0.0963	0.048	2	0	0	16.437	1.508	1.305	0.866	3.353	4
23 Enterorhandus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24 Erysipelatoclostridium	0	0	0	0	0	0	0.003	0.614	0.310	0.420	0.225	4
25 Escherichia-Shigella	0	0	0	0	0	0	71.241	36.479	69.386	43.469	36.763	4
26 Eubacterium	0.836	5.544	3.190	2	0.194	0.343	0.002	0.025	0.167	0.254	0.164	6
27 Faecalibacterium	0	5.062	2.531	2	0	0	0.053	1.330	0.012	1.626	0.504	4
28 Faecalitalea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
29 Flavonifractor	0.376	0	0.188	1	0	0.186	0.019	0.055	0.026	0.160	0.074	5
30 Fusicatenibacter	0	0	0	0	0	0	0.002	0.099	0.019	0	0.020	3
31 Fusobacterium	0	0	0	0	0	0	0.004	1.452	0.005	1.542	0.501	4
32 Gemmiger	0	1.471	0.736	2	0	0	0	0	0	0	0	0
33 Gordonibacter	0.130	0	0.065	1	0.291	0	0	0	0.017	0.002	0.052	3
34 Granulicatella	0	0	0	0	0	0	0.019	0	0	0.011	0.005	2
35 Hemophilus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
36 Howardella	0	0	0	0	0	0	0.002	0	0.084	0.010	0.016	3
37 Holdemanella	4.741	0	2.371	1	0	0.351	0.003	0	0	0	0.059	2
38 Hungatella	0.055	0	0.028	1	0.445	0	0.014	1.432	0.442	1.240	0.596	5
39 Intestinibacter	2.140	0	1.070	1	0	0	0	0	0	0	0	0
40 Lachnoclostridium	0	0	0	0	0	0	0.021	1.478	1.391	1.77	0.777	4

Lachnospira	3.040	0	1.520	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
41 Roseburia													
42 Lachnospira	8.515	0	4.258	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
43 Lactobacillus	2.850	0	1.425	1	0	0	0.087	0.460	2.255	0.120	0.487	4	
45 Lactococcus	0	0	0	0	0	0	0.121	0.385	0	0.104	0.102	3	
46 Marvinbryantia	0	0	0	0	0.254	0	0.001	0	0.002	0.001	0.043	2	
47 Megasphaera	9.557	0	4.779	1	3.055	0	0.01	0.007	0.009	0.012	0.516	5	
48 Methanobrevibacter	0	0	0	0	0	0	0	0	0.027	0.002	0.005	2	
49 Odoribacter	0.178	0	0.089	1	0	0	0.001	0.126	0.002	0.428	0.093	3	
50 Olsenella	0.111	0	0.056	1	0.112	0	0.003	0	0.068	0	0.031	3	
51 Paenibacillus	0.578	0	0.289	1	0	0	0	0	0	0.009	0.002	1	
52 Papillibacter	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
53 Parabacteroides	0.317	0	0.159	1	0.922	0	0.019	1.407	0.084	2.755	0.865	5	
54 Paraprevotella	0	0	0	0	0	0	0	0.042	0	0.053	0.016	2	
55 Pediococcus	0.150	0	0.075	1	2.231	0.804	0	0	0	0	0.506	2	
56 Peptoclostridium	10.683	0	5.342	1	0.294	0.046	0	0	0	0	0.057	2	
57 Peptostreptococcus	0	0	0	0	0.379	0	0.006	0.210	0	0.107	0.117	4	
58 Phascolarctobacterium	0.725	0	0.363	1	0.112	0	0.239	0.187	3.815	0.277	0.772	5	
59 Prevotella	0	0	0	0	0.045	0	0.017	0.507	0.085	0.495	0.192	5	
60 Pyramidobacter	0.495	0	0.248	1	0	0	0	0	0	0	0.000	0	
61 Pseudomonas		0	0	0			0.184	2.076	0.720	0.293	0.818	4	
62 Robinsoniella	0	0	0	0	0.597	0	0	0	0	0	0.100	1	
63 Romboutsia	4.455	0	2.228	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
64 Roseburia	2.600	7.535	5.068	2	3.570	0	0.001	0.506	0.006	0	0.681	3	
65 Rothia	0	0	0	0	0	0	0	0.018	0.024	0.097	0.023	3	
66 Ruminiclostridium	0	0	0	0	2.694	0	0	0.001	0	0	0.449	1	
67 Ruminococcus	0.840	18.909	9.875	2	0	0	0.03	3.797	0.020	4.539	1.398	4	
68 Salmonella	2.085	0	1.043	1	1.504	4.155	0	0	0	0	0.943	2	
69 Senegalimassilia	0	0	0	0	0	0	0	0.079	0.094	0.074	0.041	3	
70 Slackia	0	0	0	0	0	0	0	0	0.002	0.012	0.002	2	
71 Solobacterium	7.330	0	3.665	1	2.375	0	0.006	0	0.021	0.002	0.401	4	
72 Stoquefichus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
73 Streptococcus	0	0	0	0	0	0	5.626	2.621	1.002	1.729	1.830	4	
74 Subdoligranulum	0	0.534	0.267	2	2.102	0	0.277	0.455	0.103	0.002	0.490	5	
75 Sutterella	0	0	0	0	4.757	0.758	0.015	0.115	0.019	0.112	0.963	6	
76 Terrisporobacter	0	0	0	0	0.057	0	0	0	0	0	0.010	1	
77 Turicibacter	0	0.156	0.078	2	0	0	0	0	0	0	0	0	
78 Veillonella	0	0	0	0	0	0	0.058	0.015	0.002	0.054	0.022	4	
79 Weissella	0	0	0	0	0.260	0	0.007	0.006	0.011	0.011	0.049	5	
SUMA	95.955	79.9513			48.008	95.557	97.743	75.262	94.493	79.832			
CONTEO	35	16			28	14	40	44	48	50			

	MUESTRAS							AMBOS GRUPOS			
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	MEDIA	CONTEO	MEDIA	CONTEO
TAXON: género											
1 Acetitomaculum	0	0.716	0	0.261	0	0	11.547	1.789	3	1.395	3
2 Actinomyces	0	0	0	0	0	0.132	0.106	0.034	2	1.017	2
Adlercreutzia-											
3 Asaccharobacter	0	0	0	0	0	0	0.164	0.023	1	1.512	1
4 Akkermansia	0	0	0	0	0	0	0.164	0.023	1	2.012	1
5 Alistipes	0	0.354	0	0.522	0	0	0	0.125	2	2.563	2
6 Anaerostipes	0	0	0	0	31.375	6.712	0.072	5.451	3	5.726	3
7 Anaerotruncus	0.644	0.101	0	1.085	0	0.041	0	0.267	4	3.634	4
8 Bacteroidetes	4.208	2.637	0	0.044	0	0	0.485	1.053	4	4.527	4
9 Barnesiella	0	0.129	0	0	0	0	0	0.018	1	4.509	1
10 Bifidobacterium	2.457	4.586	65.010	19.843	52.882	9.662	0.389	22.118	7	16.059	7
11 Blautia	0	0	0	0	0	0	0	0.000	0	5.500	0
Blautia-											
12 Lachnoclostridium	0.085	0	0	0.041	0	0	0.993	0.160	3	6.080	3
13 Butyrivibrio	0	0	0	0	0	0	0	0.000	0	6.500	0
14 Citrobacter	0.065	0	0	0	0	0	0	0.009	1	7.005	1
15 Clostridium	0	0	0	0.078	0	0.171	0	0.036	2	7.518	2
16 Collinsella	0	1.193	2.047	3.703	0	1.829	0.783	1.365	5	8.683	5
17 Coprococcus	1.889	8.540	0.687	0.518	0	8.315	4.424	3.482	6	10.241	6
18 Dialister	6.237	2.517	0	0.104	0	0	0	1.265	3	9.633	3
19 Dorea	7.984	29.170	14.280	13.043	3.367	3.839	14.615	12.328	7	15.664	7
20 Eggerthella	0	0.133	0	0	0	0	0.1750	0.044	2	10.022	2
21 Enterobacter	3.065	1.429	0	0	0	0	0	0.642	2	10.821	2
22 Enterococcus	0	0	0	0	0	0.233	0	0.033	1	11.017	1
23 Enterorhandus	0	0	0	0.141	0	0	0	0.020	1	11.510	1
Erysipelatoclostridiu											
24 m	0	0	0	0	0	0	0.152	0.022	1	12.011	1
25 Escherichia-Shigella	0	0	0	0	0	0.272	0	0.039	1	12.519	1
26 Eubacterium	0.461	0.290	5.768	9.071	7.102	15.596	0.183	5.496	7	15.748	7
27 Faecalibacterium	0	0	0	0	0	0	0.068	0.010	1	13.505	1
28 Faecalitalea	0	0.3190	0	0	0	0	0	0.046	1	14.023	1
29 Flavonifractor	0	0.059	0	0.283	0	0.925	0	0.181	3	14.591	3
30 Fusicatenibacter	0	0.902	0	0	0	0.048	0	0.136	2	15.068	2
31 Fusobacterium	0	0	0	0	0	0.073	0	0.010	1	15.505	1
32 Gemmiger	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16.000	0
33 Gordonibacter	0	0	0	0	0	0	0.328	0.047	1	16.523	1
34 Granulicatella	0	0.042	0	0	0	0	0.053	0.014	2	17.007	2
35 Hemophilus	0	0	0	0	0	0.383	0	0.055	1	17.527	1
36 Howardella	0	0	0	0	0	0	0.126	0.018	1	18.009	1
37 Holdemanella	10.188	6.935	0.486	4.229	3.317	0	7.088	4.606	6	20.803	6
38 Hungatella	0.097	0	0	0	0	0.055	0	0.022	2	19.011	2
39 Intestinibacter	0.714	0.252	0.185	0.208	0	0	0.137	0.214	5	19.607	5
40 Lachnoclostridium	0.118	0.042	0	0	0	0.247	0	0.058	3	20.029	3

	Lachnospira	4.286	3.374	1.423	3.789	0	0	2.017	2.127	5	21.564	5
41	Roseburia											
42	Lachnospira	28.300	7.051	3.629	6.143	0.167	6.674	2.422	7.769	7	24.885	7
43	Lactobacillus	5.351	0.073	0.170	8.832	0	0	4.016	2.635	5	22.817	5
45	Lactococcus	0	0.042	0	0	0	0.178	0	0.031	2	22.516	2
46	Marvinbryantia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	23.000	0
47	Megasphaera	2.355	9.291	0	4.957	0	0	1.161	2.538	4	24.769	4
48	Methanobrevibacter	0	0	0	0	0	0	12.663	1.809	1	24.905	1
49	Odoribacter	0	0	0	0	0	0	0	0.000	0	24.500	0
50	Olsenella	0	0	0	0.059	0	0	0	0.008	1	25.004	1
51	Paeniclostridium	0	0.266	0	0.246	0	0	3.488	0.571	3	25.786	3
52	Papillibacter	0	0	0	0	0	0	0.347	0.050	1	26.025	1
53	Parabacteroides	0.146	0.045	0	0	0	0	0.053	0.035	3	26.517	3
54	Paraprevotella	0	0.958	0	0.537	0	0	0.542	0.291	3	27.146	3
55	Pediococcus	0	0.207	0	0.484	0	0.314	0	0.144	3	27.572	3
56	Peptoclostridium	2.302	3.525	3.103	3.289	0	13.847	11.054	5.303	6	30.651	6
57	Peptostreptococcus	0	0	0	0	0	0	0	0.000	0	28.500	0
	Phascolarctobacteriu											
58	m	0.363	1.148	0	0.164	0	0	0.313	0.284	4	29.142	4
59	Prevotella	0.391	0	0	0	0	0	0	0.056	1	29.528	1
60	Pyramidobacter	0	0	0	0	0	0	0	0	0	30.000	0
61	Pseudomonas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	30.500	0
62	Robinsoniella	0	0	0	0	0	0.062	0	0.009	1	31.004	1
63	Romboutsia	0.359	0.649	0	0.395	0	0	0.402	0.258	4	31.629	4
64	Roseburia	8.870	3.378	0.189	1.521	0	12.751	0.802	3.930	6	33.965	6
65	Rothia	0	0	0	0	0	0.272	0	0.039	1	32.519	1
66	Ruminiclostridium	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33.000	0
67	Ruminococcus	0.530	0	0	0	0	0.125	0	0.094	2	33.547	2
68	Salmonella	3.767	2.865	0	2.010	0	0.464	0.821	1.418	5	34.709	5
69	Senegalimassilia	0	0.323	0	0	0	0	0	0.046	1	34.523	1
70	Slackia	0.248	0	0	0.223	0	0	0	0.067	2	35.034	2
71	Solobacterium	1.481	3.427	0	2.051	0	0	7.330	2.041	4	36.521	4
72	Stoquefichus	0.595	0	0	0.876	0	1.333	0	0.401	3	36.200	3
73	Streptococcus	0	0	0	0	0	0.422	0	0.060	1	36.530	1
74	Subdoligranulum	0	0	0	0	0	0	0	0	0	37.000	0
75	Sutterella	0.138	0	0.063	0	0	3.057	0	0.465	3	37.733	3
76	Terrisporobacter	0	0	0	0	0	0	0	0	0	38.000	0
77	Turicibacter	0	0	0	0	0	0	0	0	0	38.500	0
78	Veillonella	0	0	0	0	0	0.055	0	0.008	1	39.004	1
79	Weissella	0.053	0.059	2.233	9.227	0	3.591	0	2.166	5	40.583	5
	SUMA	97.747	97.027	99.273	97.977	98.21	91.678	89.483				
	CONTEO	31	37	14	33	6	31	35				