



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
Programa de Doctorado de Ciencias de la Salud

Estudio descriptivo de la microbiota intestinal en
pacientes con infección por *Clostridium difficile* y en
individuos colonizados por *Clostridium difficile*.

Autor:

Pedro Sánchez Pellicer

Director:

Dr. D. Vicente Navarro López

Murcia, octubre de 2020



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
Programa de Doctorado de Ciencias de la Salud

Estudio descriptivo de la microbiota intestinal en
pacientes con infección por *Clostridium difficile* y en
individuos colonizados por *Clostridium difficile*.

Autor:

Pedro Sánchez Pellicer

Director:

Dr. D. Vicente Navarro López

Murcia, octubre de 2020



UCAM
UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE LA TESIS
PARA SU PRESENTACIÓN

El Dr. D. Vicente Navarro López como Director de la Tesis Doctoral titulada “Estudio descriptivo de la microbiota intestinal en pacientes con infección por *Clostridium difficile* y en individuos colonizados por *Clostridium difficile*.” realizada por D. Pedro Sánchez Pellicer en el Departamento de Ciencias de la Salud, **autoriza su presentación a trámite** dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, para dar cumplimiento a los Reales Decretos 99/2011, 1393/2007, 56/2005 y 778/98, en Murcia a 5 de octubre de 2020.

UCAM



EIDUCAM
Escuela Internacional
de Doctorado



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

UCAM



EIDUCAM
Escuela Internacional
de Doctorado

AGRADECIMIENTOS

A mi mujer Ruth y a mi hijo Ibai, las dos personas más importantes de mi vida y que sin su amor y su apoyo esta tesis no hubiera sido posible. Amor infinito a ambos.

A mis padres y hermano por haber confiado siempre en mí en cada paso que he dado y por haberme proporcionado una educación de calidad.

Al Dr. Vicente Navarro, director de esta tesis y compañero de trabajo, por su ayuda inestimable en todo el proceso de realización de esta tesis y por su disponibilidad para cualquier cuestión.

A los amigos que se han interesado por este proyecto durante estos años o bien a los que les he dado la matraca explicándoles temas sobre la microbiota intestinal y *Clostridium difficile*. Vosotros sabéis quien sois. Os quiero socios.

A Simón y Rosana por su inestimable ayuda con el inglés. Muchas gracias.

A mis compañeros del laboratorio del Hospital Universitario del Vinalopó por su ayuda inestimable en la realización de pruebas diagnósticas. Muchas gracias.

A Oscar, mi confesor, que me hizo ser consciente de cuan tortuoso era el camino, como lo habían afrontado otros y como debía afrontarlo yo.

*“Si puedes emplear el inexorable minuto
recorriendo una distancia
que valga los sesenta segundos,
tuya es la Tierra
y todo lo que hay en ella,
y -lo que, es más-,
¡Serás un hombre! hijo mío.”*

Fragmento del poema “Si” de Rudyard Kipling (1895).

RESUMEN

INTRODUCCIÓN.

Clostridium difficile es un bacilo Gram positivo, anaerobio estricto y formador de esporas. Constituye la principal causa de diarrea nosocomial en pacientes hospitalizados. Su patogenicidad se asocia al uso de antibióticos y a una respuesta inmune disminuida, así como a la edad avanzada, hospitalización y mayor severidad de la enfermedad de base. La clínica es debida a la producción de las toxinas TcdA y TcdB de acción citotóxica. No obstante, la colonización intestinal de *C. difficile* puede dar lugar a un abanico de situaciones como la ausencia de síntomas (individuos colonizados) hasta diarrea grave o colitis pseudomembranosa fulminante (individuos infectados).

La infección por *C. difficile* (CDI, *Clostridium difficile* infection) supone un problema muy importante en cuanto a mortalidad, morbilidad y costes asociados que supone. Además, el riesgo de recurrencia es muy elevado. Asimismo, se ha evidenciado que la epidemiología de la CDI ha cambiado desde los inicios del siglo XXI. Aparte de un aumento en la mortalidad y morbilidad que genera la CDI, ha empezado a describirse la existencia de un gran número de casos provenientes de la comunidad.

La disrupción de la microbiota intestinal endógena (disbacteriosis) proporciona el ambiente ideal para que pueda producirse la infección, sin embargo, una microbiota intestinal sana es capaz de prevenirla. A este fenómeno se le denomina resistencia a la colonización. Un mecanismo corrompido de resistencia a la colonización por *C. difficile* clave es el concerniente al metabolismo de los ácidos biliares. Se ha comprobado que los ácidos biliares primarios presentan una actividad germinante sobre las esporas de *C. difficile*, mientras que los ácidos biliares secundarios presentan una actividad inhibitoria sobre la germinación. La microbiota intestinal aporta los enzimas encargados de transformar los ácidos biliares primarios en secundarios (principalmente BaiCD). Los miembros de la microbiota intestinal que aporten estos enzimas producirían un efecto inhibitorio sobre la germinación de *C. difficile*. Estos géneros se están presentes en muy baja cantidad y su pérdida se asocia a CDI. Otras alteraciones características de la microbiota intestinal de los pacientes con CDI son la

depleción de familias productoras de butirato como Lachnospiraceae y Ruminococcaceae y el incremento de patógenos oportunistas, principalmente del *phylum* Firmicutes.

Por otra parte, la tasa de portadores o colonizados por *C. difficile* es variable y dependiente de la edad. Es más elevada en aquellos sujetos con ciertas situaciones concomitantes que favorezcan la colonización.

La comparación de la microbiota intestinal de sujetos infectados y colonizados por *C. difficile* ha sido poco estudiado. Este enfoque podría aportar información relevante sobre grupos susceptibles de desarrollo de CDI o de protectores.

OBJETIVOS.

El objetivo del estudio es describir y comparar la microbiota intestinal de 15 pacientes con infección por *C. difficile* sintomática (Grupo CDI), 15 sujetos colonizados por *C. difficile* (Grupo P) y 15 controles sanos (Grupo CTRL).

HIPÓTESIS.

La presencia de ciertos grupos minoritarios de bacterias clave podría relacionarse con la inhibición de la transición desde un estado de colonización a infección.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Mediante secuenciación masiva del gen bacteriano ADNr 16S se realizaron estudios de alfa y beta diversidad, mediante índices estadísticos basados en la ecología bacteriana y mediante curvas de rarefacción y de composición mediante el estudio de las abundancias relativas a nivel de *phylum*, familia y género. Se valoraron las diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos mediante el test no paramétrico de Wilcoxon. Asimismo, se realizaron estudios de agrupamiento mediante análisis principal de componentes mediante un modelo Unifrac.

RESULTADOS.

Se evidencia una pérdida de alfa diversidad y riqueza en los grupos CDI y P con respecto al grupo CTRL, pero sin diferencias significativas entre los dos

primeros. El estudio de la beta diversidad mediante Análisis Principal de Componentes Unifrac, mostró que la estructura de la microbiota intestinal de los grupos CDI y C es diferente a la del grupo CTRL, pero con solapamiento en los dos primeros grupos.

El estudio de la composición muestra que en los grupos CDI y P se produce una fuerte disminución del *phylum* Firmicutes a expensas de las familias Lachnospiraceae y Ruminococcaceae y una expansión de potenciales patógenos oportunistas como el *phylum* Proteobacteria y las familias Enterococcaceae y Streptococcaceae. Asimismo, hay una pérdida de géneros con actividad BaiCD en los pacientes infectados que se conservan en mayor medida en los individuos colonizados, como *Blautia*, *Eubacterium* y *Clostridium Scindens*. También observamos una ganancia de los géneros degradadores de mucina en el grupo CDI y P, *Ruminococcus torques Group* y *Ruminococcus gnavus Group* y del patógeno oportunista *Veillonella* que agravarían la disbacteriosis de los pacientes infectados y colonizados por *C. difficile*. Curiosamente el género *Clostridiodes* que presenta como única especie a *C. difficile* presenta similar abundancia relativa en infectados y colonizados, permitiéndonos suponer que los factores relativos a la virulencia causal también deben ser importantes. Dentro de la familia Erysipelatrichaceae se expanden en los pacientes con CDI géneros de carácter proinflamatorio que se observan en menor medida en los colonizados. El *phylum* Bacteroidetes sufre una total reestructuración a nivel de familia y género tanto en pacientes infectados como en individuos colonizados con respecto a los controles sanos. De manera interesante el beneficioso género *Bifidobacterium* del *phylum* Actinobacteria se pierde en los pacientes con CDI y se conserva en los individuos colonizados en gran medida. También, el género *Akkermansia*, degradador de la mucina, se incrementa en los infectados y disminuye en los colonizados, pudiendo suponer una ventaja selectiva para una más eficaz colonización de y alcance de *C. difficile* al epitelio intestinal.

CONCLUSIÓN.

Concluimos que los sujetos infectados y colonizados por *C. difficile* presentan una microbiota intestinal con una diversidad, riqueza, estructura y composición completamente diferente a la de los controles sanos. No obstante, la microbiota intestinal de los sujetos infectados y colonizados por *C. difficile*

presenta grandes similitudes a nivel de diversidad, riqueza y estructura. Es en la composición donde encontramos que los sujetos colonizados, en especial en géneros minoritarios, presentan diferencias con respecto a los infectados. Este hecho explica, al menos en parte, el estado de colonización asintomático por *C. difficile*.

PALABRAS CLAVE: *Clostridium difficile*, colonización asintomática, infección por *Clostridium difficile*, microbiota intestinal, ADNr 16S.

ABSTRACT.

INTRODUCTION.

Clostridium difficile is a Gram-positive bacillus, strict anaerobic and spore-forming. It is the main cause of nosocomial diarrhea in hospitalized patients. Its pathogenicity is associated with the use of antibiotics and a decreased immune response, as well as with advanced age, hospitalization, and greater severity of underlying disease. Clinically is due to production of the toxins TcdA and TcdB of cytotoxic action. However, intestinal colonization of *C. difficile* can lead to a range of situations such as absence of symptoms (colonized individuals) to severe diarrhea or fulminating pseudomembranous colitis (infected individuals).

C. difficile infection (CDI) is a very important problem in terms of mortality, morbidity, and associated costs. In addition, the risk of recurrence is very high. It has also been shown that the epidemiology of the CDI has changed since the beginning of the 21st century. Apart from an increase in mortality and morbidity generated by the CDI, existence of many cases from the community has begun to be described.

Disruption of the endogenous intestinal microbiota (dysbacteriosis) provides the ideal environment for infection to occur, however, a healthy intestinal microbiota can prevent it. This phenomenon is called resistance to colonization. A corrupted mechanism of resistance to colonization by *C. difficile* key is concern to the metabolism of bile acids. It has been shown that primary bile acids have a germinating activity on spores of *C. difficile*, while secondary bile acids have an inhibitory activity on germination. The intestinal microbiota provides enzymes responsible for transforming primary bile acids into secondary ones (mainly BaiCD). The members of the intestinal microbiota that contribute these enzymes produce an inhibitory effect on the germination of *C. difficile*. These genera are present in a very low quantity and their loss is associated with CDI. Other characteristic alterations of the intestinal microbiota of patients with CDI are a depletion of butyrate producing families such as Lachnospiraceae and Ruminococcaceae and an increase of opportunistic pathogens, mainly from the phylum Firmicutes.

On the other hand, the rate of carriers or colonized by *C. difficile* is variable and dependent on age. It is higher in those subjects with certain concomitant situations that favor colonization.

Comparison of intestinal microbiota of subjects infected and colonized by *C. difficile* has been little studied. This approach could provide relevant information on groups susceptible to the development of CDI or protectors.

OBJECTIVES.

The goal of the study is to describe and compare the intestinal microbiota of 15 patients with symptomatic *C. difficile* infection (CDI Group), 15 subjects colonized by *C. difficile* (P Group) and 15 healthy controls (CTRL Group).

HYPOTHESIS.

Presence of certain minor groups of key bacteria could be related to the inhibition of the transition from a state of colonization to infection.

MATERIAL AND METHODS.

By means of high-throughput sequencing of 16S rDNA bacterial gene, alpha and beta diversity studies were carried out, by means of statistical indices based on bacterial ecology and by rarefaction curves, and composition by studying relative abundances at the *phylum*, family, and genera levels. Statistically significant differences between the three groups were assessed using the non-parametric Wilcoxon test. Likewise, grouping studies were carried out through principal component analysis using a Unifrac model.

RESULTS.

There is evidence of a loss of alpha diversity and richness in CDI and P groups with respect to CTRL group, but without significant differences between the first two. The study of beta diversity through Principal Components Analysis Unifrac shows that the structure of the intestinal microbiota of CDI and P groups is different from that of CTRL group, but with overlap in first two groups.

The study of composition shows that in CDI and P groups there is a strong decrease in *phylum* Firmicutes at expense of Lachnospiraceae and Ruminococcaceae families and an expansion of potential opportunistic pathogens such as Proteobacteria *phylum* and the Enterococcaceae and Streptococcaceae families. Likewise, there is a loss of genera with BaiCD activity in infected patients that are conserved in colonized individuals, such as *Blautia*, *Eubacterium* and *Clostridium Scindens*. We also observed a gain of mucin degrading generators in CDI and P group, as *Ruminococcus torques* Group and *Ruminococcus gnavus* Group, and the opportunistic pathogen *Veillonella* that would aggravate the dysbacteriosis of patients infected and colonized by *C. difficile*. Curiously, genus *Clostridiodes*, which presents *C. difficile* as the only species, has a similar relative abundance in infected and colonized, allowing to assume that factors affected by causal virulence must also be important. Within Erysipelatrichaceae family, proinflammatory genera that are observed to a lesser extent in colonized expand in patients with CDI. *Phylum* Bacteroidetes undergoes total restructuring at the family and genera level in both infected patients and colonized individuals with respect to healthy controls. Interestingly, beneficial genus *Bifidobacterium* of *phylum* Actinobacteria is eradicated in patients with CDI and is largely conserved in colonized individuals. Also, the genus *Akkermansia*, mucin degrader, increases in infected and decreases in colonized, being able to provide a selective advantage for a more effective colonization of *C. difficile* and for reach to intestinal epithelium.

CONCLUSION.

We conclude that subjects infected and colonized by *C. difficile* have an intestinal microbiota with a diversity, richness, structure, and composition completely different from that of healthy controls. However, the intestinal microbiota of subjects infected and colonized by *C. difficile* has great similarities in terms of diversity, richness, and structure. It is in composition that we find that colonized subjects, especially in minority genera, present differences with respect to those infected. This fact explains, at least in part, the state of asymptomatic colonization by *C. difficile*.

KEYWORDS: *Clostridium difficile*, asymptomatic colonization, *Clostridium difficile* infection, intestinal microbiota, 16S rDNA.

ÍNDICE

Capítulo I: Introducción. Marco Teórico.

1.1 Estructura, Fisiología y Metabolismo de *C. difficile*.

1.1.1 Generalidades del Género *Clostridium*.

1.1.2 Estructura, Fisiología y Metabolismo de *C. difficile*.

1.2 Ciclo vital de *C. difficile*: Esporulación y Germinación.

1.2.1 Esporulación de *C. difficile*.

1.2.2 Estructura de la spora de *C. difficile*.

1.2.3 Formación de la spora de *C. difficile*.

1.2.4 Germinación de *C. difficile*.

1.2.4.1 Regulación de la germinación de las esporas de *C. difficile*.

1.2.4.2 Germinación de *C. difficile* y su relación con el metabolismo de los ácidos biliares en el hospedador.

1.2.4.3 Impacto de los ácidos biliares secundarios provenientes de la microbiota intestinal en la resistencia a la colonización de *C. difficile*.

1.3 Factores de Virulencia de *C. difficile*.

1.3.1 *C. difficile*, diversidad génica y virulencia.

1.3.2 Toxinas y Virulencia.

1.3.2.1 Estructura y mecanismo de acción de las toxinas TcdA y TcdB de *C. difficile*.

1.3.2.2 Expresión y genética de las toxinas TcdA y TcdB de *C. difficile*.

1.3.2.3 Actividad y efectos celulares e inmunológicos de las toxinas TcdA y TcdB de *C. difficile*.

1.3.2.4 Toxina binaria CDT de *C. difficile*.

1.3.3 Endosporas y virulencia.

1.3.4 Capas superficiales y proteínas de la pared celular y virulencia.

1.3.5 Fimbrias, pilis y virulencia.

1.3.6 Flagelos y virulencia.

1.3.7 Proteína fijadora de fibronectina y virulencia.

1.3.8 Proteínas de choque térmico y virulencia.

1.3.9 Cepas hipervirulentas de reciente aparición.

1.3.9.1 Factores que explican la hipervirulencia del ribotipo 027.

1.4 Diagnóstico de la infección por *C. difficile*.

1.4.1 Manifestaciones clínicas.

1.4.2 Diagnóstico microbiológico de la infección por *C. difficile*.

1.5 Respuesta Inmune durante la infección por *C. difficile*.

1.5.1 Respuesta inmune protectora y patogénica durante la infección de *C. difficile*.

1.5.2 Papel de la microbiota en la respuesta inmune y su relación en la infección de *C. difficile*.

1.6 Factores de riesgo para la infección por *C. difficile*.

1.6.1 Factores de riesgo para la infección de *C. difficile* durante la hospitalización.

1.6.2 Factores de riesgo para la infección de *C. difficile* adquirida en la comunidad.

1.7 Colonización por *C. difficile*.

1.7.1 Concepto de estado colonización por *C. difficile*.

1.7.2 Epidemiología de la colonización de *C. difficile*.

1.7.3 Implicación clínica de la colonización de *C. difficile*.

1.8 Tratamiento de la infección por *C. difficile*: Terapia antibiótica convencional y nuevas terapias alternativas.

1.8.1 Tratamiento antibiótico convencional frente a la infección por *C. difficile*.

1.8.1.1 Tratamiento antibiótico convencional frente a la infección de *C. difficile* en un episodio inicial.

1.8.1.2 Tratamiento antibiótico convencional frente a la infección de *C. difficile* en un caso fulminante.

1.8.1.3 Tratamiento antibiótico convencional frente a la infección de *C. difficile* recurrente.

1.8.1.4 Resistencias de *C. difficile* al tratamiento antibiótico.

1.8.2 Terapias alternativas para el tratamiento de la infección de *C. difficile*.

1.8.2.1 Trasplante de Microbiota Fecal.

1.8.2.2 Inmunoterapia.

1.8.2.3 Terapias complementaria y alternativas.

1.9 Epidemiología de la infección por *C. difficile*.

1.9.1 Definiciones.

1.9.2 Epidemiología de la infección de *C. difficile*.

1.9.3 Medidas preventivas para la infección y transmisión de *C. difficile*.

1.10 *C. difficile* y su relación con la microbiota intestinal.

- 1.10.1 La microbiota intestinal y su relación con el estado de salud.
- 1.10.2 Resistencia a la colonización por *C. difficile*.
- 1.10.3 Alteraciones de la microbiota Intestinal en pacientes con infección de *C. difficile*.
- 1.10.4 Alteraciones de la microbiota intestinal en pacientes portadores asintomáticos de *C. difficile*.

Capítulo II: Justificación del estudio y objetivos.

Capítulo III: Hipótesis.

Capítulo IV: Material y Métodos.

4.1 Diseño del estudio.

- 4.1.1 Criterios de inclusión y de exclusión.
- 4.1.2 Inclusión de los pacientes en el estudio.
- 4.1.3 Características de los grupos de estudio.
- 4.1.4 Recogida y Almacenamiento de las muestras de heces.

4.2 Pruebas de laboratorio para el diagnóstico de los pacientes con CDI e identificación de los individuos colonizados por *C. difficile*.

- 4.2.1 Determinación de TcdA/TcdB y GDH en heces.
- 4.2.2 Determinación de los genes *tcdB* y TPI de *C. difficile*.

4.3 Determinación metataxonómica de la composición de la microbiota intestinal.

- 4.3.1 Extracción del ADN.
- 4.3.2 Amplificación y secuenciación del ADN.
- 4.3.3 Análisis bioinformático de las secuencias de amplicones del gen bacteriano ADNr 16S y asignación taxonómica.

4.4 Expresión de resultados.

- 4.4.1 Estructura de las comunidades microbianas.
- 4.4.2 Estudio de la diversidad y riqueza de la microbiota intestinal.
 - 4.4.2.1 Índices para cuantificar la alfa diversidad y riqueza.
 - 4.4.2.1.1 Índice de Shannon.
 - 4.4.2.1.2 Índice de Simpson.
 - 4.4.2.1.3 Estimador CHAO1.

- 4.4.2.1.4 Estimador ACE (*Abundance-based Coverage Estimator*).
- 4.4.2.2 Representación gráfica de los índices de alfa diversidad y riqueza y estudio de diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.
- 4.4.2.3 Curvas de rarefacción.
- 4.4.2.4 Índices para cuantificar la beta diversidad.
 - 4.4.2.4.1 Índice de similitud de Jaccard.
- 4.4.3 Análisis Principal de Componentes (PCoA, *Principal Component Analysis*).
- 4.4.4 Análisis UniFrac.
- 4.4.5 Estudio de la composición de la microbiota intestinal.

Capítulo V: Resultados.

5.1 Lecturas por muestra.

5.2 Estudio de la diversidad y riqueza de la microbiota intestinal de los grupos de estudio.

- 5.2.1 Índices de alfa diversidad de Shannon y Simpson.
- 5.2.2 Estimadores de riqueza.
- 5.2.3 Curvas de rarefacción.
- 5.2.4 Índice de beta diversidad de Jaccard.

5.3 Análisis Principal de Componentes.

5.4 Análisis UniFrac.

- 5.4.1 UniFrac Weighted.
- 5.4.2 UniFrac Unweighted.

5.5 Análisis de la composición de la microbiota intestinal.

- 5.5.1 Diferencias a nivel de *phylum*.
 - 5.5.1.1 Diferencias a nivel de *phylum* entre los grupos CDI y CTRL.
 - 5.5.1.2 Diferencias a nivel de *phylum* entre los grupos P y CTRL.
 - 5.5.1.3 Diferencias a nivel de *phylum* entre los grupos CDI y P.
- 5.5.2 Diferencias a nivel de familia.
 - 5.5.2.1 Diferencias a nivel de familia entre los grupos CDI y CTRL.
 - 5.5.2.2 Diferencias a nivel de familia entre los grupos P y CTRL.
 - 5.5.2.3 Diferencias a nivel de familia entre los grupos P y CDI.
- 5.5.3 Diferencias a nivel de género.
 - 5.5.3.1 Diferencias a nivel de género entre los grupos CDI y CTRL.
 - 5.5.3.2 Diferencias a nivel de género entre los grupos P y CTRL.

5.5.3.3 Diferencias a nivel de género entre los grupos CDI y P.

Capítulo VI: Discusión.

6.1 Alfa diversidad y riqueza en los grupos CDI y P con respecto a los controles sanos.

6.2 Estudio de la beta diversidad en los grupos CDI, P con respecto a los controles sanos.

6.3 Diferencias en la composición mediante el estudio de las abundancias relativas entre los grupos CDI, P y CTRL a diferentes rangos taxonómicos.

6.3.1 Diferencias de composición a nivel de *phylum*.

6.3.1.1 Diferencias de composición a nivel de *phylum* entre los grupos CDI y CTRL.

6.3.1.2 Diferencias de composición a nivel de *phylum* entre los grupos P y CTRL y entre los grupos CDI y P.

6.3.2 Diferencias de composición a nivel de familia y género pertenecientes al *phylum* Firmicutes entre los grupos CDI y P con respecto al grupo CTRL.

6.3.2.1 Diferencias de composición en los géneros de las familias Lachnospiraceae y Ruminococcaceae entre los grupos CDI y P con respecto al grupo CTRL.

6.3.2.2 Diferencias de composición en los géneros de la familia Veillonellaceae entre los grupos CDI y P con respecto al grupo CTRL.

6.3.2.3 Diferencias de composición en los géneros de la familia Acidaminococcaceae entre los grupos CDI y P con respecto al grupo CTRL.

6.3.2.4 Diferencias de composición en los géneros de la familia Streptococcaceae entre los grupos CDI y P con respecto al grupo CTRL.

6.3.2.5 Diferencias de composición en los géneros de la familia Enterococcaceae entre los grupos CDI y P con respecto al grupo CTRL.

6.3.2.6 Diferencias de composición en los géneros de la familia Lactobacillaceae entre los grupos CDI y P con respecto al grupo CTRL.

6.3.2.7 Diferencias de composición en los géneros de la familia Peptostreptococcaceae entre los grupos CDI y P con respecto al grupo CTRL.

6.3.2.8 Diferencias de composición en los géneros de la familia Erysipelatrichaceae entre los grupos CDI y P con respecto al grupo CTRL.

- 6.3.3 Diferencias de composición a nivel de familia y género pertenecientes al *phylum* Bacteroidetes entre los grupos CDI y P con respecto al grupo CTRL.
- 6.3.3.1 Diferencias de composición en los géneros de la familia Bacteroidaceae entre los grupos CDI y P con respecto al grupo CTRL.
- 6.3.3.2 Diferencias de composición en los géneros de la familia Tannerellaceae entre los grupos CDI y P con respecto al grupo CTRL.
- 6.3.3.3 Diferencias de composición en los géneros de la familia Prevotellaceae entre los grupos CDI y P con respecto al grupo CTRL.
- 6.3.3.4 Diferencias de composición en los géneros de la familia Rikenellaceae entre los grupos CDI y P con respecto al grupo CTRL.
- 6.3.3.5 Diferencias de composición en los géneros de la familia Barnesiellaceae entre los grupos CDI y P con respecto al grupo CTRL.
- 6.3.3.6 Diferencias de composición en los géneros de la familia Marinifilaceae entre los grupos CDI y P con respecto al grupo CTRL.
- 6.3.4 Diferencias de composición a nivel de familia y género pertenecientes al *phylum* Proteobacteria entre los grupos CDI y P con respecto al grupo CTRL.
- 6.3.4.1 Diferencias de composición en los géneros de la familia Enterobacteriaceae entre los grupos CDI y P con respecto al grupo CTRL.
- 6.3.4.2 Diferencias de composición en los géneros de la familia Burkholderiaceae entre los grupos CDI y P con respecto al grupo CTRL.
- 6.3.5 Diferencias de composición a nivel de familia y género pertenecientes al *phylum* Actinobacteria entre los grupos CDI y P con respecto al grupo CTRL.
- 6.3.5.1 Diferencias de composición en los géneros de la Familia Bifidobacteriaceae entre los grupos CDI y P con respecto al grupo CTRL.
- 6.3.6 Diferencias de composición a nivel de familia y género pertenecientes al *phylum* Verrucomicrobia entre los grupos CDI y P con respecto al grupo CTRL.
- 6.3.6.1 Diferencias de composición en los géneros de la familia Akkermansiaceae entre los grupos CDI y P con respecto al grupo CTRL.

6.4 Visión global de los resultados.

Capítulo VII: Líneas de futuro.

Capítulo VIII: Conclusiones.

Capítulo IX: Limitaciones del estudio.

Capítulo X: Bibliografía.

LISTADO DE FIGURAS

FIGURA 1: Esquema de la transmisión de la infección y ciclo vital de *C. difficile*.

FIGURA 2: Microfotografías de cortes finos de secciones de diversas cepas de esporas de *C. difficile*.

FIGURA 3: Principales estadios morfogénicos de la esporulación.

FIGURA 4: Esquema del proceso de germinación de las esporas de *C. difficile*.

FIGURA 5: Dominios proteicos funcionales y estructurales de TcdA y TcdB.

FIGURA 6: Mecanismo de acción de las toxinas de *C. difficile* esquematizado.

FIGURA 7: Esquema de los diferentes toxinotipos y sus diferencias con respecto a la cepa de referencia VPI 10463.

FIGURA 8: Correlación de los toxinotipos y ribotipos en cepas productoras de la toxina binaria CDT.

FIGURA 9: Mecanismo de acción de la toxina binaria CDT de *C. difficile*.

FIGURA 10: Pseudomenbranas en endoscopia.

FIGURA 11: Colonias de *C. difficile*.

FIGURA 12: Tinción de Gram de *C. difficile*.

FIGURA 13: Algoritmo diagnóstico de la CDI en 2 pasos.

FIGURA 14: Algoritmo diagnóstico de la CDI en 3 pasos.

FIGURA 15: Algoritmo diagnóstico de la CDI multinivel.

FIGURA 16: Interacciones Hospedador-*C. difficile* que provocan las respuestas inmunes innatas.

FIGURA 17: Esquema de la colonización por esporas de *C. difficile* y las diferentes posibilidades de progresión.

FIGURA 18: Distribución de los ribotipos más frecuentes en Europa durante 2012-2013.

FIGURA 19: Distribución geográfica de los ribotipos de *C. difficile* encontrados en el estudio multicéntrico de Davies.

FIGURA 20: Esquema de la pérdida de la resistencia a la colonización durante la disbacteriosis y su susceptibilidad al desarrollo de CDI.

FIGURA 21: Funcionamiento de una Sonda Fluorescente en *FluoroCycler*.

FIGURA 22: Ejemplo de curva de *melting* con dos picos para tcdb y TPI.

FIGURA 23: Ejemplo de curva de *melting* con un pico para TPI.

FIGURA 24: Nomenclatura IUPAC del *Forward primer* y *Reverse primer* utilizados en la secuenciación del gen ADNr 16S bacteriano.

FIGURA 25: Ejemplo de *Biplot* construido mediante PCoA de dos dimensiones que permite visualizar 4 subgrupos.

FIGURA 26: Diagrama de cajas del índice de Simpson a nivel del rango taxonómico de género de los 3 grupos de estudio.

FIGURA 27: Diagrama de cajas del índice de Shannon a nivel del rango taxonómico de género de los 3 grupos de estudio.

FIGURA 28: Diagrama de cajas del estimador CHAO1 a nivel del rango taxonómico de género de los 3 grupos de estudio.

FIGURA 29: Diagrama de cajas del estimador ACE a nivel del rango taxonómico de género de los 3 grupos de estudio.

FIGURA 30: Curva de rarefacción a nivel de género del grupo de controles sanos.

FIGURA 31: Curva de rarefacción a nivel de género del grupo CDI.

FIGURA 32: Curva de rarefacción a nivel de género del grupo P.

FIGURA 33: Curva de rarefacción a nivel de género con todos los grupos de estudio.

FIGURA 34: Diagrama de cajas del índice de beta diversidad de Jaccard nivel del rango taxonómico de género de los 3 grupos de estudio.

FIGURA 35: PCoA a nivel de género.

FIGURA 36: Porcentaje de las varianzas explicadas con cada uno de los componentes principales obtenidos.

FIGURA 37: Análisis UniFrac *Weighted* para los 3 grupos de estudio.

FIGURA 38: Análisis UniFrac *Weighted* para los grupos CDI y CTRL.

FIGURA 39: Análisis UniFrac *Weighted* para los grupos P y CTRL.

FIGURA 40: Análisis UniFrac *Unweighted* para los 3 grupos de estudio.

FIGURA 41: Diferencias en las abundancias relativas a nivel de *phylum* en los grupos CDI y CTRL.

FIGURA 42: Diferencias en las abundancias relativas a nivel de *phylum* en los grupos P y CTRL.

FIGURA 43: Diferencias en las abundancias relativas a nivel de *phylum* en los grupos P y CDI.

FIGURA 44: Diferencias en las abundancias relativas a nivel de familia en los grupos CDI y CTRL mayoritarias.

FIGURA 45: Diferencias en las abundancias relativas a nivel de familia en los grupos P y CTRL mayoritarias.

FIGURA 46: Diferencias en las abundancias relativas a nivel de Familia en los grupos P y CDI mayoritarias.

FIGURA 47: Diferencias en las abundancias relativas a nivel de los géneros mayoritarios en los grupos CDI y CTRL.

FIGURA 48: Diferencias en las abundancias relativas a nivel de los géneros mayoritarios en los grupos P y CTRL.

FIGURA 49: Diferencias más importantes en las abundancias relativas a nivel de género en los grupos P, CTRL Y CDI.

FIGURA 50: PCoA basado en distancias UniFrac *Unweighted* de pacientes con CDI (CDI), individuos colonizados asintomáticos (AS) y controles sanos (CT) en el estudio de Zhang y col.

FIGURA 51: PCoA basado en distancias UniFrac *Unweighted* de pacientes con CDI (Grupo R, triangulo), pacientes con CDI sometidos a FMT (Grupo RF, círculo) y donantes sanos (Grupo D, cuadrado) en el estudio de Brown y col.

FIGURA 52: PCoA basado en distancias UniFrac *Unweighted* en pacientes con CDI (Grupo CDI, círculo azul), con administración antibiótica previa sin clínica (Grupo AB+, cuadrado verde) y sin administración antibiótica previa sin clínica (Grupo AB-, triangulo rojo) en el estudio de Milani y col.

FIGURA 53: Diferencias en las abundancias relativas (%) de los phylum en los grupos CDI, AS y CT en el estudio Zhang y col.

LISTADO DE TABLAS

TABLA 1: Características clínicas y demográficas de los grupos de estudio.

TABLA 2: *Read Counts* por muestra en el grupo de pacientes con CDI.

TABLA 3: *Read Counts* por muestra en el grupo de individuos colonizados por *C. difficile*.

TABLA 4: *Read Counts* por muestra en el grupo de controles sanos.

TABLA 5: Comparación de los Índices de Shannon y Simpson en el rango taxonómico de género.

TABLA 6: Comparación de los estimadores de riqueza CHAO1 y ACE en el rango taxonómico de género.

TABLA 7: Comparación del índice de beta diversidad de Jaccard en el rango taxonómico de género.

TABLA 8: Diferencias en las abundancias relativas (%) a nivel de *phylum* entre los grupos CDI y CTRL.

TABLA 9: Diferencias en las abundancias relativas (%) a nivel de *phylum* entre los grupos P y CTRL.

TABLA 10: Diferencias en las abundancias relativas (%) a nivel de *phylum* entre los grupos P y CDI.

TABLA 11: Diferencias en las abundancias relativas (%) a nivel de familia entre los grupos CDI y CTRL.

TABLA 12: Diferencias en las abundancias relativas (%) a nivel de Familia entre los grupos P y CTRL.

TABLA 13: Diferencias en las abundancias relativas (%) a nivel de género entre los grupos CDI y CTRL dentro del *phylum* Firmicutes.

TABLA 14: Diferencias en las abundancias relativas (%) a nivel de género entre los grupos CDI y CTRL dentro del *phylum* Bacteroidetes.

TABLA 15: Diferencias en las abundancias relativas (%) a nivel de Género entre los grupos CDI y CTRL dentro del *phylum* Proteobacteria.

TABLA 16: Diferencias en las abundancias relativas (%) a nivel de género entre los grupos P y CTRL dentro del *phylum* Firmicutes.

TABLA 17: Diferencias en las abundancias relativas (%) a nivel de género entre los grupos P y CTRL dentro del *phylum* Bacteroidetes.

TABLA 18: Diferencias en las abundancias relativas (%) a nivel de género entre los grupos P y CTRL dentro del *phylum* Proteobacteria.

TABLA 19: Diferencias en las abundancias relativas (%) a nivel de género entre los grupos CDI y P dentro del *phylum* Firmicutes.

TABLA 20: Diferencias en las abundancias relativas (%) a nivel de género entre los grupos CDI y P dentro del *phylum* Bacteroidetes.

TABLA 21: Diferencias en las abundancias relativas (%) a nivel de género entre los grupos CDI y P dentro del *phylum* Proteobacteria.

TABLA 22: Propiedades metabólicas de *Lactobacillus* característicos de humanos.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACE: *Abundance-based Coverage*.

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

ADP: Adenosina difosfato.

AGCC: Ácidos grasos de cadena corta.

ARN: Ácido Ribonucleico.

BaiCD: *Bile Acid 7 α Dehydroxylase*.

BSH: *Bile Salt Hydrolase*.

CAZymes: *Carbohydrate Active Enzymes*.

CCNN: Ensayo de Citotoxicidad.

CdeC: *Cysteine rich exosporium protein*.

CDC: *Centers for Diseases Control*.

CDI: *Clostridium difficile infection*.

CDI-IC: CDI de inicio en la comunidad.

CDI-ICIH: CDI de inicio en la comunidad asociada a ingreso hospitalario previo.

CDI-IH: CDI de inicio hospitalario.

CDT: Toxina Binaria *Clostridium difficile*.

cdtA: gen CDT.

cdtb: gen CDT.

CMBD: Conjunto mínimo básico de datos.

CoA: Coenzima A.

CROPS: *Combined Repetitive Oligopeptides*.

CSPG4: Condroitín sulfato proteoglicano 4.

CWP: *Cell wall proteins*.

CXCL1: *Chemokine (C-X-C motif) ligand 1.*

CXCL5: *C-X-C motif Chemokine 5.*

EAEC: *Escherichia coli* difusamente adherente.

EAEC: *Escherichia coli* Enteroagregativa.

ECDC: *European Center Diseases Control.*

EIEC: *Escherichia coli* Enteroinvasiva.

EMA: *European Medicines Agency.*

EPEC: *Escherichia coli* Enteropatógena.

EPINE: Estudios de prevalencia de las infecciones nosocomiales en España.

ETEC: *Escherichia coli* Enterotoxigénica.

FDA: *US Food and Drug Administration.*

FFA2: *Free fatty acid receptor 2.*

FFA3: *Free fatty acid receptor 3.*

FMT: *Fecal Microbiota Transplantation.*

GDH: Glutamato Deshidrogenasa.

HMW: *High molecular weight.*

IDSA: *Infectious Diseases Society of America.*

IgA: Inmunoglobulina A.

IL10: Interleucina 10.

IL-1 β : Interleucina 1 β .

IL-23: Interleucina 23.

IL-6: Interleucina 6.

IL-8: Interleucina 8.

ILCs: Células Linfoides Innatas.

INP6: Inositol hexafosfato.

LAB: *Lactic Acid Bacteria*.

LCT: *Large Clostridial Toxins*.

LMW: *Low molecular weight*.

LSR: *Lypolysis-Stimulated Lipoprotein Receptor*.

MACs: *Microbiota Accesible Carbohydrates*.

MAPK: *Mitogen activated protein kinase*.

MLST: *Multilocus Sequence Typing*.

NAATs: *Nucleic Acids Amplification Tests*.

NAD: Nicotinamida difosfato.

NF- κ B: *Nuclear Factor Kappa B*.

OTU: *Operational Taxonomic Unit*.

PaLoc: Locus de Patogenicidad.

PBS: *Phosphate-Buffered Saline*.

PC: *Principal Component*.

PC1: *Principal Component 1*.

PC2: *Principal Component 2*.

PCOA: *Principal Coordinates Analysis*.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PRRs: *Pattern Recognition Receptors*.

PUL: *Polysaccharide Utilization Loci*.

ROS: *Reactive Oxygen Species*.

SHEA: *Society for Healthcare Epidemiology of America*.

SLPs: *S-layer proteins*.

STEC: *Escherichia coli* productora de toxina Shiga.

TC: Cultivo Toxigénico.

tcdA: gen TcdA.

TcdA: Toxina A *Clostridium difficile*.

tcdB: gen TcdB.

TcdB: Toxina B *Clostridium difficile*.

TLRs: *Toll-Like Receptors*.

TNF α : Factor de necrosis tumoral Alfa.

TNF β : Factor de necrosis tumoral Beta.

TPI: *Triose phosphate isomerase*.

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana.

VRE: *Vancomycin Resistant Enterococci*.

VTEC: *Escherichia coli* Verocitotoxigénica.

Xfp: Fructosa 6 fosfato fosfocetolasa.

I-INTRODUCCIÓN.
MARCO TEÓRICO.

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO.

En este capítulo introductorio me propongo establecer un amplio marco teórico, basado en una exhaustiva revisión bibliográfica actualizada. Puede que resulte excesiva para el lector, pero considero que es imprescindible repasar determinados aspectos para alcanzar otros, especialmente para comprender la justificación de estudio.

En esta tesis el protagonista es *Clostridium difficile*. Conocer sus características estructurales, morfológicas, metabólicas y su asignación taxonómica es un buen punto de partida. A continuación, trataremos de esclarecer su ciclo vital, factores de virulencia, diagnóstico de la infección que produce en humanos, la respuesta inmune que se establece durante la infección por parte del hospedador, factores de riesgo para la infección, la posibilidad de colonización asintomática, los posibles tratamientos, tanto convencionales como las nuevas terapias, la epidemiología de la infección y por último, la relación de este germen con la microbiota intestinal.

1.1 ESTRUCTURA, FISIOLOGÍA Y METABOLISMO DE *C. DIFFICILE*.

C. difficile pertenece al *phylum* Firmicutes, clase Clostridia, orden Clostridiales, familia Clostridiaceae (Peptostreptococcaceae) y género *Clostridium* (*Peptoclostridium*, *Clostridioides*).

1.1.1 Generalidades del Género *Clostridium*.

El género *Clostridium* fue propuesto por primera vez en 1880 por Prazmowski con *Clostridium butyricum* como especie tipo. Englobaba a un amplio abanico de bacilos Gram positivos, anaerobios y formadores de esporas. No fue hasta el desarrollo de las técnicas filogenéticas moleculares como el estudio del gen ARNr 16S que se puso de manifiesto la gran diversidad de este género y sus interrelaciones con otros tipos de bacterias. En 1994 M. D. Collins propuso la

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

primera revisión de la clase Clostridia a partir de la secuenciación del ARNr 16S y estableció una estructura jerárquica. El grupo designado originalmente como *cluster* I englobaba a la especie tipo *Clostridium butyricum* y similares y actualmente es conocido como el *cluster Clostridium Sensu Stricto* (Collins, 1994; Lawson, 2015) tras las reorganizaciones y ramificaciones de especies que actualmente están incluidas bien en otros nuevos géneros, o bien en otros *clusters* dentro del género *Clostridium*. De las 238 especies que originalmente se englobaron dentro del *cluster Sensu Stricto*, actualmente quedan menos de 80 (Lawson, 2015). Las modificaciones pueden consultarse en la *Jean Euzéby's List of Prokaryotic Names with Standing Nomenclature* (<http://www.bacterio.cict.fr/>) que está actualizada de forma mensual al publicarse las reorganizaciones filogenéticas en el *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.

Actualmente el género *Clostridium* está constituido por bacilos normalmente Gram positivos. Pueden presentar o no movilidad, pero si son móviles es debido a filamentos peritricos. La mayor parte de sus especies son capaces de producir endosporas de forma oval o esférica. La pared celular normalmente contiene ácido mesodiaminopimélico. El contenido de ADN G+C oscila de entre 22 y 53 mol % (*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2012).

Metabólicamente presenta mucha heterogenicidad. Suelen ser bacterias quimiorganótrofas, aunque algunas especies son quimiolitótrofas o quimioautótrofas. Son capaces de producir distintos ácidos orgánicos y alcoholes a partir de carbohidratos o péptidos. Pueden presentar de forma excluyente o conjunta un metabolismo glucolítico o proteolítico. Metabolizan carbohidratos (pero no polisacáridos), alcoholes, aminoácidos, purinas y pirimidinas, esteroides u otros componentes orgánicos, por tanto, pueden ser capaces de realizar fermentación acética, propiónica, butírica, de alcoholes, aminoácidos y de purinas y pirimidinas, incluyendo otras menos comunes. Algunas especies son capaces de fijar el nitrógeno atmosférico. No es un género sulfato reductor. La mayor parte de las especies del *cluster Sensu Stricto* producen ácido butírico como producto principal de fermentación (*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2012).

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

Normalmente son especies catalasa negativas, aunque en algunas cepas pueden detectarse trazas. Muchas especies son anaerobias estrictas, aunque su tolerancia al oxígeno es variable. Algunas especies pueden crecer, pero no esporular en presencia de oxígeno atmosférico (*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2012).

Para muchas especies el crecimiento es más rápido a pH 6.5-7.0 y a temperatura entre 30 y 37°C (*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2012). Actualmente hay 168 especies diferentes validadas (*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2012).

Debido a su gran diversidad metabólica y a que solo unas pocas especies son patógenas debido a la producción de toxinas, muchas de estas especies han tenido aplicaciones biotecnológicas como la producción de enzimas, compuestos bioquímicos y biocombustibles.

1.1.2 Estructura, Fisiología y Metabolismo de *C. difficile*.

C. difficile fue identificado por primera vez por E. O'Toole en 1935. Se le puso ese nombre por su particular dificultad en el aislamiento y posterior estudio. M. D. Collins evidenció que, filogenéticamente era distinto a un cualquier *Clostridium* del cluster I y fue ubicado en el cluster XI, junto a *Peptostreptococcus anaerobius*, otra bacteria de poder patógeno (Collins, 1994). La segunda y última edición del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* ya considera a muchas especies del cluster XI dentro de la nueva familia *Peptostreptococcaceae*, *C. difficile* entre ellas. Presenta similitudes en el ARNr 16S entre el 94.7 y 95.4% con *Eubacterium tenue*, *Clostridium irregulare*, *Clostridium sordellii*, *Clostridium ghonii*, *Clostridium lituseburense*, *Clostridium mangenotii* y *Clostridium bifermentans*. Se ha propuesto que se le cambie el nombre a *Clostridoides difficile*, dentro de un nuevo género *Clostridoides* del cluster XI (Lawson, 2016). Para no que no haya confusión, y puesto que el nombre de *C. difficile* está mucho más difundido, en el presente estudio se le llamará por su nombre clásico.

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

C. difficile es una especie formada por bacilos Gram positivos, anaerobios estrictos, de dimensiones 0.5-1.9 x 3.0-16.9 μm . Presenta movilidad en caldo de cultivo debido a la presencia de filamentos peritricos. Algunas cepas producen cadenas de 2 a 6 células unidas de extremo a extremo. Es productor de esporas ovoides subterminales, raramente terminales. La esporulación en muchas cepas se produce en Agar Sangre Brucella tras dos días de incubación. Esta puede estimularse mediante enriquecimiento con 0.1% de taurocolato sódico. La pared celular contiene ácido mesodiaminopimélico, como es característico en el género. Las colonias en Agar Sangre son típicamente de 2-5 mm, circulares, ocasionalmente rizoides, planas o ligeramente convexas, opacas, grisáceas o blanquecinas y su superficie puede ser mate o brillante. Todas las cepas producen una fluorescencia verde pálida evanescente bajo luz ultravioleta tras 48 horas de incubación en Agar Sangre Brucella enriquecido con hemina y vitamina K. La temperatura óptima de crecimiento está entre 30-37 °C, aunque puede crecer entre 25-45°C. Se requieren para el crecimiento los aminoácidos prolina, ácido aspártico, serina, leucina, alanina, treonina, fenilalanina, metionina e isoleucina. El contenido en ADN G+C (mol%) es 28% (*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2012).

En Agua de Peptona muestra turbidez y aparece un fino sedimento con su crecimiento. Presenta un pH ácido de 5.5-5.7 tras 5 días de incubación. También aparece gas, hidrogeno, amonio y en algunas cepas ácido sulfhídrico. Los productos orgánicos que aparecen en el Agua de Peptona y que nos indica las rutas metabólicas fermentativas para la obtención de energía, incluyen el ácido acético, isobutírico, butírico, isovalérico (una de las pocas especies que lo produce), isocapróico (una de las pocas especies que lo produce), fórmico y láctico. El pirúvico es transformado en butirato y acetato. La treonina es convertida en propionato. Por tanto, utiliza rutas glucolíticas y proteolíticas. El ácido láctico no se utiliza como sustrato. Ácido fenilacético, fenilpropiónico, hidroxifenilacético, ácidos indolacéticos derivados y p-cresol se producen en el medio Triptona Soja Agar con fenilalanina, tirosina y triptófano. El ácido isocapróico es generado desde la leucina, isovalerato desde leucina e isoleucina e isobutirato desde la valina (*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2012).

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

En algunas cepas puede detectarse los enzimas hialuronidasa, glucuronidasa extracelular, condroitín sulfatasa y colagenasa (*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2012).

Las pruebas indol, lecitinasa, lipasa, almidón hidrolizado y de reducción del nitrato son negativas. La hidrolisis de la esculina es positiva (*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2012).

No es capaz de fermentar amigdalina, arabinosa, galactosa, glucógeno, inositol, inulina, lactosa, maltosa, melibiosa, rafinosa, ramnosa, ribosa, almidón, sacarosa. Por el contrario, la mayor parte de cepas es capaz de utilizar la fructosa y el manitol y manosa. El uso de celobiosa, salicina, sorbitol, trealosa y xilosa es pobre, solo produce débiles reacciones (*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2012).

C. difficile presenta una serie de reacciones importantes que le permiten su supervivencia intestinal. El ácido p-hidroxifenilacético es transformado por la p-hidroxifenilacético descarboxilasa en p-cresol, un compuesto de poder bacteriostático que le proporciona una ventaja competitiva frente a otros microorganismos de la microbiota intestinal. Es también capaz degradar la etanolamina, constituyente de los fosfolípidos provenientes de la dieta del hospedador, y utilizarla como fuente de carbono y nitrógeno (*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2012).

1.2 CICLO VITAL DE *C. DIFFICILE*: ESPORULACIÓN Y GERMINACIÓN.

1.2.1 Esporulación de *C. difficile*.

C. difficile presenta la capacidad de formar esporas y del morfotipo de esta espora latente, variable según la cepa, va a depender su patogenia, ya que su forma vegetativa es de naturaleza anaeróbica y eso le imposibilita sobrevivir en ambientes aeróbicos (Paredes-Sabja, 2014). Por tanto, para transmitir la infección, es imprescindible la presencia de esporas capaces de tolerar el oxígeno (Deakin, 2012).

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

Durante el curso de la enfermedad se va a iniciar la secuencia de esporulación que culmina en la generación de una espora latente, permitiendo a *C. difficile* persistir en el hospedador y su diseminación al medio ambiente. Es por ello la elevada tasa de recurrencias de la infección y la elevada transmisión en ambientes hospitalarios. Las cepas incapaces de formar esporas no pueden persistir en el intestino del hospedador y ser transmitidas horizontalmente (Deakin, 2012). La desinfección ambiental del ámbito hospitalario va a resultar clave para el control de la infección (Ali, 2011). Recientemente, se ha especulado que la transmisión de las esporas podría ser también zoonótica, puesto que numerosos estudios han mostrado que esporas provenientes de cepas toxigénicas pueden encontrarse en animales domésticos (Rodríguez, 2016)

Esquemáticamente y de manera resumida el ciclo infectante o de colonización intestinal de *C. difficile* comienza con la ingestión de sus esporas, resistentes al ambiente ácido gástrico y capaces de llegar al colon. Si se dan las circunstancias adecuadas, como la presencia de sustancias germinantes y un nicho ecológico adecuado (una disrupción de la microbiota intestinal), la espora es capaz de transformarse en su forma vegetativa. Si la forma vegetativa prolifera y se asienta, se produce una cantidad de toxinas específicas que son la principal causa de la clínica, que abarca un espectro que puede ir desde una diarrea leve o moderada hasta una colitis pseudomembranosa letal. Además, durante la infección se inicia el proceso de esporulación en una subpoblación de la forma vegetativa (Koenigsknecht, 2015), produciéndose una gran cantidad de esporas que son emitidas al exterior a través de las heces (Barra-Carrasco, 2014).

En modelos murinos se ha observado qué tras la inoculación de esporas por vía oral, las primeras formas vegetativas aparecían en el colon del ratón a las 6 horas, indicando que la germinación de las esporas ocurre antes de este tiempo. A las 24 horas ya se detectaron por primera vez esporas en el colon (Koenigsknecht, 2015). Sabiendo que el proceso de la esporulación in vitro dura 9 horas, se dedujo que la esporulación comenzaría a las 15 horas después de la infección (Pereira, 2013).

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

Es importante conocer los detalles de los procesos de esporulación, germinación e interacción con superficies celulares, para poder incidir a nivel de la transmisión de la enfermedad, a nivel de la inhibición de la enfermedad. La inhibición de la esporulación puede ser un mecanismo de acción para el desarrollo de nuevas dianas terapéuticas, si bien el estudio de este proceso no se conoce al detalle.

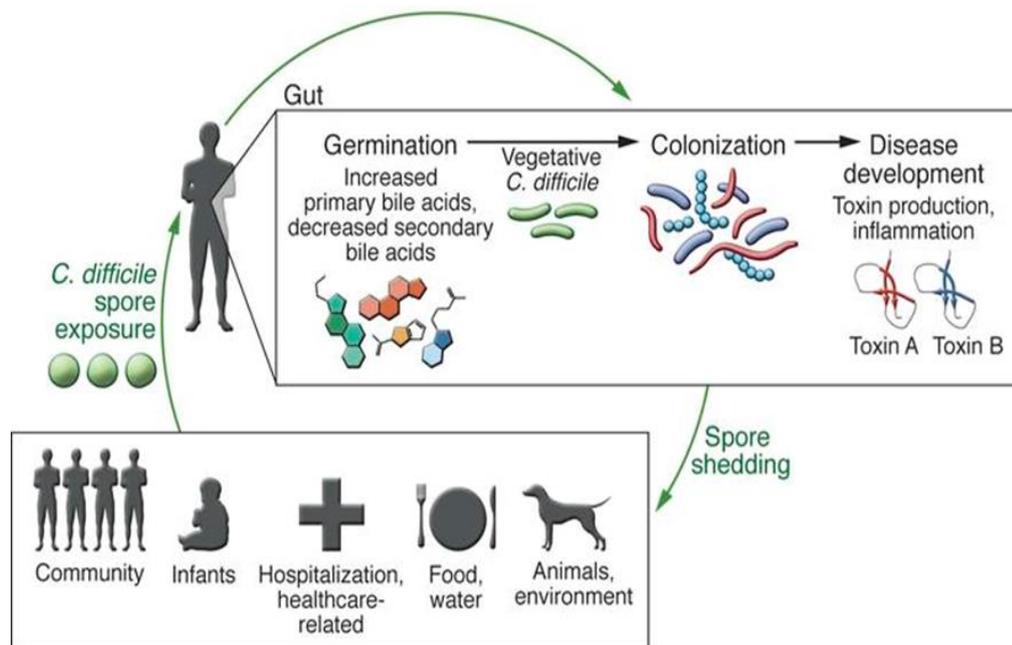


FIGURA 1: Esquema de la transmisión de la infección y ciclo vital de *C. difficile*. (Seekatz, 2014).

1.2.2 Estructura de la spora de *C. difficile*.

Las esporas de *C. difficile*, al igual que las de otros gérmenes productores, son resistentes a muchos antibióticos, incluso metronidazol o vancomicina (Rineh, 2014) y al sistema inmune del hospedador, produciendo incluso un efecto citotóxico en los macrófagos que las fagocitan (Paredes-Sabja, 2012a). Fuera del organismo, son resistentes a la mayoría de los desinfectantes usados en el ámbito

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

hospitalario, tipo alcohol o compuestos de amonio cuaternarios (Ali, 2011). Por el contrario, son sensibles al hipoclorito sódico.

La mitad de los pacientes que han padecido infección por *C. difficile* (CDI) y han sido tratados y se han recuperado, aún emiten esporas hasta 4 semanas después de la infección (Sunkesula, 2013).

Su estructura le concede una resistencia única. La parte central es el *core*, donde está contenido el ADN de la espora, así como su ARN y la mayoría de sus enzimas. Es el bajo contenido en agua lo que le confiere en parte su resistencia, además de la presencia de ácido dipicolínico quelado con calcio y la protección de su material genético mediante la saturación del ADN con proteínas α/β -SASP (Setlow, 2007).

El *core* está rodeado por la membrana interna, que tiene un contenido fosfolipídico similar al de su forma vegetativa pero una baja permeabilidad a las moléculas pequeñas, incluyendo el agua (Cowan, 2004). Esto constituye otro mecanismo de protección.

Rodeando a la membrana interna está la pared celular, que formará parte de la estructura celular de la forma vegetativa naciente, y después de esta tenemos el córtex, una gruesa capa de peptidoglicano con alguna modificación con respecto al peptidoglicano clásico que se encuentra en la pared celular del resto de bacterias. En este caso cada segundo residuo de ácido murámico ha sido transformado en ácido murámico- δ -lactamo. Estos residuos durante el proceso de germinación son reconocidos específicamente por enzimas líticos que hidrolizan el córtex, pero no la pared celular (Paredes-Sabja, 2011).

El córtex está rodeado por una membrana externa, derivada de la célula madre de la que proviene, que es clave en el proceso de formación de la espora, pero que no le confiere resistencia. Después está la cubierta, de naturaleza proteica, que le confiere protección frente agentes oxidantes y enzimas. Por último, como capa más externa tenemos el exosporium, también de naturaleza proteica.

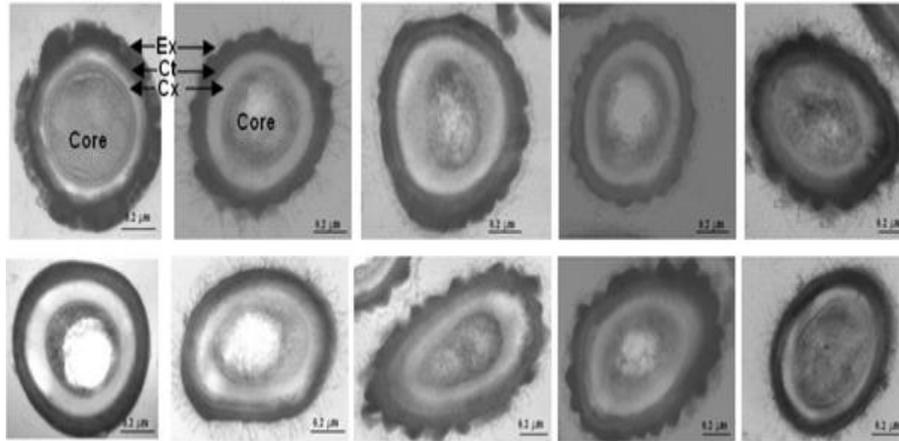


FIGURA 2: Microfotografías de cortes finos de secciones de diversas cepas de esporas de *C. difficile*. (Paredes-Sabja, 2014).

El exosporium tiene la capacidad de interactuar de forma muy eficaz con receptores de las células intestinales epiteliales, pero su rol en la infección todavía no está bien descrito (Paredes-Sabja, 2012b). Su morfología es dependiente del tipo de cepa, pudiendo tener que ver en la virulencia de éstas (Paredes-Sabja, 2014). Se ha visto incluso que algunas cepas no poseen exosporium. Presenta unos filamentos que tienen función de adherencia sobre la célula intestinal epitelial (Paredes-Sabja, 2012b). También se sabe que es rico en la proteína CdeC (*cysteine-rich exosporium protein*), con capacidad de unirse a anticuerpos, siendo esencial para el correcto ensamblaje. Además, confiere a la spora resistencia al etanol, al calor y la lisozima (Barra-Carrasco, 2013). Tiene la particularidad, a diferencia de *Bacillus subtilis*, que está en contacto directo con la cubierta, es decir, no existe una zona interespacial entre ellos.

1.2.3 Formación de la spora de *C. difficile*.

Los mecanismos moleculares que inician el proceso de esporulación no están bien establecidos. El limitado conocimiento está basado en comparaciones con otras bacterias formadoras de esporas como *B. subtilis* (Fimlaid, 2013). Aun así, hay diferencias sustanciales con este paradigma. De hecho, solo el 25% de las proteínas de la cubierta de la spora de *C. difficile* y *B. subtilis* son homólogas, lo

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

que dificulta realizar extrapolaciones (Henriques, 2007). Como en otros *Clostridium*, el inicio de este proceso está regulado por varias histidina quininas (CD1352, CD1492, CD1579, CD1949 y CD2492), las cuales, a partir de ciertos estímulos ambientales, presentan la capacidad de fosforilar el gen regulador transcripcional Spo0A. Spo0A es el elemento regulador maestro que desencadena los cambios morfogénicos precisos para que comience la esporulación. En estudios *in vivo* se ha visto que las histidina quininas a las 4 horas después de la infección ya no están sobreexpresadas, permaneciendo constantes durante la infección o bien estando solo sobreexpresadas durante las 4 primeras horas (Janoir, 2013). El mecanismo mediante el cual fosforilan a Spo0A es desconocido, a diferencia de lo que ocurre en *B. subtilis*. La regulación del proceso de esporulación es debida a una secuencia de reacciones de activación de los factores sigma de la ARN polimerasa, específicos del proceso de esporulación: σF , σE , σG y σK . Si bien estos factores también coinciden en *B. subtilis* y podría pensarse que actúan de forma igual en *C. difficile*, hay diferencias notables en las funciones de cada uno de ellos. Al contrario que en *B. subtilis*, σF es necesario para la activación post traduccional de σK , σE es indispensable para la activación de σG , σG es indispensable para la activación de σK y σK no sufre ninguna activación proteolítica (Fimlaid, 2013). Además, la activación de los factores sigma durante la fase de esporulación de *C. difficile* no está regida por las mismas señales morfológicas que se observan en *B. subtilis* y tampoco siguen el mismo patrón temporal (Fimlaid, 2013).

En *B. subtilis* la formación de las esporas comienza en la transición de la fase de crecimiento exponencial a la fase estacionaria (estadio 0). En este punto la expresión génica prima dar soporte a la esporulación más que al crecimiento vegetativo. El estadio 0 se establece cuando se produce la activación post traduccional del factor de transcripción Spo0A, el cual estimula la sobreexpresión de genes relacionados con la esporulación y sirve como elemento regulador de la esporulación. En *C. difficile* el proceso es el mismo, pero no así lo que lo inicia, ya que, en este caso, como hemos visto, se debe a la fosforilación del Spo0A por varias histidina quininas y posiblemente por otros factores.

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

Como en la mayoría de las bacterias formadoras de esporas, el primer evento morfológico es la formación y aparición de un septum polar, que da lugar a una pequeña protoespora y a una célula madre todavía más grande. Después le sigue el aprisionamiento de la protoespora por parte de la célula madre, que también promueve la formación del córtex, cubierta y exosporium, hasta dar lugar a la espora latente. Se sabe que el gen SpoIVA es esencial para conseguir la localización de la cubierta rodeando la protoespora, siendo no necesario para la formación del córtex, como en *B. subtilis* (Putnam, 2013).

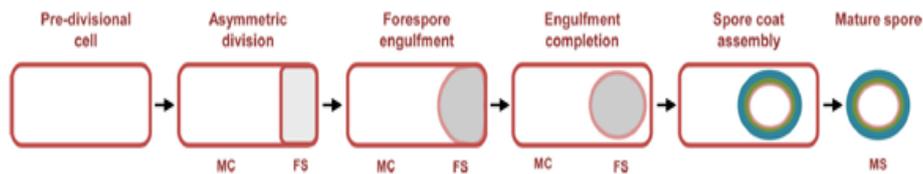


FIGURA 3: Principales estadios morfológicos de la esporulación. Abreviaciones: MC, Célula Madre; FS, Protoespora. (Paredes-Sabja, 2014).

1.2.4 Germinación de *C. difficile*.

La germinación de las esporas de *C. difficile* fue evidenciada hace más de 30 años, cuando se demostró que el ácido biliar taurocólico era un potencial germinante *in vivo* (Wilson, 1985). El siguiente hallazgo importante que se evidenció hace 10 años fue que los ácidos biliares derivados del ácido cólico eran activadores de la germinación cuando se combinaban con glicina u otros aminoácidos cogermiñantes, mientras que los derivados del ácido quenodesoxicólico son inhibidores de forma competitiva de la germinación (Sorg, 2008). Esto se complementó con otro estudio del mismo autor en el que se comprobó que el ácido taurocólico era el germinante derivado del ácido cólico más potente y rápido, pero, sin embargo, la afinidad de la espora era mayor por el ácido quenodesoxicólico (Sorg, 2010).

El estudio de la germinación de las esporas de *C. difficile*, su mecanismo de activación, la cascada de reacciones que se producen y los factores que la afectan es clave para estudiar su posible modulación e inhibición y para comprender el

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

efecto de la microbiota intestinal sobre ella. Además, como en la esporulación, existe una variabilidad de activación de la germinación dependiente de la cepa.

1.2.4.1 Regulación de la germinación de las esporas de *C. difficile*.

La germinación de las esporas de *C. difficile* comienza cuando los germinantes se unen a sus receptores específicos (Paredes-Sabja, 2014). Al igual que con el estudio de la esporulación, el conocimiento del mecanismo de germinación se ha obtenido por extrapolación con otras bacterias de género *Bacillus* y otros Clostridiales. Aun así, existen aspectos que todavía hoy se desconocen y se siguen investigando. También, como en la esporulación, existen diferencias en puntos críticos, lo que convierte su mecanismo de germinación en único.

La unión de los germinantes a su receptor específico provoca una serie de sucesos como la salida masiva del dipicolinato cálcico desde el *core*, la hidrólisis del córtex y la hidratación del *core* (Paredes-Sabja, 2014).

La mayoría de las bacterias formadoras de esporas presentan receptores sensibles a aminoácidos germinantes en la membrana interna como GerAA, GerAB y GerAC. *C. difficile* carece de estos receptores (Paredes-Sabja, 2011). En lugar de ello, utiliza una pseudoproteasa tipo subtilisina CspC, que es un receptor no convencional sensible a ácidos biliares derivados del ácido cólico como el ácido taurocólico (Francis, 2013), mediante un mecanismo en parte desconocido. Así mismo, la glicina sirve como cogermiante, es decir, potencia la germinación también mediante un mecanismo desconocido (Sorg, 2008).

Para proceder a realizar la proteólisis del córtex, *C. difficile* utiliza la hidrolasa SleC (Buns, 2010), pero a diferencia de *B. subtilis*, que utiliza dos hidrolasas redundantes, SleB y Cwij, ésta es activada mediante proteólisis previa ya que se encuentra de forma inactiva como el zimógeno Pro-SleC en las esporas maduras (Adams, 2013). En *B. subtilis* la activación de las hidrolasas del córtex ocurre con la salida del dipicolinato cálcico desde el *core*, que se produce como consecuencia de la unión del germinante a su receptor. El proceso de salida del

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

dipicolinato cálcico del *core* en las esporas de *C. difficile* ocurre de forma similar a *B. subtilis*, con la unión de los germinantes a su receptor (Francis, 2009), pero previamente debe activarse la hidrólisis del córtex (Wang, 2015). En dicho proceso de salida del dipicolinato cálcico intervienen spoVAC, spoVAD, y spoVAE (Donnelly, 2016). Sabiendo que en *B. subtilis*, SpoVAC tiene propiedades mecanosensibles, se ha propuesto que la degradación previa del córtex podría permitir la apertura de canales o poros, mediante la expansión de SpoVAC en respuesta a la disminuida presión osmótica del exterior con respecto al *core* (Francis, 2016). Este mecanismo implicaría que no intervienen otros factores. Incluso si en el ambiente exterior donde la spora está germinando existiera una osmolaridad mayor o igual que la del *core* podría verse afectada la salida de dipicolinato cálcico, pero no la hidrólisis del córtex.

Como hemos visto, SleC experimenta proteólisis por unas proteasas de la familia CsP, pero a diferencia de *B. subtilis*, en *C. difficile*, CspC y CspA son pseudoproteasas, es decir su capacidad catalítica no es completa. Por otra parte, CspB se fusiona a un dominio catalíticamente inactivo de CspA, aunque esta fusión CspBA experimenta un procesado interdominio durante la formación de la spora (Adams, 2013). No se conoce con exactitud el papel de CspA en la germinación, pero recientemente se ha evidenciado que regula los niveles del receptor germinante CspC en esporas maduras, y que la proteasa YabG libera a CspB del dominio CspA (Kevorkian, 2016). La actividad de la proteasa CspB está controlada por la pseudoproteasa CspC (Francis, 2015). De forma general todas estas proteasas juegan un papel clave en el proceso de germinación.

Recientemente se ha puesto de manifiesto el papel del calcio intestinal en el mecanismo de germinación, que podría explicar que los pacientes con absorción intestinal de calcio ineficiente, debido a déficit de vitamina D o al uso prolongado de fármacos inhibidores de la bomba de protones, tengan mayor predisposición a la enfermedad por *C. difficile* (Kochan, 2017). En un modelo murino se puso de manifiesto que el calcio es capaz de activar CspB y este puede ser de origen endógeno o exógeno. El calcio endógeno saliente desde el *core* en respuesta al ácido taurocólico conjugado con la glicina puede servir como señal de germinación al activar la hidrólisis del córtex, de manera que se ha propuesto que

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

in vivo, la germinación podría ocurrir debido al efecto sinérgico de la glicina, los ácidos biliares y el calcio. El efecto de la glicina sería facilitar la salida del calcio desde el *core*. De esta manera la germinación requiere calcio, que podría ser proporcionado desde el exterior de la espora o bien desde el interior. Por tanto, restringir el calcio libre intestinal podría ser una nueva diana terapéutica o profiláctica, para tratar o prevenir la infección por *C. difficile*.

También se ha propuesto una ruta de germinación espontánea, pero en recientes estudios se ha evidenciado que su frecuencia es muy variable, y se desconoce los factores que la modulan (Kevorkian, 2017). La germinación espontánea es un mecanismo común en las bacterias formadoras de esporas, pero dada la especial naturaleza anaerobia estricta de *C. difficile*, es fácil pensar que sea prácticamente inexistente, por cuestiones de optimización de la viabilidad.

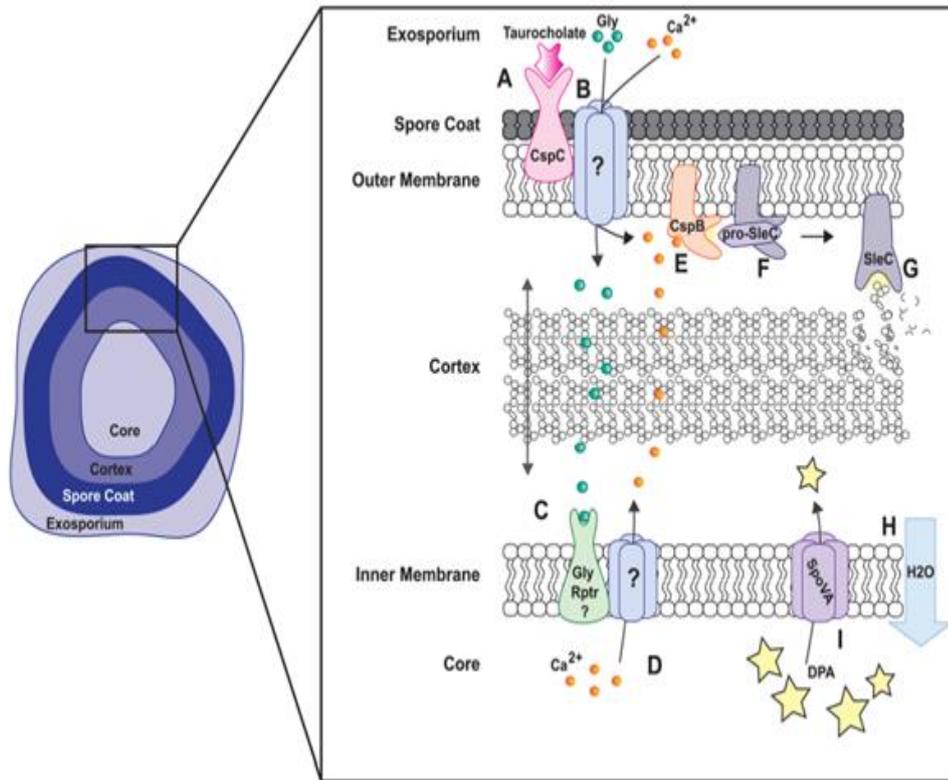


FIGURA 4: Esquema del proceso de germinación de las esporas de *C. difficile*. (Kochan, 2017).

1.2.4.2 Germinación de *C. difficile* y su relación con el metabolismo de los ácidos biliares en el hospedador.

Los ácidos biliares son los germinantes de las esporas de *C. difficile* y su presencia en el tracto intestinal juega un papel clave en su colonización y patogénesis. Los ácidos biliares derivan del colesterol y son sintetizados en el hígado. Los ácidos biliares primarios son el ácido cólico y quenodesoxicólico, que después son conjugados con taurina o glicina. Son secretados en el duodeno en respuesta a la ingesta y la mayor parte (95%) son reabsorbidos en el íleo terminal y devueltos al hígado mediante la circulación enterohepática. Los ácidos biliares primarios que llegan al intestino grueso (5%), son biotransformados en ácidos biliares secundarios mediante enzimas secretados por la microbiota intestinal de forma específica, interviniendo dos tipos de reacciones, desconjugación y

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

deshidroxilación. Los ácidos biliares secundarios más abundantes son el ácido desoxicólico, litocólico y ursodesoxicólico.

Las esporas de *C. difficile* requieren de forma específica ácidos biliares primarios y aminoácidos como la glicina para la germinación. Los estudios (*in vitro* e *in vivo*) muestran que la disminución de bacterias que tienen dotación enzimática para obtener ácidos biliares secundarios genera una disminución de la resistencia a la infección (Buffie, 2015). Además, los ácidos biliares secundarios inhiben también el crecimiento y la actividad y cantidad de las toxinas causantes de la clínica (Thanissery, 2017). Como en los procesos de germinación y esporulación, el proceso inhibitorio es variable en función de la cepa.

En el intestino grueso los ácidos biliares secundarios inhibidores son absorbidos a velocidades diez veces mayores que los ácidos biliares primarios germinantes, dando lugar a una abundancia de germinantes en el entorno del colon. En sujetos sanos con una microbiota intestinal normal, los ácidos biliares primarios germinantes, son rápidamente desconjugados por ciertos grupos de bacterias, reduciendo su abundancia relativa y la probabilidad de germinación de las esporas de *C. difficile* (Sarker, 2012).

En estudios donde se observa la restauración de la microbiota intestinal en pacientes con CDI antes y después a un trasplante fecal (FMT, *Fecal Microbiota Transplantation*) se ha evidenciado que la composición y cantidad de ácidos biliares son totalmente diferentes en ambas situaciones. La presencia de una carga elevada de ácidos biliares primarios y conjugados en muestras “pre FMT” sugiere su hidrólisis incompleta (Weingarden, 2014). El ácido taurocólico está muy aumentado en muestras previas al FMT y el litocólico y otros ácidos biliares secundarios muy disminuidos, y viceversa en muestras “post FMT”.

En modelos murinos, la administración de antibióticos y la posterior colonización de *C. difficile* está asociado a alteraciones en el perfil normal de los ácidos biliares intestinales, concretamente con una disminución de ácidos biliares secundarios y un aumento de ácidos biliares primarios (Theriot, 2014).

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

1.2.4.3 Impacto de los ácidos biliares secundarios provenientes de la microbiota intestinal en la resistencia a la colonización de *C. difficile*.

La microbiota intestinal aporta dos enzimas que transforman los ácidos biliares primarios germinantes de *C. difficile*; BSH (*Bile Salt Hydrolase*) y BaiCD (*Bile-acid 7 α -dehydroxylase*). BSH hidroliza los ácidos biliares conjugados en ácidos biliares libres. BaiCD es capaz de transformar los ácidos biliares primarios en secundarios. Las bacterias cuyo genoma codifique estos enzimas producirían un efecto inhibitorio sobre la germinación de las esporas de *C. difficile*. Perder estos grupos supone una pérdida de resistencia a la colonización y germinación.

La desconjugación de los ácidos biliares primarios conjugados por BSH secretada extracelularmente ocurre muy rápidamente. Estudios metagenómicos han mostrado que los tres principales *phylum* que poseen BSH son Firmicutes (30%), Bacteroidetes (14,4%) y Actinobacteria (8,9%) (Jones, 2008). Por tanto, está ampliamente distribuida en muchos géneros como *Clostridium*, *Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Enterococcus*.

Por el contrario, BaiCD se encuentra presente en escasos grupos de bacterias que representan menos del 0,025% de la microbiota intestinal normal (Winston, 2016), principalmente dentro del *phylum* Firmicutes en los géneros *Clostridium* (*Clostridium hiranonis*, *Clostridium hylemonae*, *Clostridium sordelli*, *Clostridium absonum* y *Clostridium scindens*) y *Eubacterium* (Buffie, 2015). La reacción es más compleja que la de BSH, requiriendo múltiples pasos intracelulares.

C. G. Buffie en 2015 encontró 11 grupos de bacterias que correlacionaron con una resistencia a la infección, en un estudio donde se comparó la microbiota intestinal de 12 portadores asintomáticos de *C. difficile* y 12 pacientes con CDI, en pacientes hematológicos receptores de trasplante de médula ósea que recibieron terapia antibiótica. Mediante un modelo matemático y mediante estudios metabolómicos investigaron que mecanismo inhibitorio de infección subyace. Los grupos encontrados constituyeron un 6% de la microbiota intestinal normal y principalmente estuvieron comprendidos en el *cluster Clostridium XIVa*,

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

incluyendo *C. scindens*, donde se encontró la correlación más potente. *C. scindens* sintetiza enzimas para la síntesis de ácidos biliares secundarios (BaiCD), muy poco comunes en las bacterias intestinales. Los autores concluyeron que esta vía metabólica tan rara era la que confería esta capacidad de resistencia a la infección (Buffie, 2015). También aparecieron bacterias del género *Blautia*, *Eubacterium* o *Pseudoflavonifractor*.

El género *Bacteroides* se ha puesto de manifiesto que también presenta una correlación negativa con el desarrollo de CDI, en estudios donde se observa la restauración de la microbiota intestinal en pacientes con CDI sometidos a FMT (Shahinas, 2012). En estudios *in vitro* se ha puesto de manifiesto que *Bacteroides ovatus* es capaz de inhibir el crecimiento de *C. difficile* al actuar sobre el metabolismo de los ácidos biliares (Yoon, 2017). *Bacteroides Ovatus* no expresa BaiCD pero si BSH que disminuye la reabsorción de los ácidos biliares desconjugados en el intestino delgado, de manera que puede inhibir el crecimiento de *C. difficile* y ejercer un efecto sinérgico en otras bacterias que aporten actividad BaiCD.

La disbacteriosis que se genera de forma secundaria a un tratamiento antibiótico, conduce a un descenso en el metabolismo de los ácidos biliares germinantes en el intestino grueso y a una rápida absorción de los ácidos biliares inhibidores, produciéndose un desequilibrio entre los procesos de inhibición y germinación de las esporas de *C. difficile*, aparte de una pérdida de resistencia a la colonización mediante otros mecanismos, que serán desarrollados en otros apartados. Por otra parte, se ha visto que extractos de intestino delgado de ratones no tratados con antibióticos son capaces de inducir la germinación, pero, ratones tratados con antibióticos generan una germinación de tres a diez veces más potente. También se ha evidenciado que extractos de ciego de ratones tratados con antibióticos generan una germinación treinta veces más potente (Sorg, 2010). De forma global, todas estas observaciones indican que el tratamiento antibiótico potencia la germinación de las esporas de *C. difficile* en el intestino delgado con una reducción simultánea de los niveles de ácidos biliares secundarios inhibitorios en el intestino grueso.

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

1.3 FACTORES DE VIRULENCIA DE *C. DIFFICILE*.

Debido a la particular diversidad genética de *C. difficile*, los factores de virulencia, es especial sus toxinas, son puntos básicos para comprender las manifestaciones clínicas y la severidad de la infección-

1.3.1 *C. difficile*, Diversidad Génica y Virulencia.

C. difficile es una especie que presenta una particular gran diversidad genética, lo que hace que existan más de 600 ribotipos circulantes con propiedades de virulencia de transmisibilidad y de especificidad de hospedador diferentes. Un ribotipado eficiente va a resultar esencial para su análisis epidemiológico y para asociar los diferentes subtipos sus características singulares.

Actualmente, la técnica de ribotipado basada en los diferentes patrones de bandas obtenidas al amplificar regiones intergénicas del ADNr 16S-23S de *C. difficile* (Knetsch, 2013), es la más utilizada. No obstante, el *Gold Standard* para estos estudios es el MLST (*Multilocus Sequence Typing*).

La primera descripción del genoma completo de *C. difficile* fue realizada en 2006 (Sebaihia, 2006). A continuación, mediante hibridación genómica comparada combinada con microarrays se observaron las diversidades genéticas existentes en las diferentes cepas en cuanto a especificidad de hospedador, origen filogenético o virulencia (Stabler, 2006).

Utilizando todas estas técnicas de forma combinada se ha podido comprobar que la evolución de *C. difficile* ha dado lugar a diferentes linajes evolutivos. Actualmente, se definen 6 ramas filogenéticas designadas del 1 al 5 y otra llamada C-1 (Janezic, 2015). 5 ramas (de la 1 a la 5) presentan cepas toxigénicas y en 3 de ellas (1, 4 y 5) se combinan con cepas no toxigénicas. La rama C-1 solo presenta cepas no toxigénicas.

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

Dichas ramas filogenéticas correlacionan exactamente con los diferentes ribotipos existentes. La rama 1 es el grupo más heterogéneo. Pertenecen a esta rama ribotipos como el 001, 012 y 014, siendo el 014 y el 001 el primero y segundo más prevalentes en Europa y el 012 el octavo (Bauer, 2011). La rama 2 presenta al ribotipo 027, un ribotipo hipervirulento de reciente aparición, que ha causado diferentes brotes con gran severidad sobre todo en Estados Unidos, Canadá y Reino Unido. Dentro de la rama 3 el ribotipo más prevalente es el 023, un ribotipo que expresa la toxina binaria CDT y que es de los 15 ribotipos más prevalentes en Europa (Bauer, 2011). La rama 4 también es conocida como rama A-B+ e incluye al ribotipo 017, de los más predominantes en Asia y también presente en Europa (Bauer, 2011). La rama 5 contiene al ribotipo 078 que desde hace pocos años se ha demostrado que causa CDI en humanos cuando históricamente siempre se había encontrado en animales. La rama C-1 solo contiene ribotipos no toxigénicos.

1.3.2 Toxinas y Virulencia.

1.3.2.1 Estructura y mecanismo de acción de las toxinas TcdA y TcdB de *C. difficile*

La producción de las exotoxinas TcdA y TcdB son el mayor factor de virulencia que presenta de *C. difficile*. TcdA y TcdB pertenecen a la familia de las toxinas LCT (*Large Clostridial Toxins*), un grupo de proteínas homologas de alto peso molecular que incluye las toxinas hemorrágicas de *Clostridium sordellii* (TcsL y TcsH), la α toxina de *Clostridium novyi* (Tcn α) y la citotoxina de *Clostridium perfringens* (TpeL). TcdA y TcdB tienen una similitud del 66% en cuanto a sus aminoácidos, lo que sugiere que pueden provenir de una duplicación génica (Von Eichel-Streiber, 1992). Comparten múltiples dominios conservados, incluyendo un dominio catalítico glucosiltransferasa localizado en el extremo N-terminal, y un dominio cisteína proteasa que es requerido para su autoproteólisis y posterior liberación del anterior dominio catalítico al citosol en las células infectadas. Además, presenta un dominio hidrofóbico que actúa en la formación del poro y la introducción posterior de las toxinas en la membrana endosomal previamente a su salida al citosol. El extremo C-terminal consiste en una serie de repeticiones de oligopéptidos (CROPS, *Combined Repetitive Oligopeptides*) que interactúan con

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

receptores no identificados de las células diana (Awat, 2014). Estos dominios se encuadran en dos subunidades A y B. La subunidad A está constituida por el dominio glicosiltransferasa N-terminal, mientras que la subunidad B por el dominio CROPS, el dominio cisteína proteasa y el dominio hidrofóbico formador de poros.



FIGURA 5: Dominios proteicos funcionales y estructurales de TcdA y TcdB. (Chandrasekaran, 2017).

Los efectos de la intoxicación de las células diana con TcdA y TcdB ha sido explicada mediante el modelo ABCD (*A: Biological, B: Binding, C: Cutting, D: Delivery*). El primer paso es el reconocimiento y unión del extremo C-terminal a las células diana. Esto se ha asociado a la intervención del dominio CROPS del extremo C-terminal para TcdB, pero los receptores de las células intestinales no han sido identificados para la toxina TcdA. Para TcdB recientemente se ha identificado al CSPG4 (Condroitín Sulfato Proteglicano 4) (Yuan, 2015) y la nectina 3 (LaFrance, 2015) como receptores, aunque este último se une a TcdB mediante un dominio distinto al CROPS. La nectina 3 se expresa en la superficie del epitelio del colon pero CSPG4 no. Por contra, está muy expresado en los miofibroblastos subepiteliales. Durante la infección es probable que TcdB interactúe con la nectina 3 para intoxicar el epitelio del colon y después, al dañarse las uniones intercelulares, pueda tener acceso a CSPG4 de los miofibroblastos subepiteliales intestinales más profundos.

El proceso de reconocimiento desencadena la endocitosis de las toxinas mediante un mecanismo no establecido, clatrina y dinamina-dependiente, que permite la internalización de las toxinas a endosomas de la célula diana. La dinamina es una GTPasa que facilita la escisión y salida de las nuevas estructuras endosómicas desde la membrana plasmática al citosol. No obstante, TcdB usa preferentemente la ruta de la clatrina para internalizarse en forma de vesículas

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

(Chandrasekaran, 2017). Por tanto, a pesar de su homología, TcdB y TcdA usan vías de internalización y reconocimiento presumiblemente diferentes. La acidificación de los endosomas genera cambios conformacionales en las toxinas conduciendo a la formación previa de una protrusión, que termina en la formación de poros en la membrana del endosoma, debido a la exposición de regiones hidrofóbicas.

Las toxinas liberadas al citosol, a través del poro formado, se unen al INP6 (inositol hexafosfato), el cual induce otro cambio conformacional en las toxinas en el dominio cisteína proteasa que conduce a un autoprosesado catalítico en una región situada entre este dominio y el glicosiltransferasa. Este paso produce que se descubra la forma activa del dominio N-terminal glicosiltransferasa en el citosol de la célula diana. Aunque TcdA y TcdB comparten el mismo mecanismo de activación INP6-dependiente, la escisión no es equivalente entre ambas puesto que TcdB resulta es más sensible que TcdA *in vitro* (Kreimeyer, 2011). Es importante recalcar que la modulación de este autoprosesado puede afectar a la virulencia de las toxinas en la célula diana. No obstante, en cepas mutantes con autoprosesado deficientes, TcdA y TcdB aún pueden inhibir las GPTasas y causar daños citopáticos, aunque con una cinética más lenta (Kreimeyer, 2011)

El domino glicosiltransferasa N-terminal supone forma activa de TcdA y TcdB. Es capaz de inactiva a varias proteínas citosólicas GTPasas de la familia Rho, entre ellas RhoA, B, C, G, Rac1-3 y Cdc42, mediante un mecanismo de transferencia covalente de un fragmento de glucosa. Esto genera una inactivación de estas GTPasas, que afecta a varias rutas celulares de forma dramática, que conlleva a la pérdida de la integridad celular debido a la desregulación de la polimerización de la actina, impidiendo que se formen los niveles adecuados de actina F, lo que conlleva que la célula afectada presente un fenotipo característico que precede a su apoptosis. La muerte celular del colonocito afecta a las uniones intercelulares en el epitelio intestinal, generando un aumento de la permeabilidad intestinal y una acumulación de fluido en la luz intestinal que se manifiesta en forma de diarrea, principal signo de la CDI (Awad, 2014).

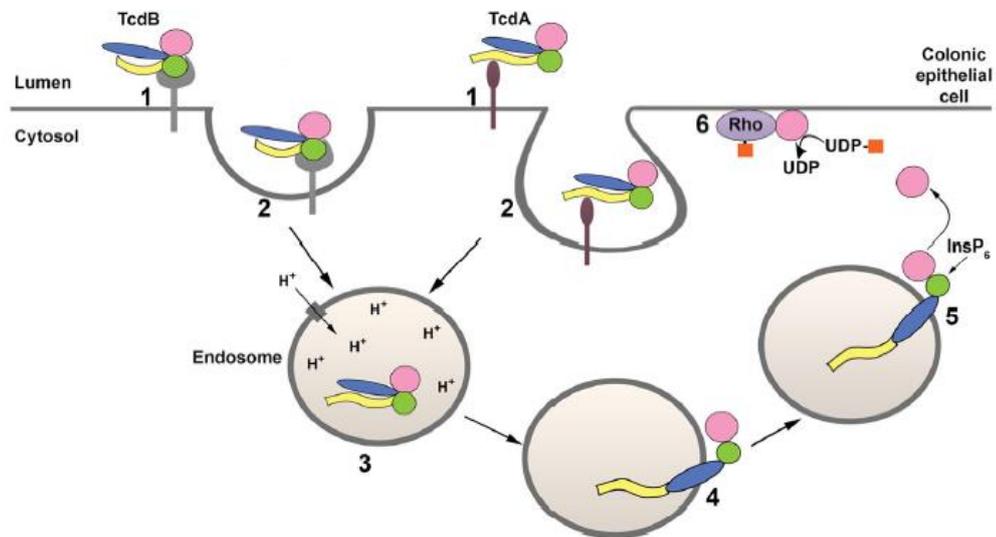


FIGURA 6: Mecanismo de acción de las toxinas de *C. difficile* esquematizado. (Chandrasekaran, 2017).

1.3.2.2 Expresión y genética de las toxinas *TcdA* y *TcdB* de *C. difficile*.

Los genes *tcdA* y *tcdB* que codifican estas toxinas *TcdA* y *TcdB* se encuentran en la región 19.6 KB del cromosoma bacteriano, llamado Locus de Patogenicidad o PaLoc (Braun, 1996). En cepas no toxigénicas PaLoc es reemplazado por una secuencia no codificante de entre 75 y 115 nucleótidos de función desconocida (Braun, 1996). Se ha puesto en evidencia que PaLoc puede ser transferido desde cepas toxigénicas a no toxigénicas mediante mecanismos de transferencia horizontal de genes (Brouwer, 2013). PaLoc también codifica 3 proteínas accesorias cuya función es regular la producción de las toxinas o su transporte extracelular:

- *TcdR*: Juega un papel clave en la expresión de los genes *tcdA* y *tcdB* y otros genes PaLoc (Mani, 2001). Además, es capaz de autorregular positivamente su propia expresión.
- *TcdC*: Es un factor anti-sigma que modula la expresión de *tcdA* y *tcdB* al bloquear la asociación del *TcdR* y la ARN polimerasa (Carter, 2001). Por tanto, regula negativamente la expresión de las toxinas.

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

- TcdE: Actúa a nivel del transporte de TcdA y TcdB desde la célula al exterior. Muestra homología con el grupo de *Bacteriophage Holin Proteins* que participa en la salida de fagos desde la bacteria que los contiene. TcdA y TcdB no presentan señales de reconocimiento de secreción y no es necesaria la lisis celular (Mukherjee,2002). Esto ha conducido a formular la hipótesis de que existe una ruta de secreción de las toxinas no clásica en la que participen las *Holin Proteins*.

La expresión de las toxinas se produce al entrar el microorganismo en la fase estacionaria de crecimiento, supuestamente debida a la limitación de nutrientes. La expresión génica está en equilibrio bidireccional siendo influenciada por varios factores de tipo ambiental como son la temperatura (una temperatura de 37°C es estimuladora), concentraciones subinhibitorias de ciertos antibióticos, ácidos grasos de cadena corta como el ácido butírico (activadores), fuentes de carbono rápidamente metabolizables (la glucosa del microambiente local inhibe la producción de toxinas), algunos aminoácidos (prolina y serina son inhibidores mediante la vía de regulación transcripcional global CodY) y finalmente, por último se ha visto que los factores que regulan la motilidad y la esporulación también modulan la producción toxigénica (Apartado 1.2 “Ciclo vital de *C. difficile*: Esportulación y Germinación”). El butanol y la biotina son sustancias inhibitoras (Chandrasekaran, 2017; Aktories, 2017).

Pueden darse cambios en la región codificante de las toxinas de PaLoc como inserciones, deleciones y mutaciones puntuales que conforman una heterogeneidad genética, dando lugar a una serie de diferentes toxinotipos. Esto supone que haya cepas con diferente actividad y especificidad de sus toxinas con respecto a la cepa de referencia VPI 10463 de *C. difficile*. Las deleciones en *tcdA* se encuentran ampliamente en el dominio CROPS debido a recombinación entre secuencias repetitivas, las cuales están muy conservadas en *tcdA* pero no así en *tcdB*, donde predominan las mutaciones puntuales. Éstas normalmente ocurren en regiones catalíticas y en el dominio CROPS. Las inserciones se suelen producir en las regiones catalíticas de *tcdA*, y son debidas al elemento móvil ISTon el cual es cortado por el ARNm y por tanto, no afecta a la actividad de TcdA (Rupnik, 2016).

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

Las cepas sin diferencias con respecto a la cepa de referencia VPI 10463 se definen como del toxinotipo 0. Las que presentan diferencias en los genes *tcdA* y *tcdB* se distribuyen en 34 toxinotipos restantes. Su estudio se realiza mediante técnicas moleculares de fragmentos de restricción más posterior amplificación por PCR. Se usan 3 fragmentos de restricción en ambos genes *tcdA* y *tcdB*: A1-A3 y B1-B3. Se categorizan en toxinotipos mayores o menores con respecto a sus diferencias con respecto al toxinotipo 0. Los toxinotipos menores tienen solo cambios en una parte del gen, principalmente deleciones en la región A3 o bien mutaciones puntuales en B1, como ocurre en el toxinotipo XII. Los toxinotipos mayores tienen cambios en ambos genes y pueden estar en cualquiera de los fragmentos de restricción.

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

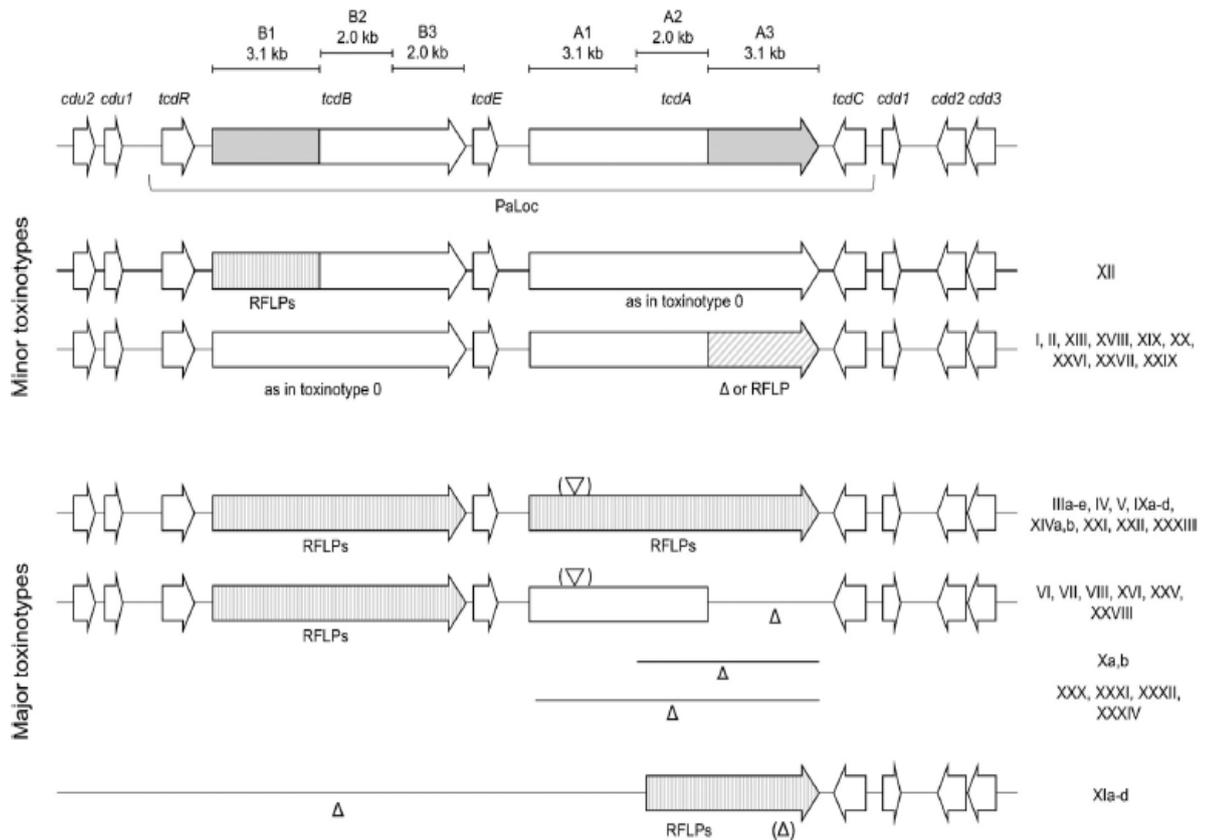


FIGURA 7: Esquema de los diferentes toxinotipos y sus diferencias con respecto a la cepa de referencia VPI 10463. (Rupnik, 2016).

La mayor parte de los toxinotipos producen ambas toxinas TcdA y TcdB. También en su mayoría son capaces de producir (al menos tienen los genes funcionales) la toxina binaria CDT (será desarrollada en apartados posteriores de este mismo epígrafe). Los toxinotipos menores no producen CDT. Siete toxinotipos tienen fenotipo A-B+ y CDT puede ser positiva o negativa. Los toxinotipos XIa al XIId conforman el único grupo con parte del PaLoc presente pero que no producen toxinas TcdA y TcdB, pero producen CDT, por tanto, su fenotipo es A-B-CDT+. El fenotipo A+B- no se detecta con las técnicas descritas de toxinotipado y no se engloba en ningún toxinotipo específico (Monot, 2015).

Los toxinotipos también pueden mostrar correlación con los diferentes ribotipos, así que el ribotipado de las cepas puede sugerir la variante genética de

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

las toxinas. Algunos ribotipos con variantes genética de sus toxinas son el 017, 019, 023, 027, 033, 078, 126, 176 y 244 (Rupnik, 2008).

Los toxinotipos aislados en humanos más prevalentes son el III (correlaciona con el ribotipo 027), IV (ribotipo 023), V (ribotipo 078/126) y VIII (ribotipo 017). En un estudio europeo del año 2008 los toxinotipos y ribotipos más frecuentes fueron 078/V, 027/III, 017/VIII, 126/V y 023/IV. Los genes para CDT se detectaron en el 23% de las cepas (Bauer, 2011).

A diferencia de la mayoría de bacterias patógenas productoras de toxinas, donde los genes que las codifican son muy estables en cuanto a sus secuencias, en *C. difficile* ocurre algo diferente. Ya hemos expuesto que se trata de una bacteria con una gran diversidad genética. Por ello, existe una alta tasa de mutación en el gen *tcdB*. Esto explicaría en parte la mayor aparición de cepas hipervirulentas. Es posible que esta variación toxinotípica conduzca a una falta de protección inmunitaria y que la población carezca de ella al exponerse a cepas con variantes de toxinas. Esto también podría ser importante a la hora de producir vacunas y anticuerpos como terapia alternativa a la convencional.

1.3.2.3 Actividad y efectos celulares e inmunológicos de las toxinas TcdA y TcdB de *C. difficile*.

TcdA y TcdB producen sus efectos tóxicos de forma sinérgica. TcdA altera la integridad del epitelio intestinal y TcdB genera los efectos tóxicos propiamente dichos. La importancia de la virulencia de TcdA ha sido cuestionado a raíz de detectar toxinotipos A-B+ que producen un espectro similar a las producidos por los toxinotipos A+B+. A destacar que las cepas A-B+ presentan una TcdB modificada que presenta homología en cuanto al dominio enzimático y especificidad de sustrato GPTasa con la toxina TcsL de *Clostridium sordellii*. Esto hace que esta TcdB modificada, al igual que TcdA, pueda modificar las Ras GTPasas, llevar a cabo la glicosilación que realiza la TcdA y, por tanto, realizar sus funciones en este tipo de cepas. Por tanto, la toxina TcdB es capaz por si sola de causar daños tóxicos (Chandrasekaran, 2017).

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

Los hallazgos clínicos básicos de la CDI, como la diarrea, enterocolitis y la inflamación generada, se explican mediante los diferentes efectos que producen las toxinas. Básicamente, inducen la muerte celular y alteran las uniones intercelulares del epitelio colónico, causando un daño directo, y por otra parte provocan una fuerte y exacerbada reacción inflamatoria intestinal. Todo esto lleva a un aumento de la permeabilidad vascular y tisular y a la secreción de fluidos a la luz intestinal. Además, la prolongación de este daño tisular y una exposición continuada de la mucosa intestinal con el sistema inmune innato y mediadores proinflamatorios contribuyen a la aparición de las pseudomembranas típicas (Aktories, 2017)

Los efectos directos los diferenciamos en citotóxicos y citopáticos. El efecto citopático se produce debido a la glicosilación de las GTPasas Rho. Esto produce una pérdida de la funcionalidad del citoesqueleto afectando a las uniones intercelulares, ya que las GTPasas son esenciales para el mantenimiento de la estructura del epitelio celular. También se afecta la progresión del ciclo celular; las toxinas TcdA y TcdB reducen la expresión de ciclina D1, la cual es necesaria para progresar a la fase G1, provocándose una parada celular en G1-S. Por otra parte, el efecto citotóxico se hace evidente a las 18-48 horas cuando se producen la muerte celular mediante un mecanismo de apoptosis, caspasa-dependiente e independiente (Chandrasekaran, 2017). También se han evidenciado efectos citotóxicos que no se deben a la glicosilación de las GTPasas Rho: TcdB es capaz de inducir una muerte celular bimodal dependiente de la concentración, ya que a bajas concentraciones provoca la glicosilación de las GTPasas, pero a concentraciones elevadas la muerte celular que produce no requiere de su actividad glicosiltransferasa. Esto es debido a que TcdB induce la producción de radicales libres (ROS, *Reactive Oxygen Species*) al actuar sobre la NADPH oxidasa de los endosomas (Chumbler, 2016). El exceso de radicales libres genera daño del ADN, peroxidación lipídica, disfunción mitocondrial y oxidación de proteínas que producen la muerte celular. La capacidad única de TcdB y no de TcdA de producir este daño más agresivo explica que las cepas salvajes A+B+ y la cepa A-B+ causen más daño tisular que la A+B-.

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

Sumándose a los efectos directos anteriores descritos, TcdA y TcdB, provocan la salida de multitud de mediadores inflamatorios desde las células epiteliales, como interleucinas que promueven la quimiotaxis de los neutrófilos hacia la mucosa colónica, como la interleucina 8 y la proteína 1 quimiotáctica de monocitos (Bobo, 2013). Esto se produce mediante la activación en las células del colon de las rutas NF- κ B y MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*). La infiltración de neutrófilos promueve la secreción de fluidos y potencia la inflamación de la mucosa y el daño generado. Además, TcdA y TcdB debido al daño tisular generado pueden acceder a la lámina propia y estimular directamente a los macrófagos y las células dendríticas y potenciar la respuesta inflamatoria, ya que estos producen más interleucinas inflamatorias como el TNF- α , IL-6, IL-8, IL-1 β , prostaglandina 2, leucotrieno B4, que producen un mayor reclutamiento de neutrófilos en la mucosa colónica (Sun, 2009). Los mastocitos intestinales y las neuronas también pueden verse afectadas. Los mastocitos se activan por TcdA y TcdB y se degranulan emitiendo más mediadores inflamatorios (Meyer, 2007). La activación de las células del sistema nervioso intestinal provoca la secreción de sustancia P, un péptido con actividad inflamatoria (Anton, 2004).

1.3.2.4 Toxina binaria CDT de *C. difficile*.

La tercera toxina de *C. difficile*, la toxina binaria o CDT fue descubierta en 1987. Hace años era muy infrecuente en cepas productoras de CDI (menos del 10%), pero en los últimos 10 años su prevalencia se ha incrementado de forma notoria (Rupnik, 2008). Esto es debido a que está frecuentemente asociada a las llamadas cepas hipervirulentas de reciente aparición (ribotipo 027 y 078 principalmente), las cuales presentan mayor tasa de mortalidad y morbilidad (Gerding, 2014). Estos ribotipos son capaces de producir CDT, junto a TcdA y TcdB y el papel de la primera en la patogénesis de estas cepas permanece en debate, puesto que además presentan otros factores de virulencia, como la resistencia de alto nivel a los fluorquinolonas y la presencia de un codón de parada en el gen *tcdC*, lo que produce una desregulación en la producción de TcdA y TcdB (Rupnik, 2008). Por tanto, la severidad que producen puede ser debida a un conjunto de causas. El estudio de las cepas hipervirulentas será

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

desarrollado en un apartado posterior más concisamente. Por otra parte, se ha publicado que estos ribotipos no tienen siempre una correlación con la severidad de la clínica, sobre todo en escenarios no epidémicos (Barbur, 2012).

CDT pertenece al grupo de las toxinas binarias, producidas por ciertas especies de *Clostridium* y *Bacillus*, entre ellos *Clostridium perfringens* (Toxina Iota), *Clostridium spiriforme* (Toxina CST), *Clostridium botulinum* (Toxina C2), *Bacillus cereus* (Toxina VIP) y *Bacillus anthracis*. Son secretadas como 2 componentes separados A y B. Se unen en la superficie de las células diana al interactuar primero el componente B. Los dos componentes por separado CDTa y CDTb, no son tóxicos de por sí y solo producen efectos en las células diana cuando se combinan entre ellos (Chandrasekaran, 2017).

CDT está codificada por 2 genes; *cdtA* y *cdtB*, localizados en la región cromosómica 6.2 kb (distinta a PaLoc), llamada Cdt locus o CdtLoc. Las cepas CDT-no toxigénicas presentan una delección de 2 kb en CdtLoc. CdtLoc presenta un tercer gen, *cdtR* el cual es un gen regulador de la familiar *LytTR*. Este gen regula positivamente la expresión de CDT, pero también las de TcdA y TcdB en cepas del ribotipo 027 (Lyon, 2016). Los estímulos ambientales que regulan la expresión de CDT no son del todo conocidos. Todas las cepas que contienen los genes *cdtA* y *cdtB* de forma completa pertenecen, bien a alguna de las variantes toxinotípicas (toxinotipos diferentes de 0), o bien a cepas no toxigénicas que no presentan PaLoc (Gerding, 2014). La razón de esta correlación es desconocida, quizás pueda deberse a que una gran proporción de cepas con el toxinotipo 0 contengan genes truncados de la toxina binaria.

No todos los toxinotipos de *C. difficile*, presentan genes de CDT, entre ellos el toxinotipo VIII, muy ampliamente distribuido, pero sí que existe una asociación con algunos ribotipos.

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

Toxin production type	Toxinotypes	Ribotypes	Molecular background of PaLoc	Epidemiologic associations
A+B+CDT+	minor types I, XXIV	ND	A+B+: no major PaLoc deletions	Toxinotype III/Ribotype 027 has been the major epidemic strain in North America since 2001 ¹² and has been epidemic in Europe. ⁸⁸ Toxinotype V/Ribotype 078 is the most common strain recovered from pigs/ calves ⁹³ and is an increasing cause of clinical CDI in the Netherlands ² ; and 3rd most prevalent in EU. ⁹¹ Ribotype 023 is among 10 most prevalent ribotypes in EU. ⁹¹
	major types III IV V VI VII IX XIV XV XXII XXIII	027, 034, 075, 080 023, 063 (058, 058) 078, 126, 045, 066 045, 063, 066 063 019 111 122 ND ND ^{4,13,80,110}		
A-B+CDT+	X	036 ¹³	TcdA: rearrangement in PaLoc and large deletion probably causing changes in regulation and low or no transcription of truncated TcdA	
	XVI, XVII, some V-like strains	ND ND ND	TcdA: mechanism unknown	
	XXX XXXI	280, 281 237 ¹¹⁸	TcdA not present	
A-B-CDT+	XIa, XIb	033 Yes ¹³	A-B-: only small non-functional part of PaLoc present	Uncommon strains found mainly in asymptomatic patients ⁷⁸
	some strains without PaLoc	ND	A-B-: no PaLoc	Uncommon strains found mainly in asymptomatic patients ⁷⁸

FIGURA 8: Correlación de los toxinotipos y ribotipos en cepas productoras de la toxina binaria CDT. (Gerding, 2014).

Para iniciar su mecanismo de acción CDTb se acopla al receptor LSR (*Lipolysis-Stimulated Lipoprotein Receptor*) que es un receptor de superficie presente en muchos tejidos incluido el colon. CDTb induce el agrupamiento y la acumulación del receptor. La acumulación del receptor unido al CDTb monómero induce la polimerización de este. Después, le sigue la unión del componente CDTa y la internalización del complejo al interior de la célula diana mediante endosomas. La posterior acidificación de los endosomas es suficiente para producir cambios conformacionales en el componente CDTb que le hace capaz de insertarse en la membrana del endosoma y formar un canal transmembrana que permite que el componente CDTa sea lanzado al citosol. CDTa es una ADP-ribosiltransferasa la cual cataliza la transferencia de la ADP-ribosa desde el NAD al residuo de arginina 177 de la Actina G monomérica (Gerding, 2014).

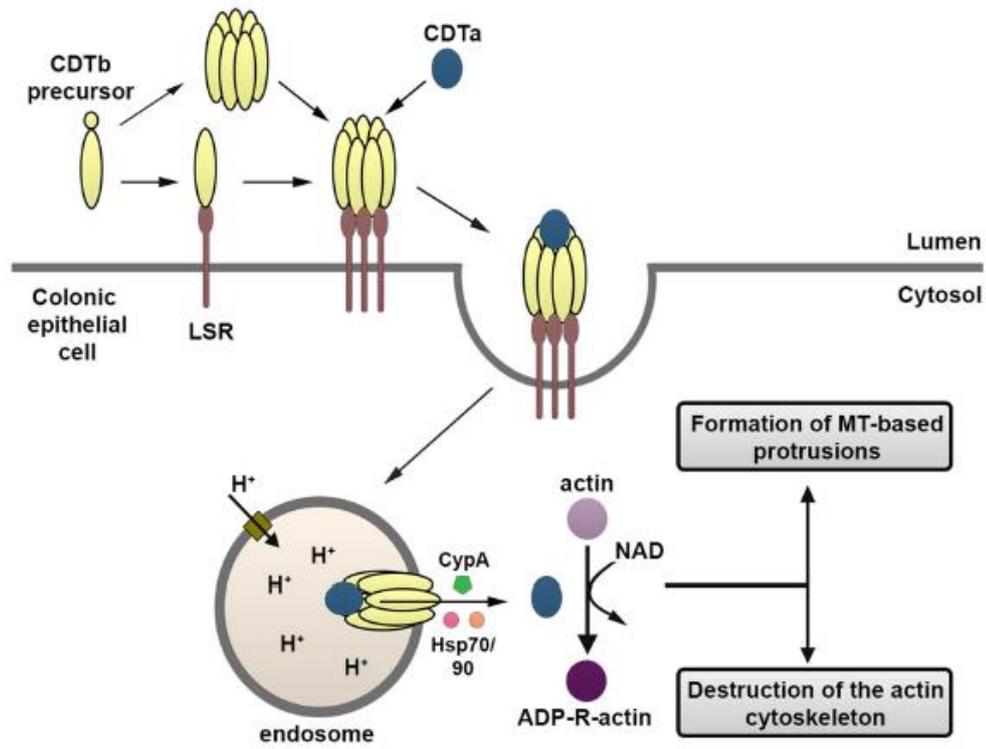


FIGURA 9: Mecanismo de acción de la toxina binaria CDT de *C. difficile*. (Chandrasekaran, 2017).

La intoxicación por CDT conduce a múltiples efectos celulares patogénicos, incluidos la pérdida de la funcionalidad del citoesqueleto, la formación de protrusiones celulares de microtúbulos, aumento de la adherencia de patógenos y un aumento de la producción de interleucinas inflamatorias y una supresión del sistema inmune innato. La ADP-ribosilación de la actina G hace que esta sea incapaz de polimerizar y además promueve la despolimerización de la actina F, dando lugar a su efecto citopático. La formación de protrusiones de microtúbulos ocurre en microdominios ricos en esfingolípidos y colesterol y también es debida a la ADP-ribosilación de la actina G. Estas protrusiones generan como una especie de red que atrapa a los *Clostridium*, provocando un aumento de la adherencia y potenciando la colonización. Con respecto a los efectos inmunológicos, CDT actúa de forma sinérgica a TcdA y TcdB en cuanto a la producción de interleucinas inflamatorias (Gerding, 2014).

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

Puesto que no existen métodos de detección de la toxina CDT en heces, el verdadero impacto de la CDT en la mortalidad y morbilidad de la CDI está probablemente infraestimado (Gerding, 2014).

1.3.3 Endosporas y virulencia.

Aunque desarrolladas en el apartado 1.2 “Ciclo vital de *C. difficile*: Esporulación y Germinación”, hemos de decir que las esporas de *C. difficile* son estructuras complejas, formados bajo el control de vías reguladoras interrelacionadas. Su capacidad para resistir en ambientes hostiles durante largos periodos de tiempo las convierte en un importante agente de transmisión en humanos y animales y contribuye a su potencial virulencia.

Existe un debate sobre la asociación de ciertos ribotipos y la eficacia en cuanto a la producción y germinación de las esporas. Algunos estudios han evidenciado que algunas cepas, sobre todo las hipervirulentas como el ribotipo 027, forman esporas con mayor eficacia y perfección que las cepas clásicas, sin embargo, otros estudios no han demostrado asociación (Burns, 2011a; Burns, 2011b)

El exosporium, la estructura más externa de la espora, se ha relacionado con la eficacia en la germinación de la misma, ya que las esporas que poseen un exosporium intacto germinan menos fácilmente que aquellas sin esta estructura más externa (Escobar-Cortes, 2013).

Como hemos visto, el regulador maestro de la esporulación en *C. difficile* es Spo0A. En estudios donde se han diseñado mutantes para Spo0A en la cepa R20291 de *C. difficile* se ha visto que el fenotipo obtenido resulta no esporogénico. El mutante era incapaz de producir la transmisión de organismo a organismo (Deakin, 2012).

Las esporas son muy resistentes en el medio hospitalario, son capaces de unirse con mucha eficacia al acero inoxidable, muy usado en estos ámbitos, pero

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

no se ha observado una correlación fuerte entre diferentes ribotipos y la capacidad de adherencia (Joshi, 2012).

Se ha evidenciado que la unión de las esporas a diferentes líneas celulares es un proceso dependiente de la hidrofobicidad. Por ejemplo, las esporas del ribotipo 002 (cepa DS1748) al ser más hidrofílicas se unen a las diferentes células con menos eficacia, no obstante, otras variaciones en la composición de la espora podrían contribuir a esta diferencia que se produce en este fenotipo (Joshi, 2012).

1.3.4 Capas superficiales y proteínas de la pared celular y virulencia.

La adherencia a las células del epitelio intestinal es un paso crucial para la colonización y posterior establecimiento de la infección. Por ejemplo, las esporas del ribotipo hipervirulento 027 se adhieren con mejor eficacia al epitelio intestinal que las del ribotipo 002, sugiriendo que la adherencia puede ser un importante factor de virulencia de *C. difficile* (Joshi, 2012).

Las capas superficiales celulares o *S-layers* son capas de naturaleza proteica que se exponen en la superficie de muchas bacterias. Consisten en monómeros idénticos de glicoproteínas. Presentan poder inmunogénico. Se ha demostrado la presencia de SLPs (*S-layer Proteins*) en *C. difficile*, pero a diferencia de otras bacterias, están constituidas por 2 subunidades proteicas: HMW (*high molecular weight*) y LMW (*low molecular weight*), que derivan del precursor polipeptídico SlpA por la acción de la proteasa Cwp84. HMW está muy conservado pero LMW presenta cierta variabilidad genética, por tanto, existe una potencial variabilidad entre las distintas cepas. HMW y LMW están unidas mediante uniones no covalentes y se piensa que son importantes en la adherencia a las células del hospedador (Awad, 2014).

Asimismo, estudios recientes han demostrado que las SLPs son importantes en el reconocimiento inmune y en la respuesta inflamatoria. SLPs aplicados sobre monocitos provocan la secreción de interleucinas inflamatorias (Bianco, 2011).

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

SLPs es la familia mejor caracterizada de CWPs (*Cell Wall Proteins*). 12 de los genes que codifican CWPs se agrupan en la región del locus *slpA*. Estudios bioinformáticos han evidenciado la diversidad génica existente en 57 cepas (Dingle, 2013). El resto de las 17 CWP locus están distribuidos por todo el genoma de *C. difficile*. Estudios bioinformáticos en 40 cepas los clasifican en 2 grupos, uno compuesto por 9 CWP locus que están conservados y un segundo grupo más variable (Biazzo, 2013).

Con respecto a estas proteínas de la pared celular, la mejor caracterizada es Cwp 84, una cisteína proteasa que participa en el remodelado de *S-Layer* y que es capaz de degradar la matriz extracelular, por tanto, puede intervenir en los procesos de diseminación durante la infección (Janoir, 2007). Otra proteína de la pared celular que interviene en la adherencia celular es Cwp66, que fue detectada mediante anticuerpos frente a las proteínas de superficie de bacterias sometidas a choque térmico, sugiriendo que podría ser una proteína de choque térmico asociada a la superficie celular (Waligora, 2001). Se ha propuesto que tenga también propiedades de adherencia. CwpV también ha sido propuesto como factor de virulencia al promover la agregación de la bacteria para facilitar la formación de biofilms en el intestino del hospedador (Reynolds, 2011).

1.3.5 Fimbrias, pilis y virulencia.

Algunas cepas de *C. difficile* presentan fimbrias de ubicación polar. Debido a que varios estudios han demostrado que cepas sin fimbrias causan CDI, su presencia parece no ser importante en la patogénesis (Taha, 2007).

La mayor parte de las bacterias del orden Clostridiales codifican genes *pilus* tipo IV. La cepa 630 de *C. difficile* presenta 9 genes de este tipo (Melville, 2013). Su poder patógeno tampoco es determinante.

1.3.6 Flagelos y virulencia.

Se conocen algunas cepas de *C. difficile* que presentan movilidad debido a la presencia de flagelos. Las dos proteínas flagelares mejor caracterizadas son FliC

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

y FliD. El poder patógeno de los flagelos permanece en debate. Parece ser un proceso cepa-dependiente. Así, en estudios epidemiológicos del ribotipo 027 se ha comprobado que la presencia de flagelos es importante para su adherencia y colonización del epitelio intestinal. No obstante, la ausencia de flagelos en cepas no epidémicas, no reduce la adherencia intestinal (Baban, 2013). A destacar la importancia de los flagelos en la formación y desarrollo de biofilms, un mecanismo que presentan algunas bacterias para optimizar la colonización cuando se ven expuestas a situaciones de *stress* ambiental (Ethapa, 2013).

1.3.7 Proteína fijadora de fibronectina y virulencia.

La fibronectina es una glicoproteína importante que interviene en la adhesión de las bacterias patógenas a las células del hospedador. Forma parte de la matriz extracelular y *C. difficile* es capaz de unirse a ella mediante la proteína fijadora de fibronectina Fbp68. El gen que la codifica está bastante conservado. Su papel en la patogenia de la CDI no está completamente explicado (Barketi-Klai, 2011). La metaloproteasa Zmp1 también es capaz de desestabilizar la fibronectina y favorecer la propagación de *C. difficile* (Cafardi, 2013).

1.3.8 Proteínas de choque térmico y virulencia.

Se ha comprobado mediante estudios *in vitro* que el choque térmico aumenta la adherencia de *C. difficile* a las células epiteliales. Este hecho ha dado pie a que se sugiriera que algunas proteínas de choque térmico como GroEl tengan importancia en la adherencia. Esta proteína solo se expresa y secreta al espacio extracelular en condiciones de *stress*. Estudios en modelos murinos han evidenciado que los anticuerpos anti-GroEl reducen la eficacia de la colonización de *C. difficile*, reforzando el papel de GroEl en la adhesión (Pechine, 2013).

1.3.9 Cepas hipervirulentas de reciente aparición.

Durante la década de los 90, *C. difficile* fue una causa importante de diarrea nosocomial, de difícil manejo, pero de mortalidad baja. A principios del siglo XXI la situación cambió radicalmente ya que muchos estudios empezaron a alertar del

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

aumento de la mortalidad que producía esta infección y de la asociación de estos casos más severos al ribotipo 027, una cepa anteriormente descrita como de escasa patogenicidad (Pépin, 2004).

El primer caso documentado fue en París en 1985 (Popoff, 1988) y el segundo en Minneapolis en 1988 (Razaq, 2007). Para observar el cambio, entre los años 2003 y 2004 Canadá tuvo brotes en más de 30 hospitales. Quebec entre 2004 y 2007 tuvo más de 20000 casos de diarrea nosocomial con una notable severidad (Labbe, 2008). Mediante estudios retrospectivos, se han obtenido datos similares en Estados Unidos durante ese periodo. Entre 2003 y 2006 dos brotes de CDI en el Stoke Mandeville Hospital de Inglaterra causaron 127 muertes. En 2007, el ribotipo 027 hipervirulento fue identificado en 16 países europeos (Kuijper, 2008). Aunque actualmente el ribotipo 027 aún persiste en Estados Unidos y Canadá hay una bajada de su frecuencia de infección, sobre todo en Europa, aunque también ya se han dado casos en otros continentes como Sudamérica y Australia.

En España, los estudios moleculares epidemiológicos de *C. difficile* son escasos y es por lo cual la importancia del ribotipo 027 es casi desconocida. El primer caso descrito y publicado fue en 2013 en el hospital Gregorio Marañón de Madrid (Marín, 2014).

La caracterización del ribotipo 027 como hipervirulento no ha estado exenta de controversia. Durante la primera década del siglo XXI, claramente se convirtió en una cepa predominante en muchas áreas geográficas, como demuestran varios estudios epidemiológicos como el realizado por la *National Ribotype-Based Surveillance Scheme* de Inglaterra (Wilcox, 2012). Se demostró una correlación entre frecuencia de CDI producida por el ribotipo 027 y el aumento de la mortalidad. En años donde la frecuencia de la cepa había aumentado, aumentaba la mortalidad y viceversa. Por ejemplo, entre 2007 y 2008 el 55% de los casos de CDI fueron producidos por el ribotipo 027 y la mortalidad fue del 29%. Entre 2009 y 2010 la frecuencia bajó a 21% y la mortalidad al 14%. Por tanto, se evidenciaba la asociación con la mortalidad y severidad de la CDI y el cambio en su epidemiología. Además, se observó que los enfermos presentaban mayor tasa de recurrencia que con otras cepas (Marsh, 2012). Pero también surgieron estudios donde, si bien se corroboraba que el ribotipo 027 se asociaba a las formas severas

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

de CDI, no es un predictor único de severidad. El recuento de leucocitos en sangre total podría ser mejor indicador de severidad de la enfermedad que el ribotipo (Walk, 2012). Por tanto, se cuestionaba la relevancia del ribotipo como predictor de severidad (Sirard, 2011). Como punto intermedio, una idea bastante aceptada hoy en día es que las ventajas que presenta el ribotipo 027, en cuanto a sus factores de virulencia, junto con otras situaciones, le han permitido penetrar en la población y reemplazar rápidamente otros ribotipos más frecuentes anteriormente.

1.3.9.1 Factores que explican la hipervirulencia del ribotipo 027.

Las razones de la asignación del ribotipo 027 como hipervirulento tampoco han sido fáciles de descifrar. Existen diferencias genómicas significativas entre las cepas hipervirulentas y clásicas, pero discernir cuales de estas diferencias son las que generan que haya cambios en la severidad de la enfermedad que producen es difícil. Aun así, se han propuesto varias explicaciones:

- Mayor producción de toxinas que las cepas clásicas (Warny, 2005): Debido a la presencia de una mutación en el gen regulador *tcdC* del PaLoc, que es un gen represor y el hecho de que este truncado, permitiría una desregulación en la producción de toxinas y una mayor expresión. Pero hay datos que ponen en duda que esta sea la causa del poder hipervirulento del ribotipo 027 ya que algunas cepas también producen cantidades anormalmente elevadas de toxinas y el gen *tcdC* está intacto (Akerlund, 2008), y algunas otras cepas con el gen *tcdC* alterado no producen grandes cantidades de toxinas (Murray, 2009).
- La toxina binaria CDT: Como se ha desarrollado en su apartado correspondiente, CDT es un factor de virulencia con acciones citopáticas e inflamatorias. En estudios en modelos murinos se ha observado que cepas con CDT presentan mejor colonización y provocan mayor daño intestinal (Schwan, 2009). El hecho de que en cepas no hipervirulentas también se produzca CDT muestra que por sí sola no se demuestra la hipervirulencia del ribotipo 027.

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

- Esporulación más eficiente que las cepas clásicas: Hay trabajos que exponen que el ribotipo 027 es capaz de producir esporas de manera más eficiente que las cepas clásicas (Merrigan, 2010) y viceversa (Burns, 2011a; Burns, 2011b).
- Variaciones toxinotípicas: Existen variaciones genéticas en las cepas clásicas e hipervirulentas (Lanis, 2010). No obstante, se ha puesto de manifiesto que la TcdB del ribotipo 027 tiene mayor poder citotóxico que las cepas clásicas (Stabler, 2009). Esta variante de TcdB es capaz de trasladarse al citosol de las células infectadas más rápidamente y el mecanismo de autoprosesado es más eficiente, ya que presenta una estructura más favorable para ello.

A pesar de la evidencia contradictoria de si el ribotipo 027 produce formas más severas de la enfermedad o no, está claro que ha emergido como una causa común de CDI de entre cientos de cepas, por tanto, podría presentar ventajas competitivas adaptativas que podrían explicar la sobrerrepresentación en los mencionados brotes. Lo mismo ha ocurrido con el ribotipo 078, típicamente encontrado anteriormente en animales, pero que ahora es de los más predominantes en las CDI asociadas a la comunidad (Bauer, 2011). Como ocurre con el ribotipo 027 también se asocia a mayor severidad (Goorhuis, 2008). La evolución desde el año 2000 hacia cepas hipervirulentas parece que se ha acelerado debido a la capacidad de *C. difficile* de alterar eficientemente sus secuencias genómicas, adquirir genes nuevos o genes truncados mediante recombinación genética.

1.4 DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR *C. DIFFICILE*.

Llegados a este punto vamos a desarrollar en que consiste el diagnóstico de la CDI y cuales son sus manifestaciones clínicas. Asimismo, mostraremos el amplio espectro clínico posible y las causas de ello.

La CDI se diagnostica por una serie de manifestaciones clínicas en combinación con una serie pruebas de laboratorio o hallazgos histopatológicos o radiológicos compatibles con la presencia de colitis pseudomembranosa

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

(McDonald 2018). La presencia de colitis pseudomembranosa evidenciada mediante endoscopia, tras colectomía o en autopsia, es suficiente para el diagnóstico, en ausencia de otra causa evidente.

A pesar de del aumento de la incidencia de la CDI, el interés por la enfermedad y la aparición de cepas hipervirulentas, en muchos casos no se diagnóstica de forma correcta o bien no se diagnóstica. En un estudio en España se ha mostrado que 2 de cada 3 casos de CDI no se diagnostican, debido a la falta de sospecha clínica, sobre todo en casos provenientes de la comunidad que no presentan los factores de riesgo clásicos, y debido a un abordaje desde el laboratorio inapropiado (Alcalá, 2012).

1.4.1 Manifestaciones clínicas.

De forma general la CDI puede cursar desde manifestaciones clínicas leves, como una diarrea leve o moderada, hasta complicaciones más graves como puede ser la colitis pseudomembranosa fulminante, megacolon tóxico e incluso muerte (Crobach, 2016). El tipo de manifestaciones clínicas que va a producir la infección va a depender del microorganismo y del estado del paciente. Del microorganismo en cuanto a la virulencia de la cepa de *C. difficile* causal, y del paciente, en cuanto a su estado inmune, comorbilidades asociadas y edad, principalmente.

El pronóstico de un paciente con CDI nos lo va a proporcionar el grado de severidad, que se clasifica en base a unos parámetros clínicos y de laboratorio. La forma leve y/o moderada de la enfermedad se define como la presencia de diarrea como único síntoma, con por lo menos 3 deposiciones o más en las últimas 24 horas (McDonald, 2018; Surawicz, 2013). En la forma severa aparece en el inicio o durante el curso de la enfermedad hipoalbuminemia (menor a 3 g/dL) y cualquiera de los siguientes signos: recuento de leucocitos totales en sangre mayor a 15.000/ μ L y/o distensión abdominal sin otros criterios de la forma complicada. En la forma complicada aparece al inicio o durante el curso de la enfermedad cualquiera de los siguientes signos o síntomas: ingreso en la unidad de cuidados intensivos, hipotensión con o sin administración requerida de

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

vasopresores, fiebre mayor o igual a 38.5°C, distensión abdominal significativa, signos de alteración en el íleo, alteración de la conciencia, recuento de leucocitos totales en sangre mayor a 35.000/ μ L o menor a 2000/ μ L, concentraciones de lactato en suero mayores a 2.2 mmol/L o cualquier tipo de signo de fallo orgánico. Los signos de alteración en el íleo incluyen náuseas agudas, vómitos, cese súbito de la diarrea (íleo paralítico) o evidencias radiológicas compatibles con tránsito intestinal alterado (Surawicz, 2013).

Los hallazgos por endoscopia varían desde la presencia de eritema a colitis pseudomembranosa. La endoscopia por rutina no está recomendada en pacientes con síntomas típicos con pruebas de laboratorio positivas. En la colitis fulminante incluso hay un riesgo serio de perforación intestinal. No obstante, puede ser útil cuando las pruebas de laboratorio son negativas y existe sospecha clínica, cuando el diagnóstico de CDI debe ser imperativo debido a la situación del paciente, y cuando no hay mejoría tras el tratamiento o bien en casos de presentaciones atípicas (Postma, 2015).



FIGURA 10: Pseudomenbranas en endoscopia. (Jawa, 2012).

La recurrencia se produciría entre las 2-8 semanas siguientes al primer tratamiento completo para erradicar la infección. Su riesgo oscila entre un 20% tras la infección inicial a un 60% tras la primera recurrencia. Es más probable con

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

la edad avanzada, en formas graves iniciales, cuando existe un uso concomitante de antibióticos (Alcalá-Hernández, 2016) y en presencia de múltiples cepas infectantes de *C. difficile* (Seekatz, 2018).

Las manifestaciones extraintestinales de la infección por *C. difficile* son muy poco comunes, produciéndose en menos del 1% de los casos. Principalmente se dan en pacientes hospitalizados sometidos a cirugías gastrointestinales que además, presentan factores de riesgo específicos para desarrollar CDI. Normalmente se trata de afecciones en la región abdominopélvica debido a perforaciones o infiltraciones. También se han descrito bacteriemias con afectación de órganos a distancia (Mattila, 2013).

La artritis reactiva postcolitis por *C. difficile* también se ha documentado, aunque escasamente se han publicado unos 50 casos. Se ha postulado que podría deberse a un proceso autoinmune postinfeccioso (Legendre, 2016).

Añadir por último que en los últimos años se ha desarrollado y validado el cuestionario *CDI-DaySyms*, con el fin de mejorar la evaluación diagnóstica de los pacientes con CDI. Se trata de un cuestionario que evalúa los síntomas de la CDI desde la perspectiva del paciente mediante una serie de ítems. Se diseñó en el año 2011, a partir de las recomendaciones de la *US Food and Drug Administration* (FDA), que desarrollaron una guía para diseñar y promover esta clase de cuestionarios (Kleinman, 2018).

1.4.2 Diagnóstico microbiológico de la infección por *C. difficile*.

Hemos de tener en cuenta que la interpretación de las pruebas de laboratorio es complicada. La evidencia de *C. difficile* en heces no siempre supone una infección, pues podríamos tener un sujeto colonizado pero no infectado, puesto que existen individuos colonizados asintomáticos o en caso de presentar diarrea la causa no sería *C. difficile*. Este punto será desarrollado en el apartado específico de colonización por *C. difficile*. Es por lo cual que los datos y la sospecha clínica es esencial para establecer un buen diagnóstico y una selección apropiada de pacientes que a los cuales realizar las pruebas de laboratorio. Además, la

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

mayor parte de las diarreas asociadas al uso de antibióticos no se relacionan con un patógeno en concreto y existen otras bacterias patógenas que pueden causar diarrea posterior al uso de antibióticos, como *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella spp* y *Klebsiella oxytoca* (Larcombe, 2016).

Existe una variedad de pruebas de laboratorio para la detección de la CDI. Como pruebas de referencia, aunque no existe unanimidad al respecto, tenemos el Cultivo Toxigénico (TC) y el Ensayo de Citotoxicidad (CCNA, *Cell Cytotoxicity Neutralization Assay*). Siempre ha existido controversia al respecto de cual de las dos pruebas define mejor CDI. En un estudio multicéntrico del año 2013 se puso de manifiesto que los casos con CCNA positivo (demostración de presencia de la toxina libre) pero TC (demostración de la capacidad de producir toxina) negativo correlacionan con la clínica, por tanto, toda muestra con CCNA positiva representa un verdadero caso de CDI. No obstante, los casos con TC positivo pero CCNA negativo resultarían difíciles de clasificar. Podría tratarse de pacientes colonizados por cepas potencialmente productoras de toxina pero que no la están generando, por tanto, no serían pacientes con CDI, y no deberían ser tratados. No obstante, cabría la posibilidad de que la concentración de toxina libre fuera muy baja y no fuera detectada por CCNA y sí la capacidad de producir esta toxina por parte del TC, por tanto, con este punto de vista, sí que serían pacientes con CDI y por tanto deberían tratarse (Planche, 2013).

El TC consiste en el cultivo anaeróbico de muestras de heces con la posterior detección de las toxinas de *C. difficile* en los aislados del mismo. Actualmente se usan medios selectivos con sangre que llevan lisozima o ácido taurocólico para estimular la germinación. Se recomienda el pretratamiento de la muestra mediante calor o alcohol para erradicar en la medida de lo posible la microbiota intestinal contaminante del cultivo. Las colonias de *C. difficile* presentan el típico aspecto verde-grisáceo con un olor característico a “cuadra de caballo”, debido a la producción de p-cresol. También, se puede comprobar la morfología de *C. difficile* mediante tinción de Gram de las colonias. Se trata de bacilos Gram positivos con esporas en los extremos. Una vez obtenido el cultivo puro del microorganismo se detecta la toxina mediante técnicas de biología

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

molecular, ensayo de citotoxicidad o bien mediante métodos rápidos como los inmunocromatográficos (Alcalá-Hernández, 2016).

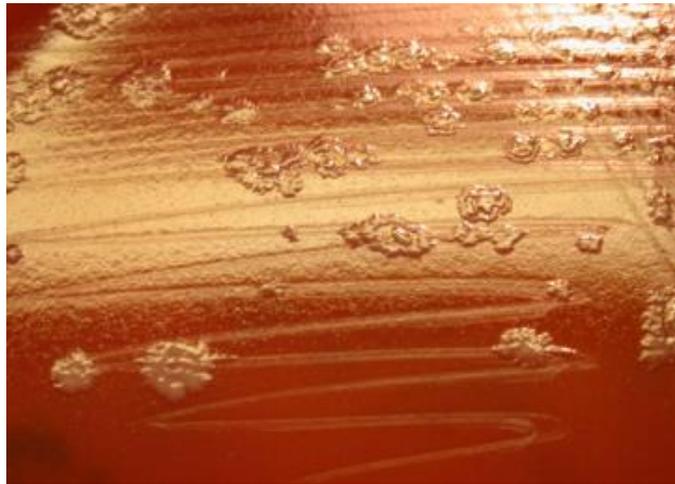


FIGURA 11: Colonias de *C. difficile*.



FIGURA 12: Tinción de Gram de *C. difficile*.

El CCNA detecta la toxina de *C. difficile* directamente en heces. En primer lugar, se debe filtrar la muestra de heces y a continuación se aplica a una monocapa de un cultivo celular que pueden ser fibroblastos, células Hep2, células Vero, etc. A continuación, después de una incubación de 72 horas, se observa el

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

efecto citopático de la toxina en esta línea celular. Para eliminar efectos citopáticos inespecíficos se añade antitoxina. Se trata de un método engorroso y carente de estandarización pero se le considera uno de los *Gold Standard* al presentar una especificidad cercana al 100% y una gran sensibilidad (McDonald, 2018).

Estas dos pruebas han sido reemplazadas en la práctica asistencial por métodos de detección de la toxina directamente en heces o bien, por métodos moleculares de amplificación de los genes que codifican las toxinas u otros genes específicos de *C. difficile*.

La detección de la toxina libre en heces es una prueba rápida de inmunoanálisis que usa anticuerpos monoclonales o policlonales y de la cual existen múltiples ensayos comerciales. Se suelen usar técnicas cromatográficas o de enzimoimmunoanálisis con lectura final mediante espectrofotometría. La especificidad y sensibilidad de esta prueba es variable, en función del método seleccionado, pero en los últimos años ha habido una mejora de sus especificaciones analíticas (Crobach, 2016).

La detección de la Glutamato Deshidrogenasa (GDH) en heces es otra prueba rápida, normalmente inmunocromatográfica, que detecta este enzima, que se presenta en elevadas concentraciones en aislados de *C. difficile*. La GDH es producida por cepas toxigénicas y no toxigénicas, por tanto, es una prueba de elevada sensibilidad, pero poca especificidad, y que debe ser combinada con otras (McDonald, 2018).

Otra prueba cada vez más instaurada en la práctica asistencial, debido a su incorporación a algoritmos diagnósticos multinivel, es la amplificación mediante PCR de los genes codificantes de las toxinas A y B (tcdA y tcdB) de *C. difficile* (NAATs, *Nucleic Acid Amplification Test*). Son pruebas relativamente rápidas que duran entre 45 y 180 minutos. También existen cada vez más métodos comerciales bastante automatizados.

En un metanálisis realizado por la *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* en el año 2016 para confeccionar sus recomendaciones para

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

el diagnóstico de la infección por *C. difficile*, se comparó la sensibilidad y especificidad de las pruebas rápidas de detección de toxinas y GDH en heces y de NAATs, con las dos pruebas de referencia TC y CCNA (Crobach, 2016). Al comparar con respecto a CCNA, la sensibilidad abarco desde 0.80 hasta 0.99 para la GDH, de 0.44 hasta 0.99 para TcdA y TcdB, y de 0.83 a 1.00 para NAATs. La especificidad varió entre 0.82 y 0.95 para la GDH, entre 0.87 y 1.00 para TcdA y TcdB, y entre 0.87 y 0.98 para NAATs. Con respecto a TC, la sensibilidad abarcó desde 0.83 hasta 1.00 para la GDH, de 0.29 hasta 0.86 para TcdA y TcdB, y de 0.77 a 1.00 para NAATs. La especificidad varió entre 0.88 y 1.00 para la GDH, entre 0.91 y 1.00 para las TcdA y TcdB, y entre 0.83 y 1.00 para NAATs. De este estudio se dedujo que la detección de toxinas en heces es la prueba más específica, mientras que la detección de GDH y el método NAATs son las más sensibles.

La *Infectious Diseases Society of America* y la *Society for Healthcare Epidemiology of America* en sus recomendaciones establecen que es preferible utilizar un algoritmo multinivel, utilizando la detección en heces de las toxinas más la de GDH, sumándole o no a estas la NAATs, o bien utilizando NAATs más la detección de toxina en heces, como mejor método diagnóstico de laboratorio para detectar pacientes con elevado riesgo de padecer CDI clínicamente significativa (McDonald, 2018). No recomienda realizar NAATs únicamente como lo establece la guía clínica del *American Journal of Gastroenterology* (Surawicz, 2013) en vez de algoritmos multinivel, ya que considera que tiene más eficacia diagnóstica que la detección de la toxina junto con la detección de GDH en heces como prueba inicial. La *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* también considera que no se debe usar un único método diagnóstico y que se deben combinar en algoritmos diagnósticos multinivel (Crobach, 2016).

Algunos de los algoritmos diagnósticos propuestos, aprovechando las mejores cualidades diagnósticas de los diferentes métodos, son los siguientes:

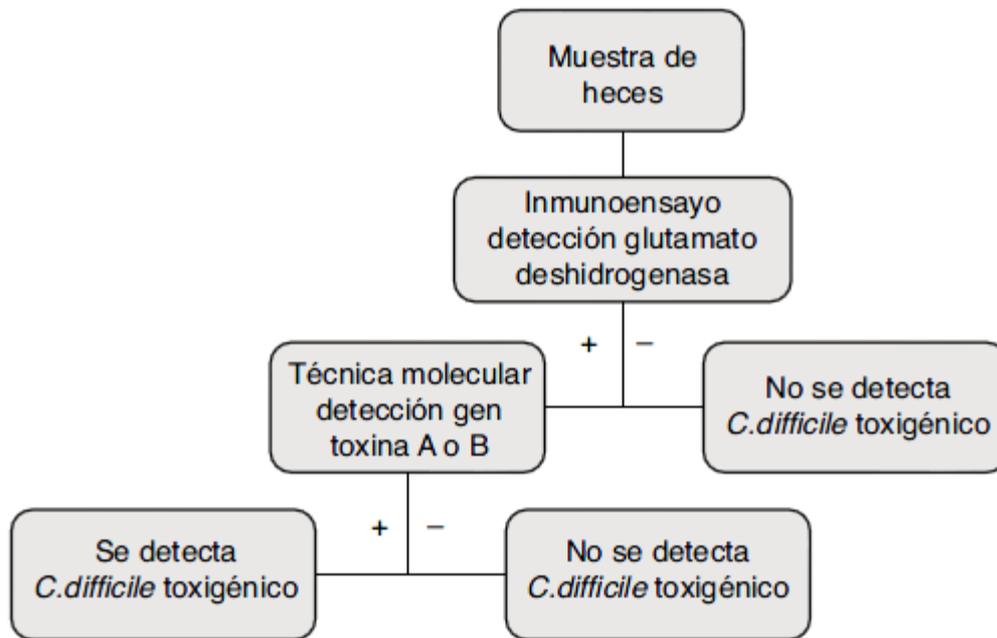


FIGURA 13: Algoritmo diagnóstico de la CDI en 2 pasos. (Alcalá-Hernández, 2016).

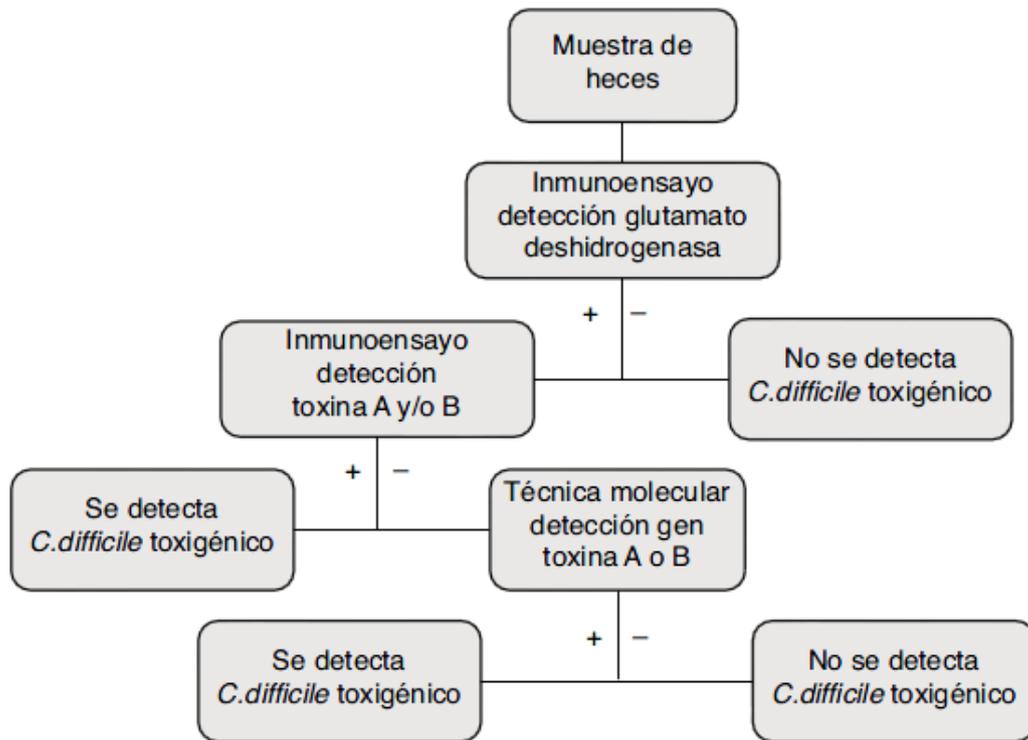


FIGURA 14: Algoritmo diagnóstico de la CDI en 3 pasos. (Alcalá-Hernández, 2016).

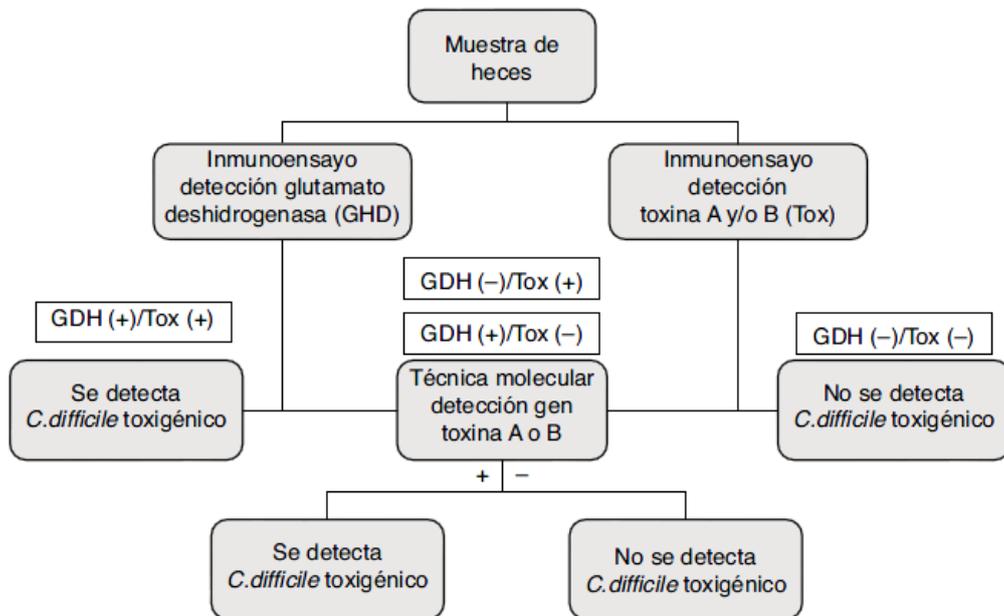


FIGURA 15: Algoritmo diagnóstico de la CDI multinivel. (Alcalá-Hernández, 2016).

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

En el algoritmo de dos pasos se comienza con la GDH que si es negativa ya establecemos que no existe *C. difficile* toxigénico. Si es positiva utilizamos el método NAAT que si es negativo también establecemos que no existe *C. difficile* toxigénico, pero que si es positivo establecemos que existe *C. difficile* toxigénico. Por tanto, está basado en la GDH y en NAAT.

El algoritmo de tres pasos también comienza con la GDH que si es negativa también establecemos que no existe *C. difficile* toxigénico ya que es una prueba muy sensible. Si es positiva realizamos la prueba rápida de detección de toxinas en heces. Si es positiva establecemos que ya existe *C. difficile* toxigénico, pero si es negativo realizamos NAAT. Si NAAT es negativo descartamos *C. difficile* toxigénico pero si es positivo lo confirmamos. Por tanto, se considera presencia de *C. difficile* toxigénico cuando se da GDH positivo y toxina positiva en heces o cuando se da GDH positivo y NAATs positivo.

El algoritmo multinivel comienza con la detección simultánea de GDH y toxinas en heces. Si ambas pruebas son positivas se establece que ya existe *C. difficile* toxigénico, y si ambas son negativas se descarta. Cuando hay resultados discrepantes se realizan ya técnicas moleculares NAATs, que si son positivas confirman estos casos. De los casos discrepantes el de GDH positiva toxinas negativas es mucho más común que el contrario. Del segundo (toxinas positivas, GDH negativo) cabría esperar que NAAT fuera negativo y que la positividad de las toxinas fuera un falso positivo.

En el trabajo multicéntrico de Planche del 2013 con 12420 muestras de heces se validó que los algoritmos que usan NAATs y detección de toxinas en heces, y los que usan GDH y la detección de toxinas son los mejores para el diagnóstico microbiológico de la CDI (Planche, 2013).

Otro aspecto importante en el que coinciden las principales guías clínicas de diagnóstico de CDI (*European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Infectious Diseases Society of America, Society for Healthcare Epidemiology of America* y la guía del *American Journal of Gastroenterology*) es que no se debe repetir una prueba positiva en heces para el control de la erradicación. En caso de querer

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

repetir una prueba negativa, al utilizar técnicas muy sensibles, se debe esperar al menos una semana si todavía existe clínica compatible. Solo en casos de sospecha de recurrencia a las semanas del episodio se deberán repetir las pruebas positivas.

Las principales guías también coinciden en que la población a la que se le debe solicitar las pruebas de diagnóstico CDI, debe ser la de aquellos pacientes que presentan 3 o más heces líquidas o semilíquidas (Escala 5-7 Bristol) en las últimas 24 horas. Existen unos factores de riesgo que serán desarrollados en otros apartados, como el uso de antibióticos, la estancia hospitalaria prolongada, edad avanzada, presencia de comorbilidades, etc. Hay que tener en cuenta que se deben descartar causas subyacentes como el uso de laxantes, quimioterapia, enfermedad de Crohn, que podrían confundir, puesto que podríamos tener concomitantemente una colonización de *C. difficile* y confundirla con una infección por *C. difficile* responsable de la clínica. Se deben rechazar muestras de heces sólidas y provenientes de pacientes que han tomado laxantes en las últimas 48 horas. No se deben solicitar a pacientes asintomáticos en ningún caso (McDonald, 2018).

Las muestras de heces se deben conservar a 2-8°C si no se van a procesar en 24-72 horas y deben recogerse sin medio de transporte. El laboratorio debe realizar estas pruebas al menos una vez al día, aunque es recomendable tenerla como prueba urgente disponible 24 horas (Alcalá-Hernández, 2016).

La guía de *Infectious Diseases Society of America, Society for Healthcare Epidemiology of America* es la única que incorpora consideraciones para pacientes pediátricos. En neonatos debido a la alta tasa de colonización de *C. difficile* nunca se deben realizar estas pruebas de diagnóstico microbiológico. En casos de niños entre 1 y 2 años no debe realizarse de forma rutinaria el estudio. Solo en casos de clínica compatible donde se han descartado otras causas de diarrea sería procedente. En niños mayores de 2 años se recomienda realizar el diagnóstico microbiológico en casos de diarrea prolongada y presencia de factores de riesgo tales como la exposición a ambientes hospitalarios o el uso prolongado de antibióticos (McDonald, 2018).

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

1.5 RESPUESTA INMUNE DURANTE LA INFECCIÓN DE *C. DIFFICILE*.

Un aspecto clave es desglosar y exponer la respuesta inmune global que se establece entre *C. difficile* y el hospedador infectado. De esa manera, la respuesta inmune global durante CDI no está completamente dilucidada puesto que existen evidencias que demuestran tanto efectos protectores como efectos que finalmente resultan patogénicos, como hemos visto en el apartado 1.3.2.3 “*Actividad y efectos celulares e inmunológicos de las toxinas TcdA y TcdB de C. difficile*”. Este efecto dual de la respuesta inmune, junto con el mecanismo de resistencia a la colonización de *C. difficile* que proporciona una microbiota normal, demuestra la importancia de la relación entre las bacterias comensales intestinales y la respuesta inflamatoria del hospedador durante la infección.

1.5.1 Respuesta inmune protectora y patogénica durante la infección de *C. difficile*.

Se han realizado diversos estudios que demuestran que una respuesta inflamatoria intacta es beneficiosa para combatir y resolver la infección de *C. difficile*. Se ha visto en modelos animales que la ausencia de una respuesta inmune completa es perjudicial para el hospedador. Se ha visto, por ejemplo, que ratones infectados por *C. difficile* sin capacidad de movilizar sus neutrófilos en el intestino presentaron mayor mortalidad que los controles (Hasegawa, 2011). Asimismo, la leptina, una hormona asociada con la regulación de la respuesta inmune innata y adaptativa, provocó el aumento de la erradicación de *C. difficile*, en modelos murinos, y esto se correspondió con un aumento de mediadores inflamatorios (Madan, 2014). También, las células linfoides innatas (ILCs) han sido identificadas como células importantes en la resolución de la infección al producir IFN γ , una interleucina proinflamatoria (Abt, 2015). Otra interleucina proinflamatoria, la IL-22, ha sido asociada a mayor supervivencia a la CDI en ratones, ya que actuó promoviendo la fagocitosis bacteriana dependiente de complemento (Hasegawa, 2014). Todos estos ejemplos mostrarían la importancia de una correcta respuesta inmune para combatir la CDI.

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

Mientras que el reclutamiento de neutrófilos resulta clave para combatir la CDI, también se ha evidenciado que estas células pueden exacerbar la severidad de la enfermedad debido a efectos colaterales indeseables que ocasionan daños tisulares y la formación de las pseudomembranas intestinales típicas. Ya hemos visto que, junto a los efectos citopáticos y citotóxicos, TcdA y TcdB, provocan la secreción de mediadores inflamatorios desde las células epiteliales como la interleucina IL-8 y la proteína 1 quimiotáctica de monocitos, que promueven la quimiotaxis de los neutrófilos hacia la mucosa colónica (Bobo, 2013). La infiltración de neutrófilos promueve la secreción de fluidos y potencia la inflamación de la mucosa y el daño generado. Además, TcdA y TcdB debido al daño tisular generado pueden acceder a la lámina propia y estimular directamente a los macrófagos y las células dendríticas y potenciar la respuesta inflamatoria, ya que estos producen más interleucinas inflamatorias como el TNF- α , IL-6, IL-8, IL-1 β , prostaglandina 2, leucotrieno B4, que producen un mayor reclutamiento de neutrófilos (Sun, 2009). Además, algunos estudios evidencian que a través de efectos mediados por la IL-23, las toxinas TcdA y TcdB son capaces de inclinar el balance inmune hacia una respuesta inflamatoria exacerbada que conduce a una clínica severa (Cowardin, 2015). Otros estudios muestran que la leucocitosis, como indicador de respuesta inflamatoria sistémica, correlaciona con la severidad de la enfermedad y con un peor pronóstico en pacientes hospitalizados con diarrea (Bulusu, 2000). A este respecto, se ha asociado peor recuperación en pacientes hospitalizados con niveles elevados de CXCL5 e IL-8, mediadores inflamatorios cuya función es reclutar neutrófilos en el intestino. Además, en este estudio, la carga de *C. difficile* no se asoció con la peor recuperación (El Feghaly, 2013). Asimismo, un polimorfismo en el gen que codifica a la IL-8 que da lugar a una sobreexpresión de esta se asoció a una elevada tasa de recurrencia, apoyando la hipótesis que una inflamación sobredimensionada es un mecanismo que provoca mayor severidad durante la infección (Garey, 2010). Otras evidencias sobre la inducción de otros mediadores inflamatorios que aumentan la severidad de la infección se encontraron en estudios en modelos murinos que investigaron el papel de la IL-23, que también tiene acción en el reclutamiento de neutrófilos intestinales (Buonomo, 2013). Un esquema más amplio de las interacciones hospedador-patógeno que ocurren durante la CDI puede observarse en la siguiente figura:

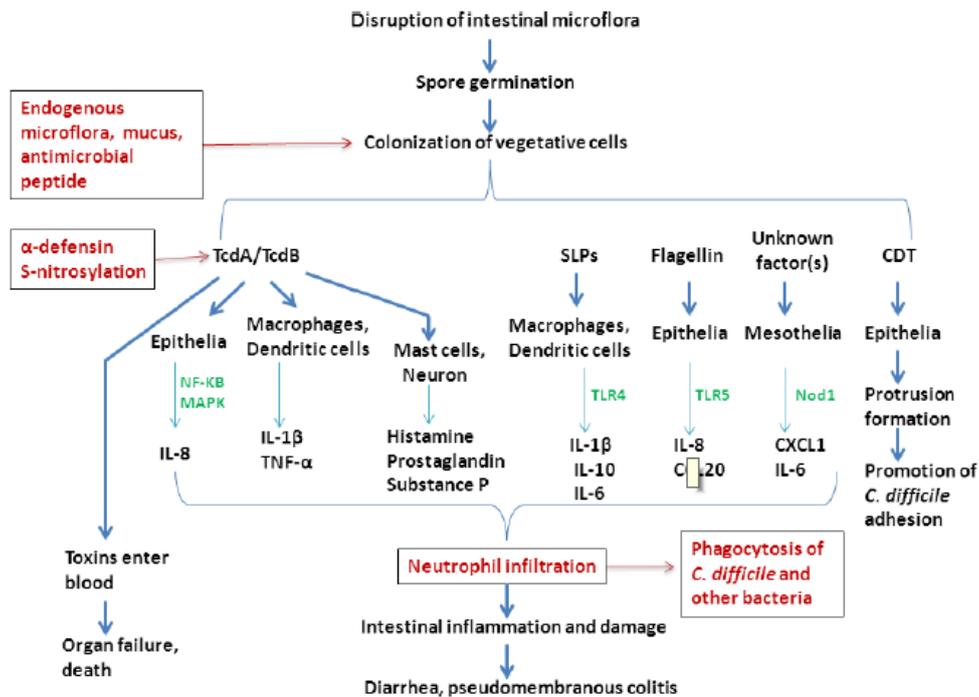


FIGURA 16: Interacciones Hospedador-*C. difficile* que provocan las respuestas inmunes innatas. Los mecanismos de defensa están en rojo. La infiltración de neutrófilos puede conducir a provocar daño tisular pero también a fagocitar *C. difficile*. SLPs (*S-layer proteins*). CDT (Toxina binaria *C. difficile*). MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*). TLR4 (*Toll-like receptor 4*). TLR5 (*Toll-like receptor 5*). Nod1 (*Nucleotide-binding oligomerization domain 1*). (Sun, 2015).

Por tanto, viendo las evidencias a favor o en contra de uno de los dos papeles de la respuesta inmune, protector o patógeno, durante la infección por *C. difficile*, es probable que la respuesta inmune sea polifacética y pueda adoptar los dos roles. La clave está en mantener un balance inflamatorio adecuado para combatir la infección limitando los efectos colaterales como los daños tisulares. Lo que resulta claro es que el grado de severidad de la clínica producida por la infección de *C. difficile* gira entorno a la intensidad y el tipo de respuesta inmune obtenida (Buonomo, 2016).

1.5.2 Papel de la microbiota en la respuesta inmune y su relación en la infección de *C. difficile*.

La interrelación entre la microbiota y el epitelio intestinal juega un papel importante en el modelaje de la respuesta inmune. Una prueba de ello es que los ratones *germ-free* (ratones con tracto intestinal no colonizado por bacterias) tienen poco desarrollada la respuesta inmune innata y adaptativa (Belkaid, 2014).

Las alteraciones en la composición de la microbiota pueden provocar cambios en la reactividad de las células inmunes y esto puede contribuir en la severidad de la infección de *C. difficile*. Por tanto, el enfoque es el contrario al del apartado anterior donde se enumeraba como el sistema inmune puede influenciar en la severidad de la CDI.

La influencia de la microbiota en el sistema inmune ocurre a través moléculas señal de origen bacteriano que interactúan con células del intestino. Algunas de éstas son la flagelina o las proteínas *S-layer* (proteínas de la superficie celular bacteriana) que actúan sobre los PRRs (*Pattern Recognition Receptors*) de las células inmunes y epiteliales. Estas señales son capaces de influir en el repertorio de células inmunes presentes en la lámina propia y en su funcionalidad. Una clase de PRRs son los TLRs (*Toll-like Receptors*) que reconocen específicamente señales de *C. difficile* y contribuyen al inicio de la respuesta inmune del hospedador al producir, por ejemplo, CXCL1, una interleucina responsable de la infiltración de neutrófilos en la lámina propia del colon (Sansonetti, 2007). En este caso el TLR implicado es el MyD88. Otros ejemplos son El TLR 4 que reconoce proteínas *S-layer* y el TLR 5 que reconoce la flagelina (Sun, 2015).

Por tanto, una reducción de la diversidad de la microbiota intestinal puede dar lugar a una respuesta inmune desequilibrada en el intestino que provoque un aumento de la severidad de la CDI, puesto que estas señales microbianas pueden influir e inducir a una población de linfocitos T reguladores en el colon (Lathrop, 2011). Esta regulación es a través de los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), productos provenientes de la fermentación bacteriana (principalmente) y de la dieta, que genera una reducción de linfocitos T 17. Los linfocitos T 17 activados

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

estimulan la granulopoesis y el reclutamiento de neutrófilos en el lugar de infección, por tanto, estos procesos se verían amortiguados (Arpaia, 2013). Por ello, la composición y riqueza de la microbiota es clave para mantener un correcto equilibrio entre la respuesta inmune proinflamatoria o reguladora, es decir, para que no se produzca una disrupción entre la homeostasis entre los linfocitos T reguladores y los linfocitos T 17.

Por otra parte, la microbiota intestinal también actúa a nivel de la capa mucosa, al influir sobre la regulación de la expresión del gen muc2, uno de sus componentes principales. La inducción de formación de capa mucosa reduciría la inflamación al crear una barrera física entre la luz intestinal y el epitelio, y provoca que las células dendríticas activen su capacidad reguladora de la respuesta inmune (Shan, 2013).

El tratamiento antibiótico también produce un ambiente proinflamatorio intestinal ya que aumenta la traslocación bacteriana. Esto provoca un aumento de algunas interleucinas inflamatorias como el IFN γ o la IL-17 por los nódulos mesentéricos linfoides (Knoop, 2015). Por tanto, el tratamiento antibiótico previo, que es un hallazgo común en la CDI provoca, una disrupción de la microbiota normal que permite la colonización de la bacteria, y por otra parte permite el fenómeno de traslocación bacteriana con la consecuente inmune desequilibrada.

Asimismo, la microbiota intestinal también induce a las células plasmáticas productoras de IgA, principal inmunoglobulina presente en las mucosas, actuando a nivel de la barrera intestinal en su mantenimiento y protección de microorganismos. Esto ha quedado evidenciado en los ratones *germ free* que tienen niveles muy bajos de IgA (Macpherson, 2013). Además, existen reducciones de las respuestas de las células plasmáticas, linfocitos B y disminución de la IgA en pacientes con CDI y los niveles más bajos se dan en los casos más severos (Johal, 2004). También, se ha visto que pacientes con recurrencias de CDI comparados con aquellos que no recaen presentan anticuerpos en suero frente a TcdA y TcdB muy bajos. Por tanto, la respuesta inmune humoral es otro mecanismo por el cual la relación microbiota-sistema inmune influye en la severidad de la CDI.

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

1.6 FACTORES DE RIESGO PARA LA INFECCIÓN DE *CLOSTRIDIUM DIFFICILE*.

1.6.1 Factores de riesgo para la infección de *C. difficile* durante la hospitalización.

Los principales factores de riesgo asociados a la CDI hospitalaria, son la edad avanzada, que a su vez se asocia potencialmente a una mayor severidad de la enfermedad de base y la presencia de mayores comorbilidades, y la duración de la hospitalización (McDonald, 2006). El incremento diario en el riesgo de padecer CDI durante una hospitalización ya nos sugiere que la misma hospitalización es representativa de la duración y el grado de exposición a la bacteria, probabilidad de exposición a antibióticos y severidad de la enfermedad de base subyacente (Loo, 2011).

La exposición a antibióticos es el factor de riesgo modificable más importante. Cualquier antibiótico se asocia con CDI, pero las cefalosporinas de tercera y cuarta generación, carbapenems, fluorquinolonas y la clindamicina presentan un elevado riesgo (Hensgens, 2012; Pépin, 2005; Johnson, 1999). La exposición a estos antibióticos produce principalmente, aunque también por otros mecanismos explicados en el apartado 1.5.2 “*Papel de la microbiota en la respuesta inmune y su relación en la infección de C. difficile*”, una disrupción de la microbiota intestinal normal, que hace que merme la resistencia a la colonización a *C. difficile* ya que esta bacteria encuentra un nicho ecológico más apropiado para proliferar. El riesgo relativo a la exposición a antibióticos y su asociación con la CDI depende de la prevalencia local de los ribotipos circulantes y de si son particularmente virulentos o bien resistentes al antibiótico administrado. La perturbación de la microbiota en estos casos es de larga duración. El riesgo de CDI aparece al iniciar el tratamiento y durante los 3 meses posteriores a la finalización de la terapia, aunque el mayor riesgo dentro de este periodo (entre 7 y diez veces más) ocurre durante el primer mes posterior a la administración antibiótica (Pépin, 2005). No obstante, una sola dosis, por ejemplo, en una profilaxis antibiótica quirúrgica, ya provoca que ese paciente tenga un mayor riesgo de una colonización o infección de *C. difficile*. El número de antibióticos y los días de exposición también influyen

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

en el desarrollo de CDI. El uso de varios antibióticos provoca mayor riesgo y se ha visto que la incidencia de la CDI aumenta con el número de antibióticos prescritos (Thibault, 1991). Es por ello esto que en la guía de de práctica clínica para la infección *C. difficile* en adultos y niños del año 2017 de la *Infectious Diseases Society of America* (IDSA) y la *Society for Healthcare Epidemiology of America* (SHEA), se hace referencia al uso de antibióticos para el control de la CDI y se recomienda que se debe minimizar la frecuencia y la duración de la terapia de antibióticos de alta riesgo y, en general, el número de antibióticos prescritos. También se recomienda que exista una política bien establecida sobre el uso de antibióticos y que la selección de éstos debería hacerse conforme a la epidemiología local y la cepa predominante de *C. difficile*, y que debería plantearse restringir el uso de fluorquinolonas, cefalosporinas y clindamicina, excepto en la profilaxis antibiótica quirúrgica (McDonald, 2018). Por tanto, para un mayor control de la diseminación de la infección o colonización de *C. difficile* es un proceso crítico evitar tratamientos antibióticos innecesarios, minimizar su duración e implementar políticas de uso.

La quimioterapia para el cáncer es otro factor de riesgo, ya que ciertos antitumorales tienen en parte actividad antibiótica. También es debido a sus efectos inmunosupresores que generan neutropenia (Morales Chamorro, 2005). Otra causa de inmunosupresión a la que se asocia la CDI es el VIH. Estos pacientes presentan mayor riesgo por la misma inmunodeficiencia, pero también por la posible exposición a antibióticos reiterada y a una exposición continuada a ambientes hospitalarios (Sánchez, 2005). También el uso de corticoides supone un factor de riesgo por la inmunosupresión. (Surawicz, 2013).

Otros factores de riesgo descritos hace algunos años son la cirugía gastrointestinal y la manipulación del tracto gastrointestinal (Thibault, 1991). De hecho, en la guía del *American Colleague of Gastroenterology* del año 2013 sobre diagnóstico, prevención y tratamiento de la infección de *C. difficile*, se reconocen ciertas situaciones comórbidas que generan un aumento en el riesgo de padecer CDI como la ileostomía y colectomía. También hace especial mención a los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad hepática crónica, receptores de trasplante de órganos, pacientes con hipogamaglobulinemia y

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

mujeres embarazadas y durante el periodo periparto (Surawicz, 2013). Con respecto a los pacientes hospitalizados con enfermedad inflamatoria intestinal esta guía recomienda el estudio microbiológico de la CDI cuando haya clínica compatible. El diagnóstico en estos casos es difícil porque la clínica de un brote de enfermedad inflamatoria intestinal y CDI es indistinguible. Además, los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal tienen una mayor tasa de colonización de *C. difficile*. Son especialmente propensos debido a la inflamación colónica preexistente con colitis ulcerativa incluso y la terapia inmunosupresiva con corticoides.

Con respecto a los medicamentos antiácidos o protectores de estómago, como los inhibidores de la bomba de protones existe una controversia sobre si su uso es o no un factor de riesgo. En las guías de práctica clínica para la infección *C. difficile* en adultos y niños del año 2017 de la IDSAy SHEA, aparece como recomendación que, si bien existe una asociación epidemiológica entre estos medicamentos y la CDI y todo caso que exista de uso innecesario de inhibidores de la bomba de protones debe ser discontinuado, no hay suficientes evidencias de que cesar el tratamiento con estos fármacos supone una manera de prevenir la CDI (McDonald, 2018).

1.6.2 Factores de riesgo para la infección de *C. difficile* adquirida en la comunidad.

A principios del siglo XXI, junto con el cambio en la epidemiología de la CDI debido a la aparición de ribotipos hipervirulentos y causantes de infecciones de mayor severidad, hubo un aumento también de casos en la comunidad que se mantiene hasta hoy (McDonald, 2018). Los factores de riesgo para estos casos no están exactamente definidos. El programa de vigilancia de CDI del *National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases* del *Centers for Disease Control and Prevention* durante los años 2009 a 2011, observó que el 82% de los casos presentaron algún tipo de exposición a ambientes hospitalarios en las últimas 12 semanas, un 64% informó de administración de antibióticos en las últimas 12 semanas y 31% informó de uso de fármacos inhibidores de la bomba de protones (Chitnis, 2013).

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

En pacientes ambulantes con enfermedad inflamatoria intestinal también existe un riesgo aumentado de CDI. Las guías IDSA y SHEA del 2017 recomiendan que, en pacientes de este tipo que desarrollan diarrea, con un estado quiescente de la enfermedad, o con la presencia de algún factor de riesgo clásico, como una reciente hospitalización o el uso de antibióticos, se realice el diagnóstico microbiológico CDI (McDonald, 2018).

Otros pacientes ambulantes con especial riesgo son los receptores de trasplantes sólidos y de médula ósea (sobre todo durante el periodo peritrasplante) y pacientes con enfermedad renal crónica y enfermedad renal terminal.

1.7 COLONIZACIÓN POR *C. DIFFICILE*.

Un grupo importante en nuestro estudio van a ser los individuos colonizados por *C. difficile*. En este apartado vamos a definir este estado de colonización, repasar su epidemiología y, lo más importante, su implicación clínica.

1.7.1 Concepto de estado de colonización por *C. difficile*.

La condición de colonización por *C. difficile* se produce cuando es detectado en heces mediante las pruebas de laboratorio desarrolladas en el apartado 1.4.2 “*Diagnóstico microbiológico de la infección por C. difficile*”, en ausencia de síntomas o signos de infección.

Aunque algún estudio ha mostrado que la detección de toxinas de *C. difficile* en heces está asociada con una mayor severidad y sintomatología (Planche, 2013), también se ha visto que la presencia de ellas por si mismas son insuficientes para establecer el diagnóstico, ya que existen pacientes donde han sido detectadas pero que no han presentado clínica (Kyne, 2000). Es por lo que la CDI se diagnostica mediante una serie de manifestaciones clínicas en combinación con pruebas de laboratorio o mediante hallazgos histopatológicos o

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

radiológicos compatibles con la colitis pseudomembranosa (McDonald 2018). Por tanto, si bien en la bibliografía al respecto a lo largo de los años se han usado diferentes denominaciones de portadores o colonizados asintomáticos de *C. difficile*, es necesario definir el concepto correctamente y con mucha exactitud:

- Colonización asintomática o estado de portador asintomático: Es la ausencia de diarrea (si está presente debe ser atribuible a otras causas diferentes a la CDI) sin hallazgos histopatológicos o radiológicos compatibles con colitis pseudomembranosa, pero con detección de *C. difficile* o de evidencia de la presencia de sus toxinas en heces (Furuya-Kanamori, 2015).

La novedad de esta definición es que los síntomas pueden surgir a partir de otras condiciones concomitantes. La diarrea afecta de forma habitual a pacientes hospitalizados y la mayor parte de veces es atribuible a condiciones no infecciosas, como puede ser efectos adversos de medicamentos o a otras enfermedades como la enfermedad inflamatoria intestinal, por ejemplo. La proporción de casos de diarrea nosocomial atribuibles a *C. difficile* se sitúa sobre el 20% (Polage, 2012), aunque este dato va a variar en función de la epidemiología local. Por tanto, la identificación de pacientes portadores asintomáticos puede ser dificultosa, ya que muchas veces la causa de la diarrea no puede ser identificada y surge la duda de si se trata de pacientes infectados o colonizados. Un ejemplo claro de esto ocurre en pacientes hospitalizados con enfermedad inflamatoria intestinal donde la propia enfermedad produce diarrea como síntoma principal y, además, se trata de una población de pacientes con una alta tasa de portadores de *C. difficile*. En estos casos siempre es muy importante valorar los factores de riesgo existentes para desarrollar CDI.

1.7.2 Epidemiología de la colonización de *C. difficile*.

La tasa de colonización asintomática de *C. difficile* varía considerablemente entre las diferentes poblaciones que se han estudiado. En niños menores de dos años la tasa de portadores es muy elevada, sobre todo en neonatos hospitalizados (McDonald, 2018), pudiendo exceder del 40%. Aunque la tasa de colonización disminuye desde el primer año de vida, es posible una detección intermitente a lo largo de la infancia (Rousseau, 2012). Desde los 2-3 años la tasa de portadores ya

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

es similar a los adultos sanos (McDonald, 2018). Esto es debido a que a esta edad la microbiota intestinal de los niños se asimila a la de los adultos y por tanto comienzan los mecanismos de resistencia a la colonización de *C. difficile*. No obstante, estudios recientes han demostrado que la tasa de colonización en niños ya mayores de 2 años podría ser hasta del 30%. Estas variaciones epidemiológicas deben considerarse en el contexto de las diferentes distribuciones de los ribotipos en los diferentes países (Furuichi, 2014).

Debido a la elevada tasa de portadores, supone un reto definir cuando en niños con diarrea se debe sospechar que la causa se debe a una infección por *C. difficile*. De hecho, la guía clínica del 2017 de la IDSA y la SHEA no recomienda el estudio microbiológico de *C. difficile* en niños menores de un año con diarrea. En niños mayores de 2 años solo debe realizarse cuando exista una alta sospecha debido a la presencia de factores de riesgo y/o enfermedades subyacentes que supongan un riesgo, como la enfermedad inflamatoria intestinal o situaciones inmunocomprometidas.

La relevancia clínica de la colonización de neonatos y niños pequeños es baja debido a la baja tasa de enfermedad en esta población (Zilberberg, 2010). Esto probablemente es debido a la ausencia o inmadurez de los receptores de las toxinas TcdA y TcdB (Crobach, 2018). Aún así, van a formar un reservorio potencial de transmisión a la población adulta. La fuente de colonización en los niños es desconocida pero lo más probable es que sea ambiental y a través de contacto persona-persona (Crobach, 2018).

En adultos sanos la tasa de colonizados por *C. difficile* puede variar entre el 4% y 15% (Crobach, 2018), aunque en ausencia de exposición a ámbitos hospitalarios puede ser menor al 2% (McDonald, 2008).

Los estudios demuestran tasas de portadores de entre el 3% al 21% en los pacientes hospitalizados. En un metanálisis del 2015 de 19 estudios realizados entre 2005 y 2015 la tasa de portadores fue 8% (Zacharioudakis, 2015). Estos pacientes van a suponer un reservorio de *C. difficile* considerable y una fuente potencial de transmisión nosocomial (Riggs, 2007; Crobach, 2018). Por supuesto,

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

el tiempo de estancia hospitalaria va a estar relacionado con la colonización debido a un mayor tiempo de exposición. No obstante, la potencial transmisión es menor en portadores asintomáticos hospitalizados que en pacientes con enfermedad activa (McFarland, 1989). Con respecto a los pacientes en cuidados intensivos, un estudio reciente ha demostrado una baja tasa de colonización del 2% de cepas toxigénicas, con lo que desaconsejan las medidas para reducir la presencia de *C. difficile* debido a la baja prevalencia, ya que resultarían poco coste-efectivas (Zhang, 2016).

Existen otras poblaciones en las que encontramos tasas de portadores elevadas. Una de ellas es la de ancianos en residencias de la tercera edad, donde la tasa de portadores varía entre el 4% y el 51%. En instituciones donde ha habido un brote previo de CDI la tasa de portadores es mayor (Crobach, 2018). Los trabajadores de instituciones sanitarias también forman un potencial reservorio *C. difficile*, con una tasa de portadores algo mayor a la de la población general, debido al contacto continuado con las esporas. Los estudios realizados demuestran mucha variabilidad en estos casos, pudiendo estar entre el 0% y el 12% (Furuya-Kanamori, 2015). Los pacientes con fibrosis quística tienen también una elevada tasa de portadores, mayor incluso que los pacientes hospitalizados, que varía entre el 8% y el 47% (Furuya-Kanamori, 2015). La causa por la cual estos pacientes presentan una elevada colonización pero desarrollan poco la enfermedad, es debida a la presencia de un transporte de electrolitos deficiente en las células epiteliales que le concede cierta protección frente a las toxinas TcdA y TcdB. Los pacientes en rehabilitación también presentan tasas de colonización mayores de lo normal, debido a la estancia hospitalaria prolongada y repetida (Furuya-Kanamori, 2015).

Un aspecto importante a la hora de valorar estas tasas de portadores mayores en algunas poblaciones, es la duración del estado de colonización, es decir, el tiempo durante el cual estos individuos permanecen asintomáticos desde el contacto con las esporas de *C. difficile* hasta que desarrollan sintomatología, o bien pasan a un estado de no colonización o erradicación. Para ello se requerirían estudios longitudinales a gran escala, pero esto no ha sido posible y la información al respecto es limitada. No obstante, se ha realizado alguna

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

aproximación mediante estudios observacionales de corto plazo (Samore, 1994). Así, se estima que el tiempo que transcurre entre la ingesta de la espora y el desarrollo de la CDI es de 1 a 2 semanas. Si esto no ocurre en este corto plazo de tiempo no suele desarrollarse la clínica (Samore, 1994). A pesar de que los datos son limitados, demuestran que la naturaleza del estado de portador suele ser transitoria y sin sintomatología, siempre y cuando no haya una exposición repetida a factores de riesgo determinantes de infección como la administración de antibióticos. Bien es cierto que existe una marcada variabilidad en la duración reportada por los diferentes estudios que seguramente tendrá relación con la exposición repetida a las esporas de *C. difficile* o bien, con reservorios de la bacteria, aspecto que no se ha investigado en los pocos trabajos sobre el tema.

Los factores de riesgo para una posible colonización, a diferencia de los determinantes para el desarrollo de la enfermedad por infección de *C. difficile*, los cuales son bien conocidos desde hace tiempo, han suscitado interés más bien de forma reciente. Es importante distinguir entre los casos provenientes de la comunidad y los provenientes de hospitalizaciones. Los estudios epidemiológicos sobre colonización en la comunidad no son muy amplios. La transmisión persona-persona es importante ya que se ha visto que pacientes colonizados en la comunidad y sus familias o personas cercanas presentan los mismos ribotipos (Kato, 2001).

Reconocer a los portadores sanos en el momento del ingreso hospitalario resultaría importante porque conforman un reservorio y podrían diseminar las esporas en este ámbito. Factores de riesgo bien conocidos de una posible colonización en el momento del ingreso serían la hospitalización reciente, diálisis crónica, terapia inmunosupresora, uso de inhibidores de la bomba de protones y la presencia de anticuerpos frente a TcdB (Crobach, 2018). El principal riesgo de todos es el contacto con ambientes hospitalarios previos y repetidos.

Los principales factores de riesgo para la colonización de *C. difficile* durante la hospitalización son alguna hospitalización previa durante los doce meses anteriores, el uso de inhibidores de la bomba de protones o antihistamínicos anti H2, quimioterapia, corticoterapia, historia previa de CDI y

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

el uso de antibióticos (Loo, 2011M; Kong, 2015), aunque en otros estudios no se ha encontrado asociación con antibioticoterapia o CDI previa (Zacharioudakis, 2015).

1.7.3 Implicación clínica de la colonización de *C. difficile*.

El aspecto más importante en el estudio de la colonización por *C. difficile* es la implicación clínica que supone. Ya hemos visto que los portadores a nivel epidemiológico suponen un reservorio potencial de infección que puede suponer un riesgo para que otros pasen a estar colonizados o bien desarrollen la enfermedad (Riggs, 2007). La otra clave resulta en saber si el hecho de estar colonizado por *C. difficile* y ser definido como portador asintomático supone una protección o bien es probable que se desarrolle progresión a CDI. La verdad es que pocos estudios han sentados claras evidencias en el papel del estado de portador asintomático en la progresión a CDI sintomática (Furuya-Kanamori, 2015). Lo que sí se ha confirmado es que las cepas toxigénicas son más prevalentes en los portadores asintomáticos que las no toxigénicas (Furuya-Kanamori, 2015).

Se ha demostrado que la colonización por *C. difficile* provoca una respuesta inmune humoral que confiere cierta protección a la progresión hacia CDI en ausencia de otros factores de riesgo. En un estudio prospectivo del *New England Journal of Medicine* en el año 2000 las concentraciones de IgG frente a TcdA fueron mayores en portadores asintomáticos en el momento de la colonización que aquellos que desarrollaron diarrea (Kyne, 2000). El mismo autor en *Lancet* en el 2001 mostró que los pacientes de esta cohorte con un solo episodio de diarrea tenían concentraciones más elevadas de IgM frente a TcdA y TcdB que aquellos con CDI recurrente (Kyne, 2001). Además, la mayoría de los niños sanos y hasta un 60% de los adultos presentan IgG e IgA frente a TcdA y TcdB detectables, incluso si *C. difficile* no es detectado (Sánchez-Hurtado, 2008). Esto último implicaría que durante la infancia se crean anticuerpos frente a *C. difficile* durante la fase de colonización asintomática (Kelly, 2011). No obstante, un punto que consideramos clave, como dijimos en el 1.3.2.2 “*Expresión y genética de las toxinas TcdA y TcdB de C. difficile*”, es que, a diferencia de la mayoría de las bacterias patógenas productoras de toxinas, donde los genes que las codifican están muy

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

conservados, en *C. difficile* no ocurre de esta manera. Existe una alta tasa de mutación en el gen *tcdB* codificante de TcdB. Es posible que esta variación toxinotípica conduzca a una falta de protección inmunitaria y que la población carezca de ella al exponerse a cepas con variantes de toxinas. Este aspecto resultaría importante a la hora de producir vacunas y anticuerpos como terapia alternativa a la convencional.

No hay evidencia de que las cepas no toxigénicas sean capaces de producir clínica. En el caso de estudios que han demostrado la presencia de cepas no toxigénicas en pacientes con CDI, el cultivo de *C. difficile* mostró que realmente había una mezcla de cepas toxigénicas y no toxigénicas, por lo cual no se asoció su presencia al desarrollo de la CDI (Natarajan, 2013). Por tanto, los pacientes con diarrea y con evidencia de presencia de cepas no toxigénicas de *C. difficile* deben ser considerados portadores asintomáticos, a no ser que haya presencia de hallazgos radiológicos o histopatológicos compatibles con colitis pseudomembranosa. También, como en el caso de las cepas toxigénicas, la colonización puede ser transitoria o permanente. Se ha sugerido que la colonización por cepas no toxigénicas puede ofrecer protección contra la infección, potenciando la resistencia a la colonización por cepas toxigénicas a través de mecanismos competitivos de nutrientes o de accesibilidad a las células epiteliales intestinales (Gerding, 2015).

La guía de práctica clínica para CDI de la IDSA y la SHEA no recomienda realizar un *screening* activo para la búsqueda y detección de portadores asintomáticos de *C. difficile*. Esto lo realiza en bases a que hay opciones limitadas de tratamiento en estos casos, el tratamiento antibiótico en muchos casos no erradica las esporas, los pacientes pueden volverse susceptibles a la progresión a CDI y además la colonización puede ofrecer protección al desarrollo de CDI (McDonald, 2018). Es más recomendable realizar una vigilancia en cuanto al control de la infección en localizaciones de elevada tasa de portadores (Furuya-Kanamori, 2015).

Como conclusión, hay que exponer que la colonización asintomática de *C. difficile* permanece aún como un problema de salud complejo, con epidemiología

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

variable. Los portadores asintomáticos forman un potencial reservorio para la transmisión horizontal a nivel hospitalario de cepas toxigénicas en mayor medida. El impacto clínico de lo que supone ser portador asintomático y su posible progresión al desarrollo de la enfermedad permanece todavía sin resolución definitiva. Un metanálisis de 1998 (muy citado) basados en 4 estudios previos a la época de los brotes de las cepas hipervirulentas, expuso que los portadores asintomáticos tenían menor riesgo de desarrollar CDI (Shim, 1998). No obstante, este metanálisis no analizó por separado la presencia de colonización por cepas toxigénicas y no toxigénicas y su evolución. Esto es importante ya que la colonización por cepas no toxigénicas llegaba a ser del 44%. Estudios posteriores mejor diseñados en este aspecto, a pesar de otras limitaciones, sí que han puesto de manifiesto que la colonización por cepas toxigénicas de *C. difficile* en el inicio de la hospitalización supone un riesgo para el progreso a CDI durante esa hospitalización (Crobach, 2018). Obviamente la colonización por cepas más virulentas, en todos los aspectos posibles, tanto de toxicidad como de colonización, va a aumentar la probabilidad de desarrollar CDI.

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

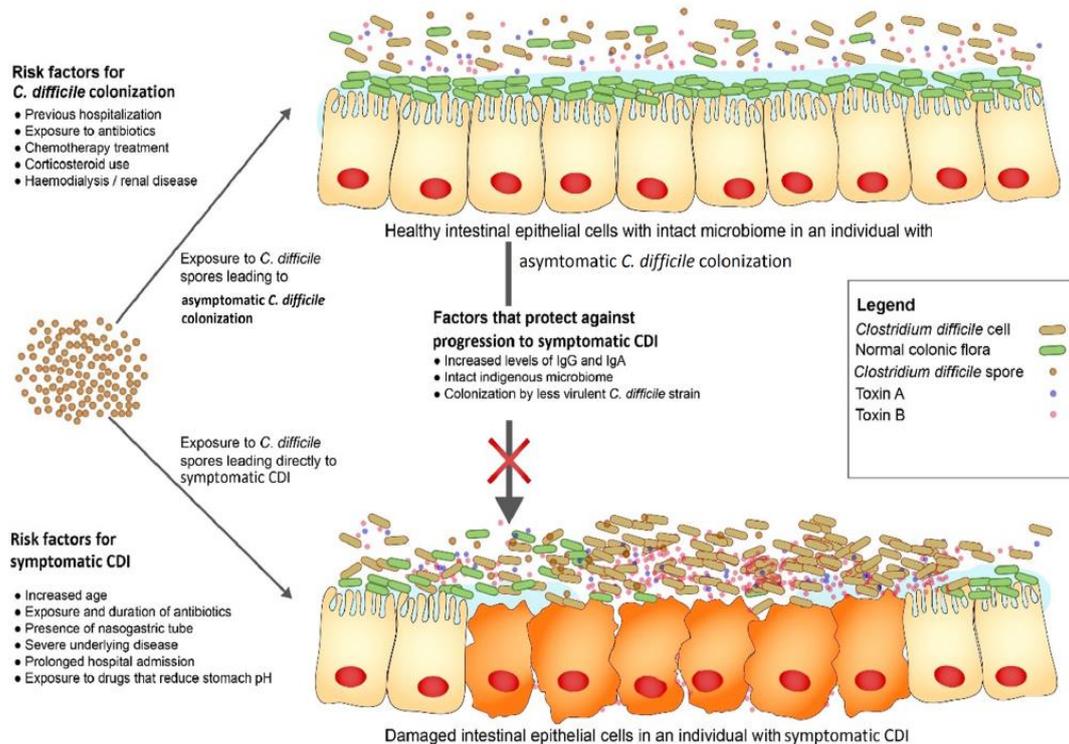


FIGURA 17: Esquema de la colonización por esporas de *C. difficile* y las diferentes posibilidades de progresión. (Furuya-Kanamori, 2015).

1.8 TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN POR *C. DIFFICILE*: TERAPIA ANTIBIÓTICA CONVENCIONAL Y NUEVAS TERAPIAS ALTERNATIVAS.

1.8.1 Tratamiento antibiótico convencional frente a la infección por *C. difficile*.

Cuando se ha establecido el diagnóstico de CDI, una práctica recomendable es la supresión, en la medida de lo posible, de cualquier terapia antibiótica que hubiera podido ser un factor de riesgo desencadenante. Si no se suprime es posible que haya una respuesta clínica disminuida a la terapia, además de un incremento de la probabilidad de recurrencias (Garey, 2008).

La terapia antibiótica debe ser iniciada empíricamente en dos situaciones; si el diagnóstico microbiológico se va a demorar y existe una sospecha clínica razonable, y si el paciente presenta una CDI fulminante (McDonald, 2018). En el resto de situaciones convendría esperar a tener un diagnóstico completo para

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

establecer la terapia. De esta manera limitaremos la sobreutilización de antibióticos y sus toxicidades y efectos adversos asociados, incluido la aparición de bacterias multirresistentes.

Desde hace 30 años, el metronidazol y la vancomicina oral han sido los tratamientos de elección para la CDI. Ensayos clínicos aleatorizados en los años 80 y 90 mostraron que no había diferencia en los resultados obtenidos con ambos (Wenisch, 1996). No obstante, desde el año 2000 otros ensayos clínicos aleatorizados con placebo sí que han evidenciado que la vancomicina oral muestra mejores resultados que el metronidazol (Zar, 2007). Además, hace pocos años, la agencia FDA americana aprobó la fidaxomicina como tratamiento para la CDI. Dos ensayos clínicos aleatorizados compararon la eficacia de la vancomicina oral frente a la de la fidaxomicina mostrando la resolución de la diarrea resultados similares, aunque la ausencia de diarrea a los 25 días fue mejor con la fidaxomicina (Cornely, 2012).

1.8.1.1 Tratamiento antibiótico convencional frente a la infección de C. difficile en un episodio inicial.

La guía clínica del 2017 de la IDSA y la SHEA realiza una serie de recomendaciones al respecto del tratamiento antibiótico de elección con respecto a un episodio inicial de CDI. La vancomicina o la fidaxomicina se recomienda por encima del metronidazol. La dosis de la vancomicina oral es 125 mg/4 veces al día y la de la fidaxomicina 200 mg/2 veces al día, durante 10 días en ambos casos. Si hay problemas de abastecimiento de vancomicina o fidaxomicina, entonces se recomienda metronidazol 500 mg/3 veces al día durante 10 días (McDonald, 2018). Hay que intentar evitar el uso prolongado del metronidazol debido a su potencial neurotoxicidad irreversible. Es aceptable restringir el metronidazol solo en casos de falta de disponibilidad de vancomicina o fidaxomicina o bien en contraindicaciones a estos. Aunque los ensayos clínicos han demostrado que el tratamiento de 10 días es suficiente en la mayoría de pacientes, en algunos casos la respuesta tarda en alcanzarse, especialmente con el metronidazol. En estos casos el tratamiento podría prolongarse hasta los 14 días (Wilcox, 1995).

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

Algunos estudios han intentado relacionar algunos parámetros con la severidad de la CDI para valorar si el tratamiento está siendo eficaz. Se ha visto que la fiebre superior a 38.5°C, un recuento total de leucocitos en sangre total mayor a 15000/ μ L y una creatinina en suero mayor a 1.5 mg/dL correlaciona con un fallo terapéutico y una mala evolución (Bauer, 2012). La guía de la IDSA y la SHEA recomiendan el recuento total de leucocitos y la creatinina en suero como factores que determinan la severidad de la CDI (McDonald, 2018), aunque esto no es aplicable en caso de enfermedades concomitantes hematológicas malignas o de insuficiencia renal.

Otros tratamientos antibióticos alternativos de probable eficacia, pero no aprobados por la FDA son la nitazoxanida y el ácido fusídico. Tratamientos ineficaces o de eficacia no demostrada, según la literatura, son la rifaximina, tigeciclina y bacitracina (McDonald, 2018).

1.8.1.2 Tratamiento antibiótico convencional frente a la infección de C. difficile en un caso fulminante.

La vancomicina oral a altas dosis ha sido el tratamiento histórico de elección en casos de CDI fulminante. Si no hay presencia de íleo paralítico, la vancomicina puede ser administrada por vía rectal en enemas. La dosis suele ser 500 mg/6 horas durante un mes o bien 500 mg en 100 mL de suero salino en enema a los mismos tiempos. Se debe añadir metronidazol intravenoso 500 mg/8 horas (McDonald, 2018).

La intervención quirúrgica puede ser una opción en ciertos pacientes con parámetros bioquímicos de severidad muy alterados, como un recuento total de leucocitos mayor a 25000/ μ L y lactato en suero mayor a 4 mmol/L. La colectomía subtotal es el procedimiento de elección en casos de megacolon tóxico, perforación colónica y abdomen agudo o de pacientes con shock séptico asociado a fallo multiorgánico (McDonald, 2018).

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

*1.8.1.3 Tratamiento antibiótico convencional frente a la infección de *C. difficile* recurrente.*

Se espera aproximadamente que el 25% de los pacientes tratados para CDI con vancomicina padezcan, al menos, una recurrencia (Cornely, 2012). La recurrencia puede producirse por la misma o por distinta cepa de *C. difficile*, aunque clínicamente ambas formas no pueden diferenciarse y serán manejadas de igual forma. Las recurrencias se dan en menos casos si el episodio inicial es tratado con fidaxomicina (Cornely, 2012).

El tratamiento de elección en la primera recurrencia es la vancomicina oral mediante un régimen especial, es decir, 125 mg/12 horas una semana, 125 mg/24 horas una semana y 125 mg/48 horas durante 2-8 semanas. Lo que se busca es eliminar las esporas y esperar que la microbiota intestinal se reestablezca. El metronidazol no es opción en estos casos por sus peores resultados que la vancomicina y su potencial efecto neurotóxico a largo plazo (McDonald, 2018). La fidaxomicina a dosis normales sería otra opción que considerar.

Las segundas y siguientes recurrencias se deben tratar con vancomicina oral a régimen especial que hemos visto en el apartado anterior. La experiencia con fidaxomicina en estos casos es limitada (McDonald, 2018).

*1.8.1.4 Resistencias de *C. difficile* al tratamiento antibiótico.*

C. difficile es normalmente susceptible a los antibióticos de elección vancomicina, metronidazol y fidaxomicina, pese a que la tasa de resistencias está aumentando de forma global rápidamente. Estos tratamientos de elección aun son notablemente activos y son los recomendados en las guías clínicas para la CDI, pero sus resistencias comienzan a ser detectadas. También, se observan resistencias variables a otros antibióticos que varían en función de la zona geográfica (Banawas, 2018).

De forma general, se ha visto que las cepas epidémicas son más resistentes que las no epidémicas. El ribotipo hipervirulento 027 presenta una resistencia a la

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

clindamicina del 50% y al moxifloxacino del 93% (Tickler, 2013), muy elevada esta última debido a la presencia como factor de virulencia de mutaciones que le conceden una resistencia de alto nivel a las fluorquinolonas (Mits, 2013). También un 40% de estos ribotipos presentan una baja susceptibilidad a la vancomicina (Tickler, 2013). De forma general las tasas de resistencia encontradas en el ribotipo 027 son mayores que las de ribotipos no 027.

En un trabajo epidemiológico realizado en hospitales de Barcelona en 2013, se pretendió estimar la incidencia de la CDI, ribotipos y toxinotipos en las cepas aisladas, e identificar predictores de resultado desfavorable. Se observaron unas resistencias del 74% a la clindamicina, del 49% a la eritromicina, del 42% al moxifloxacino pero del 100% al ciprofloxacino, del 24% a la rifampicina y no hubo resistencia a la vancomicina, metronidazol y tetraciclina (Rodríguez-Pardo, 2013).

Las resistencias al metronidazol son muy bajas, aunque algunos estudios muestran tratamientos fallidos con este antibiótico (Debast, 2014). Los mecanismos de susceptibilidad y resistencia al metronidazol para *C. difficile* y otros anaerobios son desconocidos. Se ha especulado con que podría estar reducida su entrada al interior de la bacteria (Banawas, 2018).

Se han reportado escasos casos de cepas de *C. difficile* resistentes a la vancomicina (Banawas, 2018). Su mecanismo de acción es la inhibición de la síntesis del peptidoglicano por la unión a la D-alanil-D-alanina al extremo terminal del precursor del peptidoglicano. El mecanismo de resistencia de *C. difficile* a este antibiótico es desconocido.

La fidaxomicina actúa a inhibiendo la ARN polimerasa durante la transcripción bacteriana. Existen algunas cepas resistentes a este antibiótico, aunque se considera de elección (Goldstein, 2011). El mecanismo de resistencia sugerido se debería a mutaciones en la ARN polimerasa (Banawas, 2018).

Con respecto a la eritromicina y clindamicina, su mecanismo de acción es a través de la inhibición de la síntesis proteica. Se unen a la subunidad 50s del ribosoma de la bacteria e inhiben la extensión de la cadena peptídica. Ambos presentan altas tasas de resistencia reportadas en varios países (Banawas, 2018).

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

La metilasa ribosomal codificada por el gen *ermB* puede modificar al ARNr 23S y genera elevadas tasas de resistencia a estos antibióticos, aunque otro mecanismo propuesto es el flujo activo al exterior de la bacteria.

La tetraciclina es un bacteriostático que se une específicamente al segmento inicial del ARNr 30S, no permitiendo la unión del aminoacil-tARN al ribosoma, por tanto, no permitiendo la formación de la cadena peptídica. La resistencia es debida a un flujo activo de salida al exterior de la bacteria y también la proteína *Tetracycline Resistance*. Esta proteína protege al ribosoma de la acción de la tetraciclina. En China existe una tasa de resistencia del 62% a este antibiótico (Huang, 2009).

Con respecto a la resistencia de las fluorquinolonas ya hemos visto su importancia en la diseminación del ribotipo 027. Estos antibióticos actúan inhibiendo la ADN girasa bacteriana, inhibiendo la síntesis o replicación del ADN bacteriano. Los mecanismos de resistencia son mediante mutaciones en los genes codificantes de las dianas (*GyrA* y/o *GyrB*), reduciendo su afinidad por los antibióticos, y mediante un flujo activo al exterior de la célula o bien debido a una permeabilidad reducida.

La resistencia a la rifampicina o miembros de su grupo como la rifamicina o rifamixina es debida a mutaciones en la ARN polimerasa ADN dependiente que la inhiben impidiendo la transcripción del ADN de *C. difficile* y otras bacterias Gram positivas. En España encontramos una tasa de resistencia del 24% (Rodríguez-Pardo, 2013).

1.8.2 Terapias alternativas para el tratamiento de la infección de *C. difficile*.

1.8.2.1 Trasplante de Microbiota Fecal.

El trasplante de microbiota fecal (FMT, *Fecal Microbiota Transplantation*) es un método efectivo para la CDI recurrente (Brandt, 2012). Se recomienda por la guía de la CDI de la IDSA y la SHEA del 2017 (McDonald, 2018), normalmente después de la tercera recurrencia. El objetivo es restaurar la composición normal

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

de la flora intestinal al transferir heces desde un donante sano. También se actúa estimulando la respuesta inmune a la CDI en el receptor. Actualmente no está aprobado como modalidad de tratamiento ni por la FDA ni por la EMA (*European Medicines Agency*).

El primer FMT fue realizado en 1958 en 4 pacientes con colitis pseudomembranosa y en todos los casos se resolvió la infección (Kelly, 2015). El primer ensayo clínico aleatorizado que comparó resultados clínicos entre terapia antibiótica y FMT se realizó en 2013 (van Nood, 2013). En pacientes con varias recurrencias de CDI se observó un 81% de resolución de la diarrea en pacientes tratados con FMT, y solo un 27% pacientes tratados con vancomicina. De hecho, el estudio terminó prematuramente debido al beneficio que suponía ser tratado con el FMT con respecto a la vancomicina.

No obstante, hay barreras prácticas para su mayor implantación (se requiere un banco de donantes de heces y su preparación). Los efectos adversos también deben ser considerados. La literatura nos dice que el FMT es seguro a corto plazo, pero se han reportado casos de fiebre elevada o de colitis ulcerativa (Roshan, 2018).

1.8.2.2 Inmunoterapia.

En 2017 la FDA y en 2018 la EMA aprobaron el primer anticuerpo monoclonal para la prevención de CDI recurrente en pacientes mayores de 18 años, llamado bezlotuxumab (Zinplava®). Se trata de un anticuerpo con actividad anti TcdB. Existe otro anticuerpo anti TcdA llamado actoxumab. En 2 ensayos clínicos aleatorizados con 2655 pacientes con CDI que recibieron tratamiento antibiótico se ha investigado la eficacia del bezlotuxumab, solo o combinado con actoxumab en la tasa de recurrencias. La terapia con bezlotuxumab dio lugar a una muy baja tasa de recurrencias (Wilcox, 2017). Debido a lo costoso del tratamiento permanece en debate si esta terapia es coste-efectiva. Para la guía de la CDI de la IDSA y la SHEA del 2017, todavía no hay suficiente evidencia para recomendar este tratamiento en la práctica asistencial (McDonald, 2018).

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

1.8.2.3 Terapias complementaria y alternativas.

Debido a las crecientes tasas de fallos al tratamiento antibiótico convencional se van proponiendo nuevas terapias alternativas. Los compuestos bloqueadores de la toxina impiden que interactúen con el enterocito. Algunos de ellos son adsorbentes como las resinas tipo colestiramina o colestipol, polímeros y oligosacáridos. Los resultados obtenidos hasta la fecha no son satisfactorios (Roshan, 2018).

Los bacteriófagos son virus aislados o integrados en el genoma bacteriano que contienen elementos de control de lisogenia como represores, antirepresores e integrasas. Se ha desarrollado un bacteriófago específico para la cepa NCTC 12712 de *C. difficile* que, en estudios *in vitro* ha demostrado un efecto reductor del crecimiento y la producción de las toxinas, sin aparentemente afectar al resto de la microbiota comensal intestinal (Meador, 2010). Podría ser una terapia profiláctica prometedora.

Los probióticos según la Organización Mundial de la Salud son microorganismos vivos que, cuando son administrados en cantidades adecuadas, confieren beneficios para la salud del hospedador. Una de sus propiedades es que al ser administrados vía oral mejoran la microbiota intestinal y la reestablecen después de una disrupción secundaria a una administración de antibióticos. También estimulan al sistema inmune del sujeto y la producción de moléculas de poder antimicrobiano que degradan las toxinas o bloquean sus sitios específicos de adherencia. Los probióticos más utilizados para tratar los síntomas secundarios a la CDI son especies de *Lactobacillus*, *Saccharomyces Boulardii* y *Bifidobacterium spp.* La guía clínica del *American Journal of Gastroenterology* del 2013 es la única que expone que hay escasa evidencia para recomendar el uso de probióticos como coadyuvantes al tratamiento antibiótico para prevenir las recurrencias (Surawicz, 2013).

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

1.9 EPIDEMIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN DE *C. DIFFICILE*.

En este apartado mostraremos el problema de salud que supone actualmente la CDI y el cambio en la epidemiología de dicha infección ocurrida desde los inicios del siglo XXI, con mayor número de casos, mayor severidad y mortalidad de los mismos, y con unos costes notables para el sistema de salud.

1.9.1 Definiciones.

La guía de práctica clínica del 2017 para CDI de la IDSA y la SHEA, establece unas definiciones epidemiológicas con el fin de incrementar la comparabilidad entre diferentes contextos clínicos. Se trata de definiciones de caso, con el fin de establecer programas de vigilancia y estudios epidemiológicos (McDonald, 2018):

- CDI de Inicio Hospitalario (CDI-IH): CDI que se produce a partir del tercer día de ingreso.
- CDI de Inicio en la comunidad asociado a ingreso hospitalario previo (CDI-ICIH): CDI antes de 28 días después de un alta hospitalaria.
- CDI de Inicio en la Comunidad (CDI-IC): Sin antecedentes de alta hospitalaria en las últimas 12 semanas.
- CDI recurrente: Paciente hospitalizado que tras finalizar el tratamiento, comienza nuevamente con criterios de CDI entre 2 y 8 semanas después del primer episodio.
- CDI caso nuevo: Es necesario una serie de manifestaciones clínicas en combinación con pruebas de laboratorio (Ver apartado 1.4.2 “Diagnóstico microbiológico de la infección por *C. difficile*”) o bien presencia confirmada de hallazgos histopatológicos o radiológicos compatibles con colitis pseudomembranosa.

En la guía clínica publicada en el *American Journal of Gastroenterology* en el 2013 para el diagnóstico, tratamiento y prevención de la CDI del *American College of Gastroenterology*, se definen las diferentes formas de CDI en cuanto a severidad, que tomaremos como referencia. De esta manera, la forma leve y/o moderada se define como diarrea como único síntoma, con por lo menos 3 deposiciones o más

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

en las últimas 24 horas. En la forma severa aparece en el inicio o durante el curso de la enfermedad, hipoalbuminemia (menor a 3 g/dL) y cualquiera de los siguientes signos: recuento total de leucocitos en sangre mayores a 15000/ μ L y/o distensión abdominal sin otros criterios de la forma complicada. En la forma complicada aparece al inicio o durante el curso de la enfermedad cualquiera de los siguientes signos o síntomas: hipotensión con o sin administración requerida de vasopresores, fiebre mayor o igual a 38.5°C, distensión abdominal significativa, signos de alteraciones en el íleo, alteración de la conciencia, recuento total de leucocitos en sangre mayor a 35000/ μ L o menor a 2000/ μ L, concentraciones de lactato en suero mayores a 2.2 mmol/L o cualquier signo de fallo orgánico. Como signos de alteración del íleo tendríamos náuseas agudas, vómitos, cese súbito de la diarrea (íleo paralítico) o evidencias radiológicas compatibles con tránsito intestinal alterado (Surawicz, 2013).

1.9.2 Epidemiología de la infección de *C. difficile*.

Como veremos más adelante en los estudios más importantes en diferentes países o regiones, la evidencia nos dice que la epidemiología de la CDI ha cambiado en los últimos años. Durante mucho tiempo se ha creído que la CDI ocurría únicamente en el ámbito hospitalario, pero la incidencia de casos provenientes de la comunidad ha venido aumentando progresivamente en los últimos años. Es destacable la dificultad para estimar la incidencia de la CDI-IC. Los problemas se localizan en seleccionar los casos, ya que en muchos no se tiene una sospecha clínica. Esto podría infraestimar su verdadera incidencia (Asensio, 2012).

El cambio de la epidemiología de la CDI comenzó en Estados Unidos a raíz de la aparición del ribotipo hipervirulento 027 a inicios del siglo XXI, que supuso multitud de brotes dispersos en diferentes hospitales (Loo, 2005). A groso modo podemos decir que las hospitalizaciones por CDI en adultos se duplicaron desde el 2000 al 2010 (*Healthcare Cost and Utilization Project. HCUP Projections: Clostridium difficile infection 2011 to 2012. Report # 2012-01*). En 2009 el CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) comenzó con un programa de vigilancia de la CDI para valorar la dimensión de este problema en Estados Unidos. El

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

objetivo era estimar incidencia, recurrencia y mortalidad. El estudio más potente y reciente se publicó en 2015 en el *New England Journal of Medicine* con estos datos del CDC del año 2011 (Lessa, 2015). La incidencia para la CDI-IC estuvo comprendida entre 30 y 120 casos por 100000 habitantes, y entre 50 y 160 casos por 100000 habitantes para la CDI-IH. La tasa media fue 48 casos/100000 habitantes en CDI-IC y 93 casos/100000 habitantes en CDI-IH. Del total de casos un 66% fueron CDI-IH y un 34% CDI-IC. La incidencia estimada resultó ligeramente superior en mujeres que en hombres y considerablemente superior en mayores de 65 años. Las recurrencias se estimaron en 13.5% en CDI-IC y en 20.9% en CDI-IH y la mortalidad a los 30 días fue de 1.3% en CDI-IC y de 9.3% en CDI-IH. Los principales ribotipos identificados fueron el 027, 020 y 106. El ribotipo 027 fue aislado más frecuentemente en el ámbito hospitalario y casi todos los casos fueron positivos para CDT. Las conclusiones de este estudio son que la CDI causó durante el 2011 en Estados Unidos 453000 infecciones y 29000 muertes, aproximadamente. Aunque no son comparables los estudios debido a diferentes definiciones de CDI o diferentes métodos diagnósticos utilizados, estas estimaciones son bastante mayores que las de años anteriores que van desde 240000 a 330000 infecciones (Lessa, 2015). Este estudio confirmó la evidencia creciente de que la CDI no estaba solo restringida al ámbito hospitalario. También, confirmó que la incidencia ha ido aumentando progresivamente en los últimos años y resultó ser una excelente fotografía de la problemática actual de esta infección.

En Europa el primer estudio que se realizó para obtener datos de la incidencia de la CDI fue en 2002. Se trataba de una encuesta a 212 hospitales realizada por el *Grupo Europeo para el estudio de Clostridium difficile* (Barbut, 2003). Se evidenció una incidencia media de 2.45 (0.13-7.10) casos por 10000 días-paciente. Durante los años siguientes se produjo el primer gran brote del ribotipo hipervirulento 027 en Reino Unido (Smith, 2005) que después se trasladó a otros países, hasta que en 2008 fue detectado en hasta 16 países (Freeman, 2010). En 2008 el ECDC (*European Center Disease Control*) realizó una encuesta en 106 laboratorios de 34 países europeos con el fin de estimar incidencia de la CDI-IC, CDI-IH, ribotipos, factores de riesgo y desenlace (Bauer, 2011). La incidencia media había aumentado hasta 5.50 (0.00-36.3) casos por 10000 días-paciente. Los

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

ribotipos más frecuentes fueron el 014/20 (15%), 001(10%), 078(8%) y 027(5%) hasta un total de 64 diferentes. Como en el estudio americano de Lessa en 2015, la CDI se produjo principalmente en personas mayores con comorbilidades asociadas y un uso previo de antibióticos. Se hizo un seguimiento posterior durante 3 meses de estos pacientes (se consiguieron datos del 96% de los pacientes, 491/509) y el 22% de los pacientes fallecieron (101/455). Se estimó que en el 2% de los casos la CDI fue causa primaria de la muerte y en el 7% causa contributiva de la muerte.

El último gran estudio europeo y el más amplio, se realizó durante los años 2012 y 2013. Se trató de un estudio multicéntrico en 482 hospitales de 20 países incluido España (Davies, 2016). La incidencia media fue 7.0 (0.7-28.7) casos por 10000 días-paciente. Se encontraron 125 ribotipos diferentes en 19 países. El ribotipo 027 fue el más prevalente (19%), después el 001/072 (11%) y 014/020 (10%). De forma notable el ribotipo 078, que era el tercero más frecuente en el estudio del 2008 (Bauer, 2011) ahora apenas conformó el 3%, ocupando el 7º lugar.

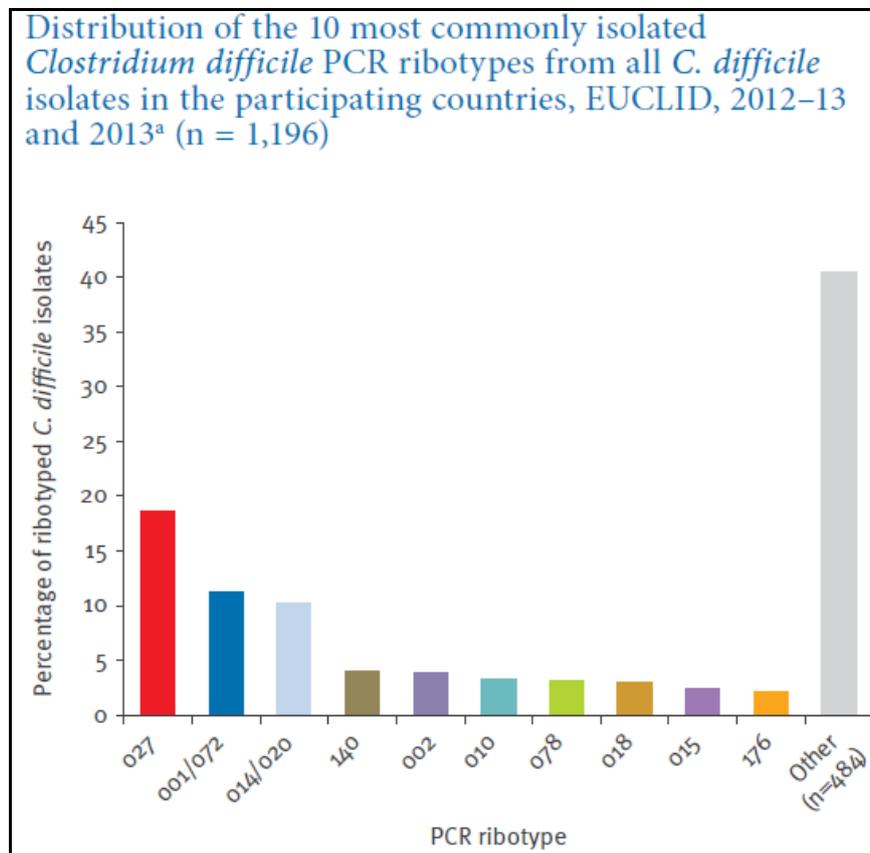


FIGURA 18: Distribución de los ribotipos más frecuentes en Europa durante 2012-2013. (Davies, 2016).

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

La distribución geográfica de los ribotipos encontrados en Europa puede observarse en la siguiente figura:

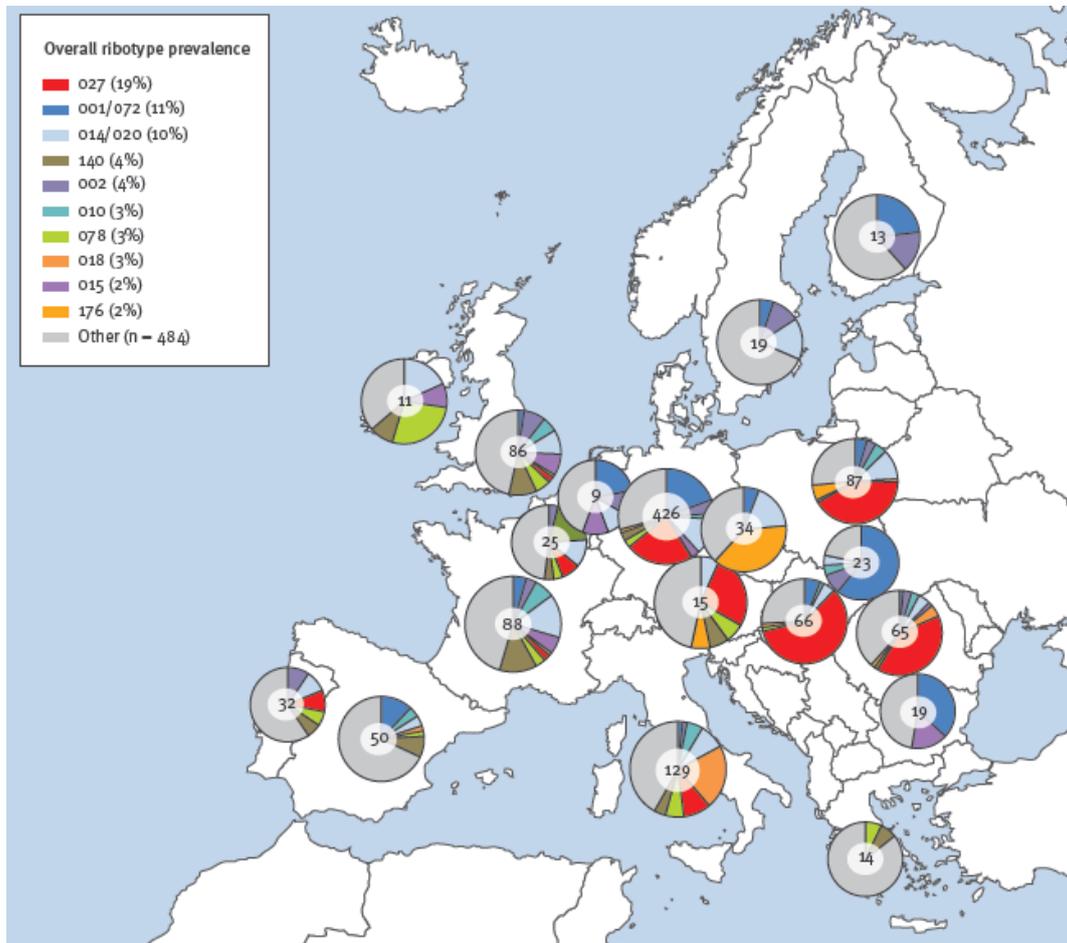


FIGURA 19: Distribución geográfica de los ribotipos de *C. difficile* encontrados en el estudio multicéntrico de Davies. Número de aislados: 1996. El número dentro del círculo representa el total de aislados localizados en el país. (Davies, 2016).

Los hallazgos de este amplio estudio muestran que, al igual que en Estados Unidos, la epidemiología de la CDI ha venido cambiando. Se está produciendo un incremento de la infección, un cambio en la diversidad de los ribotipos mayoritarios y un mayor número de ribotipos diferentes identificados. De forma notable, el ribotipo hipervirulento 027 pasa del 5% al 19% desde el 2008 (Bauer, 2011) al 2013 (Davies, 2016), siendo el más frecuente. Además, en países donde este ribotipo 027 era mayoritario, se observó una disminución de la

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

diversidad, concluyendo que este ribotipo, a partir de una propagación regional, principalmente desde Reino Unido, se ha extendido prácticamente a toda Europa.

Con respecto a España hemos de decir que no ha existido un sistema de vigilancia para la CDI, de manera que las estimaciones epidemiológicas se han realizado a través de varios estudios para valorar la problemática de la CDI. Para el periodo 1997-2005, un estudio basado en el CMBD (Conjunto mínimo básico de datos), con las limitaciones que conlleva debido a una posible infraestimación, observó una incidencia promedio de 41.2 casos por 100000 altas con una tendencia al alza (Soler, 2008). En el 2008 se publicó un trabajo del grupo EPINE español (Estudio de prevalencia de las infecciones nosocomiales en los hospitales españoles) en 249 hospitales, para valorar la presencia de CDI entre los años 1999-2007. Se observó un aumento desde 39 a 122 casos cada 100000 pacientes hospitalizados con un incremento anual del 9% (Asensio, 2008). En otro estudio multicéntrico del año 2007 en 103 hospitales se estimó una incidencia 171 casos por 100000 ingresos y 13.4 casos por 100000 habitantes (Alcalá, 2011). Además, se evidenció que la estrategia diagnóstica de la CDI se basaba en la mayor parte de hospitales en la detección de la toxina en heces por enzimoimmuensayo únicamente, por tanto, se podrían estar infradiagnosticando muchos casos de CDI.

El resto de los datos del impacto actual de la CDI en España los obtenemos de estudios en hospitales concretos. Por ejemplo, en un estudio descriptivo realizado en el hospital de Salamanca entre 2005 y 2014 se observó una prevalencia media global en esos años de 6.8 casos cada 100000 habitantes y año, con incremento progresivo de la prevalencia de la CDI, llegando a 27 casos cada 100000 habitantes y año en 2014 (Cores-Calvo, 2016). Se observó una mayor detección de casos a partir del 2011 cuando se instauró, junto a la detección de toxinas en heces, la detección de GDH y el cultivo toxigénico. El 86.4% de los casos fueron CDI-IH.

En España apenas hemos tenido casos documentados de la presencia del ribotipo hipervirulento 027. Es por lo cual que el incremento de la CDI no se ha achacado a la irrupción de este ribotipo. Según el estudio EPINE del 2008

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

(Asensio, 2008) el incremento es debido al uso de antibióticos, al envejecimiento de la población y al aumento de las comorbilidades de los pacientes hospitalizados. Como mencionamos en el apartado 1.3.9 “*Cepas hipervirulentas de reciente aparición*”, en España los estudios moleculares epidemiológicos de *C. difficile* son escasos y es por ello por lo que la importancia del ribotipo 027 es desconocida. El primer caso descrito y publicado fue en 2013 en el hospital Gregorio Marañón de Madrid (Marín, 2014). En este mismo hospital a los pocos meses hubo un brote del ribotipo 027 (el único hasta la fecha en España) que causó 141 casos de CDI, de manera que se hizo un estudio prospectivo (Bouza, 2017) y se encontró una notable asociación en pacientes con cirrosis hepática, hallazgo ya descrito recientemente (Trifan, 2015).

Con respecto a la caracterización de la CDI-IC su incidencia es bastante desconocida. En el estudio basado en CMBD (Soler, 2008) representaron el 26% del total casos nuevos y en el estudio EPINE el 36% (Asensio, 2008).

Por tanto, la frecuencia de la CDI en España no está correctamente definida. Existen varios estudios que difíciles de extrapolar y varios estudios en hospitales concretos, ya que usan indicadores a veces no comparables. No obstante, según el *EUCLID Study* (Davies, 2016) nuestra incidencia de CDI es similar a la de países cercanos y va aumentando progresivamente, aunque realmente desconocemos si ribotipo 027 no se ha extendido, por las razones antes mencionadas. En este estudio no se reportó su presencia en España.

Es de recalcar que ha sido en España donde se ha hecho el primer y casi único gran estudio, en 118 hospitales, que intentó evaluar el posible infradiagnóstico de la CDI, debido a unas estrategias diagnósticas no apropiadas y a la falta de sospecha clínica (Alcalá, 2012). Los resultados fueron que 2 de cada 3 casos no habrían sido diagnosticados por los laboratorios participantes. Las causas se atribuyeron principalmente a la falta pruebas diagnósticas sensibles (19%) y la falta de sospecha clínica (48%) que fue mayor en los casos provenientes de la comunidad y en menores de 65 años. Este estudio nos da una fotografía clara de que en nuestro país existe un infradiagnóstico y que se deben poner al día los laboratorios para ofrecer estrategias diagnósticas que optimicen la

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

sensibilidad y la especificidad, así como que los médicos entiendan la epidemiología actual de la CDI para que no se dejen de diagnosticar casos por falta de sospecha clínica. Todo esto ahonda en la falta de conocimiento sobre la situación de la CDI en España.

Con respecto a la Comunidad Valenciana, a principios de 2017 el Servicio de Vigilancia y Control Epidemiológico de la *Conselleria de Sanitat i Salut Pública*, elaboró un protocolo para la vigilancia de la CDI. De esta manera, se enviarán los resultados de forma periódica al Centro Nacional de Epidemiología, con lo que a partir de ahora se tendrán datos más exactos. En el último informe de *Incidencias de microorganismos de especial vigilancia* elaborado por la Red MIVA de la *Conselleria de Sanitat i Salut Pública*, la tasa de incidencias para la CDI en el 2015 fue de 11.07 casos por 100000 habitantes, aunque en mayores de 60 años se elevó a 32.06 casos por 100000 habitantes, siendo ligeramente superior en mujeres que en hombres.

Por otra parte, para valorar los efectos adversos de la CDI o la morbilidad, podemos utilizar la tasa de colectomías, las recurrencias y las readmisiones hospitalarias. De esta manera, la tasa de colectomías resulta un indicador muy objetivo de la severidad. En Estados Unidos, durante los años previos al siglo XXI, la tasa de colectomías reportada en algunos estudios oscilaba entre 0.5-1.3%. Esta tasa después aumentó dramáticamente con la aparición de los brotes del ribotipo 027 a principios del siglo XXI hasta el 6.2% (Kwon, 2015). No obstante, la tasa de colectomías no se ha mantenido persistentemente elevada, solo suele aumentar en épocas de brotes hipervirulentos y no con los casos aislados.

Las recurrencias son otra fuente de morbilidad para los pacientes con CDI. El riesgo de recurrencia tras un episodio inicial es del 10-30%, después de una primera recurrencia es del 40% para ser de más del 50% en episodios posteriores (Kwon, 2015). Estos pacientes tienen mayor probabilidad de sufrir reingresos hospitalarios, obviamente.

De forma concomitante a la morbilidad, la mortalidad relacionada con la CDI también ha ido aumentando. En los años previos al siglo XXI la tasa de

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

mortalidad era relativamente baja (<2%). Después aumentó durante los brotes del siglo XXI hasta el 6.9-16.7%, pero ha permanecido más elevada en los casos esporádicos, a diferencia de la morbilidad (Kwon, 2015).

Con respecto a los costes económicos que acarrea la CDI hay que decir que tiene un profundo impacto en los sistemas de salud. Es difícil establecer el coste adicional que supone una CDI en un paciente hospitalizado, puesto que estos pacientes presentan más morbilidades y enfermedades de base que aquellos que no han presentado CDI. Es por ello por lo que algunos estudios en Estados Unidos han estimado los costes adicionales entre 3500 y 33000 dólares (Kwon, 2015). En Europa se ha realizado también algún estudio al respecto. En Alemania se ha estimado que los costes asociados podrían estar entre 10000 y 71000 euros (Wiegand, 2012). En España un estudio del 2012 ha estimado que la CDI para el sistema nacional de salud podría suponer un coste de 33 millones de € anuales. El 95% del gasto se achacaría a la prolongación de la estancia hospitalaria. Una infección inicial costaría 3900€, la primera recurrencia 4900€ y la segunda recurrencia 6000€ (Asensio, 2013).

1.9.3 Medidas preventivas para la infección y transmisión de *C. difficile*.

Las siguientes recomendaciones son las establecidas por la *Clinical Practice Guidelines for Clostridium difficile Infection in Adults and Children: 2017 Update by the Infectious Diseases Society of America and Society for Healthcare Epidemiology of America* (McDonald, 2018).

Los pacientes con CDI deben ser aislados en habitaciones individuales con baños individuales para no permitir la transmisión a otros pacientes. Si no fuera posible, se debe hacer un aislamiento en cohortes. Si existe una alta sospecha clínica de CDI, pero los resultados de las pruebas de laboratorio se van a demorar más de un día, es preferible el aislamiento de todas formas. El trabajador sanitario y los acompañantes del paciente que entren a esta habitación aislada deberán llevar siempre bata y guantes. El aislamiento debe continuar hasta 48 horas resuelta la diarrea, aunque se puede prolongar hasta el alta si las tasas de CDI son elevadas en el hospital. La habitación debe ser descontaminada con esporicidas al

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

alta, como hipoclorito sódico y glutaraldehído, aunque si existe una alta tasa de CDI en el hospital debe ser realizada diariamente. Se debe asegurar la correcta desinfección mediante controles ambientales.

De forma rutinaria después de entrar en contacto con un paciente debe haber un cambio de guantes y previamente un lavado de manos con agua y jabón o con solución hidroalcohólica, aunque es preferible el agua y jabón al ser más efectivos eliminando las esporas. De todas formas, es muy difícil eliminar las esporas de forma completa ya que son muy resistentes a los desinfectantes. Se debe incentivar el lavado de manos constante por parte del paciente.

Con respecto a la política antibiótica, ya que hemos visto que los antibióticos es uno de los factores de riesgo más importantes para la CDI, se debe minimizar la frecuencia y duración de los antibióticos de riesgo, con el fin de reducir el riesgo de CDI. Además, estos deben ser seleccionados en función de la epidemiología local de los ribotipos circulantes. Debe considerarse la restricción de fluorquinolonas, clindamicina y cefalosporinas. Asimismo, hay datos insuficientes para recomendar la administración de probióticos como medida de prevención primaria para el desarrollo de CDI.

1.10 C. *DIFFICILE* Y SU RELACIÓN CON LA MICROBIOTA INTESTINAL.

Este último apartado del marco teórico se acerca mucho a la naturaleza del tema que vamos a plantear. Discerniremos los mecanismos de resistencia a la colonización de patógenos intestinales como *C. difficile* que ejerce en condiciones normales la microbiota intestinal. Asimismo, describiremos la disbacteriosis que producen los antibióticos y la disbacteriosis que se observa en los pacientes con CDI. Por último, repasaremos los escasos estudios que han descrito la microbiota intestinal en individuos colonizados por *C. difficile*.

1.10.1 La Microbiota Intestinal y su relación con el estado de salud.

El término microbiota realmente hace referencia al conjunto de microorganismos, ya sean bacterias, virus, hongos o parásitos que residen en

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

nuestro organismo, aunque al referirnos a ella en este estudio trataremos solo de bacterias. Es posible encontrar estos microorganismos en muchas localizaciones del organismo, y cada uno de estos ecosistemas presenta unas particularidades adaptadas al nicho ecológico específico. El ecosistema más numeroso y complejo es el del aparato digestivo. En el ciego es donde se encuentra la mayor densidad de microorganismos.

La microbiota intestinal está formada por 10^{14} bacterias. Existen entre 500 y 1000 especies. Los principales *phylum* son Firmicutes (aproximadamente 60%) y Bacteroidetes (25%). En menor proporción se encontrarían Proteobacteria, Verrucomicrobia, Fusobacteria, Cianobacteria, Actinobacteria y Spirochaetes (Alarcón Cavero, 2016).

La microbiota intestinal ofrece múltiples beneficios al organismo hospedador, como el fortalecimiento de la integridad intestinal y el modelado del epitelio intestinal, la protección frente a bacterias patógenas, la regulación del sistema inmune, la digestión de alimentos y la síntesis de vitamina K y vitaminas del grupo B. Establecemos con ella una relación mutualista, nos aportan necesidades esenciales para el funcionamiento del cuerpo humano (Thursby, 2017).

Con las nuevas técnicas de secuenciación masiva centradas en el estudio del gen ADNr 16S bacteriano podemos estudiar todas las bacterias presentes, a nivel de género o especie, en una muestra de heces que sea representativa de la microbiota intestinal. Esto ha permitido caracterizar la microbiota intestinal en enfermedades extraintestinales e intestinales y se ha visto que la disrupción de la microbiota, llamada disbacteriosis, está asociada a enfermedades como la obesidad o al síndrome metabólico (Cani, 2016; Musso, 2010).

La composición de la microbiota intestinal puede variar en función de la dieta, genética e interacción con el medio ambiente. Una característica de la microbiota intestinal es que no es tan diversa como la de otras localizaciones y que presenta un alto grado de redundancia funcional, es decir, aunque exista una variabilidad intraindividual, debido a la redundancia funcional el perfil

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

metabólico sería similar. No obstante, aunque es difícil describir una microbiota normal, se considera más saludable cuando más diversa y equilibrada sea (Thursby, 2017)

Existe bastante consenso en que el inicio de la conformación de la microbiota intestinal comienza justo después del nacimiento, aunque algún autor ha apuntado que comienza durante la vida intraútero, basándose en que se ha evidenciado la presencia de microbiota en la placenta y meconio (Prince, 2015). En la época neonatal la microbiota es variable en función de si el parto es vaginal o bien es mediante cesárea (Cabrera-Rubio, 2012). Si el parto ha sido vaginal la microbiota presenta una gran cantidad de *Lactobacillus* durante unos pocos días, reflejo de la alta abundancia vaginal. Si ha sido por cesárea, existe una disminución de *Bacteroides* debido a un retraso en su colonización, pero hay una elevada colonización por anaerobios tipo *Clostridium*. La microbiota intestinal es más parecida a la de la madre si el parto ha sido por vía vaginal. Durante los primeros meses de vida la microbiota intestinal está constituida por dos *phylum* principalmente, Actinobacteria y Proteobacteria. A partir de aquí la microbiota va madurando y diversificando durante el primer año de vida hasta dar lugar a una microbiota todavía diferente a la del adulto, con una variabilidad intraindividual muy grande. A los 2-3 años la microbiota del niño es la misma que la que encontramos en el adulto. A partir de aquí permanece estable, aunque puede sufrir caóticos cambios debido a la administración de antibióticos, de situaciones patológicas o de cambios drásticos en la dieta. Sobre la edad de 65 años la microbiota intestinal sufre cambios con un aumento de Bacteroidetes (Thursby, 2017). De forma global en la edad avanzada existe una reducción en la producción bacteriana de AGCC y una mayor actividad proteolítica. Debido a la función antiinflamatoria e inmunomoduladora de los AGCC es fácil deducir que estos procesos de cambios en la microbiota intestinal promueven la aparición de procesos inflamatorios secundarios a la edad avanzada (Corrêa-Oliveira, 2016).

La composición de la microbiota intestinal está influenciada por el hospedador y por la presión selectiva ambiental. El tracto gastrointestinal se protege de lesiones y mantiene la homeostasis, limitando la exposición de la microbiota intestinal al sistema inmune, mediante la formación de una barrera

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

intestinal multifactorial y dinámica. Esta barrera incluye componentes físicos como la capa epitelial y mucosa, bioquímicos (enzimas y antimicrobianos peptídicos) e inmunológicos (IgA y las células inmunes asociadas al epitelio intestinal) (Thursby, 2017).

En el intestino la energía se extrae solo de unas pocas formas, como la fermentación y sulfato-reducción de carbohidratos de la dieta o del hospedador, por tanto, las bacterias que pueden sobrevivir están limitadas en este aspecto. Asimismo, así se explica también los efectos que la dieta es capaz de producir en la microbiota intestinal (Donaldson, 2015). La capa mucosa también es una fuente de carbohidratos para la microbiota intestinal, ya que tiene grandes cantidades de mucina, un gel altamente glicosilado. La capa mucosa, además, es esencial para la interacción entre la microbiota y las células del sistema inmune. Una disminución de los MACs de la dieta provocaría un consumo elevado de la mucina de la capa mucosa y un adelgazamiento de ésta y un mayor acceso de las bacterias al epitelio intestinal provocando fenómenos inflamatorios (Earle, 2015). La capacidad de las bacterias intestinales para utilizar los azúcares de la dieta o de la mucina es determinada por las hidrolasas específicas presentes su genoma. Algunas de estas hidrolasas degradan un amplio rango de polisacáridos mientras que otras son específicas en degradar un grupo concreto (Tailford, 2015). Además, la diversificación bacteriana puede ocurrir mediante mutaciones o transferencia lateral de genes y esto produciría variaciones en el nicho ecológico. Otro concepto clave para entender la microbiota intestinal es la cooperación metabólica existente, es decir, los productos de fermentación de algunos grupos son sustratos de otros. Por ejemplo, el ácido láctico, succínico y el 1,2 propanodiol son sustrato de las bacterias productoras de butirato y propionato (Thursby, 2017).

Los AGCC predominantes en el tracto intestinal son el ácido propiónico, butírico y acético. Están en proporción 1:1:3 (Musso, 2010). Son rápidamente absorbidos por el epitelio intestinal y aquí intervienen en procesos celulares como la expresión génica, quimiotaxis, diferenciación, proliferación y apoptosis celular (Corrêa-Oliveira, 2016). El ácido acético es producido por la mayoría de las bacterias anaerobias, mientras que el ácido propiónico y butírico es producido por grupos exclusivos de bacterias con rutas metabólicas específicas. El ácido butírico

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

proviene de los carbohidratos por la vía glucolítica y acetyl-coA, principalmente de bacterias del *phylum* Firmicutes. El ácido propiónico proviene de las rutas del ácido succínico y el propanodiol, y es producido por el *phylum* Bacteroidetes principalmente. El ácido butírico tiene actividad antiinflamatoria y anticancerosa (Morrison, 2016), además es una fuente de energía particularmente importante para los colonocitos. Asimismo, el ácido butírico atenúa la traslocación bacteriana y potencia la barrera intestinal al actuar sobre las uniones intercelulares y la capa mucina (Morrison, 2016). Los AGCC también tienen una actividad reguladora del sistema inmune y la respuesta inflamatoria y pueden influir en la producción de citocinas (Morrison, 2016). Otros metabolitos, aparte de los AGCC, también podrían tener impacto en el mantenimiento de la barrera intestinal, proliferación del epitelio y sistema inmune (Nagai, 2016).

La microbiota intestinal también es importante en el desarrollo del sistema inmune general y de la mucosa intestinal. Este proceso se realiza a través de la vía de los PRRs en las células epiteliales, como los receptores *Toll-like*, que reconocen señales moleculares producidas por las bacterias. Estas señales pueden amortiguar ciertos procesos inflamatorios intestinales, discriminar entre bacterias patógenas y beneficiosas o aumentar el número de las células inmunes o los PRRs (Thursby, 2017).

La presencia física de la microbiota intestinal influye en la colonización de bacterias patógenas al competir por las fuentes nutricionales y el nicho ecológico y al producir antimicrobianos e IgA secretora. Debido a esto la administración de antibióticos tiene un profundo impacto en la microbiota intestinal, al erradicar ciertos grupos de bacterias. Este hecho permite la colonización de otras bacterias que pueden ser patógenas.

Por tanto, la microbiota intestinal se ve influenciada por varios factores que pueden alterarla, dando lugar a una disrupción de ésta que podría tener consecuencias puesto que participa en varias funciones fisiológicas importantes.

1.10.2 Resistencia a la colonización por *C. difficile*.

El concepto de resistencia a la colonización intestinal de bacterias patógenas fue propuesto incluso antes de que la infección por *C. difficile* se asociase a colitis pseudomembranosa previa administración de antibióticos. No obstante, el interés por saber los mecanismos mediante los cuales la microbiota intestinal de un hospedador es capaz de prevenir estas colonizaciones es bastante reciente.

Trabajos en modelos animales y humanos han demostrado que los antibióticos tienen efectos profundos y duraderos en la estructura de la microbiota intestinal (Antonopoulos, 2016). No solo afecta al tamaño total (riqueza) de la microbiota intestinal sino también a la composición (diversidad), alterando el equilibrio existente entre grupos específicos de bacterias (Reeves, 2011). Ambas situaciones disminuyen la resistencia a la colonización por *C. difficile*. Los estudios en humanos han corroborado que los antibióticos alteran la estructura, diversidad y riqueza de la microbiota intestinal (Peterfreund, 2012). Asimismo, la disminución de diversidad no es recuperable en pacientes con CDI recurrente, mientras que en pacientes con CDI recuperados que no recurren o en pacientes sin CDI, la diversidad es normal (Chang, 2008).

C. difficile necesita ambientes específicos para su colonización y expansión y esto ocurre mediante mecanismos complementarios. El metabolismo de *C. difficile* en el contexto de la microbiota intestinal que ha colonizado está íntegramente relacionado con su patogénesis. El desarrollo de la CDI involucra a dos mecanismos muy importantes y claves como son el metabolismo de los ácidos biliares y la competición con otras bacterias por los nutrientes, aunque existen otros mecanismos mediante los cuales microbiota intestinal del hospedador se resiste a ser colonizada por esta bacteria patógena (Britton, 2012). Estos mecanismos menos importantes, pero a tener cuenta, son la producción de antibacterianos peptídicos que se vería disminuida con la pérdida de riqueza de la microbiota intestinal, y la comunicación entre el sistema inmune y la microbiota que podría incrementar la susceptibilidad a la CDI después de la exposición antibiótica al estar suprimido el sistema inmune innato (Hryckowian, 2017).

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

La germinación de *C. difficile* está estimulada o inhibida por una compleja mezcla de ácidos biliares. Como vimos en el apartado 1.2.4.2 “Germinación de *C. difficile* y su relación con el metabolismo de los ácidos biliares en el hospedador”, los ácidos biliares son los germinantes esenciales de las esporas de *C. difficile* y su presencia en el tracto intestinal juega un papel clave en su colonización y patogénesis. Los ácidos biliares primarios son el ácido cólico y quenodesoxicólico, que después son conjugados con los aminoácidos taurina o glicina. Son secretados en el duodeno en respuesta a la ingesta y la mayor parte (95%) son reabsorbidos en el íleo terminal y devueltos al hígado mediante la circulación enterohepática. Los ácidos biliares primarios que llegan al intestino grueso (5%) son biotransformados en ácidos biliares secundarios mediante enzimas secretados por bacterias de la microbiota intestinal de forma específica, interviniendo dos tipos de reacciones, desconjugación y deshidroxilación. Los ácidos biliares secundarios más abundantes son el ácido desoxicólico, litocólico y ursodesoxicólico. Las esporas de *C. difficile* requieren de forma específica ácidos biliares primarios y aminoácidos como la glicina para la germinación. Los diversos estudios *in vitro* e *in vivo* muestran que la depleción de bacterias que tienen dotación enzimática para obtener ácidos biliares secundarios generaría una disminución de la resistencia a la colonización (Buffie, 2015). Además, los ácidos biliares secundarios inhiben también el crecimiento de *C. difficile* y la actividad y cantidad de las toxinas causantes de la clínica (Thanissery, 2017). En el intestino grueso los ácidos biliares secundarios, inhibidores de la germinación, son absorbidos a velocidades diez veces mayores que los ácidos biliares primarios germinantes, dando lugar a una abundancia de germinantes en el entorno colónico. En sujetos sanos con una microbiota intestinal rica y diversa, los ácidos biliares primarios germinantes, son rápidamente desconjugados por ciertos grupos de bacterias, reduciendo su abundancia relativa y la probabilidad de germinación de las esporas de *C. difficile* (Sarker, 2012).

Asimismo, como avanzamos en el apartado 1.2.4.3 “Impacto de los ácidos biliares secundarios provenientes de la microbiota intestinal en la resistencia a la colonización de *C. difficile*”, la microbiota intestinal aporta los enzimas BSH y BaiCD que transforman los ácidos biliares primarios germinantes de *C. difficile*. BSH hidroliza los ácidos biliares conjugados en ácidos biliares libres. BaiCD es

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

capaz de transformar los ácidos biliares primarios en secundarios. Las bacterias cuyo genoma codifique estos enzimas producirían un efecto inhibitorio sobre la germinación de las esporas de *C. difficile*. La desconjugación de los ácidos biliares primarios conjugados por BSH secretada extracelularmente ocurre muy rápidamente. Estudios metagenómicos han mostrado que los tres principales *phylum* que poseen BSH son Firmicutes (30%), Bacteroidetes (14,4%) y Actinobacteria (8,9%) (Jones, 2008). Por tanto, está ampliamente distribuida en muchos géneros como *Clostridium*, *Bacteroides*, *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Por el contrario, BaiCD se encuentra presente en muy pocos grupos de bacterias, que representan menos del 0,025% de la microbiota intestinal normal (Winston, 2016), principalmente dentro del *phylum* Firmicutes en los géneros *Clostridium*, *Blautia* y *Eubacterium* (Buffie, 2015). A este respecto, Buffie y col. en 2015, encontraron 11 grupos de bacterias que correlacionaron con una resistencia a la infección, en un estudio donde se comparó la microbiota intestinal de 12 individuos portadores asintomáticos de *C. difficile* y 12 pacientes con CDI. Mediante un modelo matemático y estudios metabolómicos investigaron que mecanismo inhibitorio de la infección subyacía detrás. Los grupos encontrados constituyeron un 6% de la microbiota normal y principalmente estuvieron comprendidos en el *cluster Clostridium XIVa*, incluyendo *Clostridium scindens*, donde se halló la correlación más potente. *C. scindens* es un productor de BaiCD. Se formuló la hipótesis de si esta vía metabólica tan rara es la que conferiría esta capacidad de resistencia a la infección (Buffie, 2015).

El género *Bacteroides* se ha puesto de manifiesto que también presenta una correlación negativa con la CDI en estudios donde se observa la restauración de la microbiota intestinal posterior a un FMT (Shahinas, 2012). A este respecto, en estudios *in vitro* se ha evidenciado que *Bacteroides ovatus* es capaz de inhibir el crecimiento de *C. difficile* al actuar sobre el metabolismo de los ácidos biliares (Yoon, 2017). *B. ovatus* no expresa BaiCD, pero si BSH que disminuye la reabsorción ácidos biliares desconjugados en el intestino delgado, de manera que puede inhibir la germinación de *C. difficile* y ejercer un efecto sinérgico en bacterias que aporten actividad BaiCD.

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

Por tanto, la disrupción de la microbiota intestinal secundaria a un tratamiento antibiótico conduciría en el intestino grueso, a un descenso en el metabolismo de ácidos biliares germinantes y a una rápida absorción de los ácidos biliares inhibidores, produciendo un desequilibrio entre los procesos de inhibición y germinación de las esporas de *C. difficile*.

Llegados a este punto es importante recalcar que el concepto de resistencia a la colonización es algo confuso, pues en los apartados anteriores hemos visto el efecto que tiene la modulación del metabolismo de los ácidos biliares, debido a una disrupción de la microbiota intestinal posterior al tratamiento antibiótico, en la germinación de las esporas de *C. difficile*. Por tanto, el concepto de resistencia a la colonización por *C. difficile* engloba también al de resistencia a la germinación y en definitiva al de resistencia a la infección.

Por otra parte, la microbiota intestinal también impide la colonización de *C. difficile* mediante mecanismos competitivos de las fuentes de energía. La pérdida de la resistencia a la colonización al administrar antibióticos provoca una pérdida de diversidad que disminuye la competición por los nutrientes, y deja vía libre para nichos ecológicos antes inaccesibles. Además, la lisis celular que se produce libera fuentes de energía de carbono que las bacterias residuales y los nuevos colonizadores pueden consumir. Por norma general, si dos bacterias compiten por un nutriente limitado, la que presente un mecanismo más eficiente desplazará a la otra de ese nicho. Se han realizado relativamente pocos estudios sobre las vías metabólicas y la utilización de los nutrientes por parte de *C. difficile*, pero se ha visto que puede crecer *in vitro* en presencia de azúcares simples y complejos, aminoácidos y péptidos (Britton, 2014). En un modelo murino se ha visto que es capaz de usar como fuente de energía los ácidos siálicos en el intestino del hospedador y proliferar (Ng, 2013). Los ácidos siálicos de la capa mucosa se liberan y son consumidos en menor medida tras una disbacteriosis. Esto permitiría la expansión de *C. difficile* (Hryckowian, 2017). *C. difficile* también toma ventaja al usar el ácido succínico, un producto de fermentación aumentado después de la disrupción de la microbiota tras administración antibiótica (Ferreira, 2014).

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

La reducción de los AGCC observada en la disbacteriosis se ha asociado también a la pérdida de resistencia a la colonización, ya que se ha visto que inhiben el crecimiento de *C. difficile in vitro*. El otro posible mecanismo es que al incrementarse el pH luminal al disminuir los AGCC se genera un ambiente favorable para el crecimiento de *C. difficile* y Enterobacteriaceae. Además, por los efectos antiinflamatorios del ácido butírico, con reducción de la permeabilidad, aumento de la producción de mucina, aumento de la síntesis de péptidos antimicrobianos etc, la caída de los grupos butirogénicos como las familias Lachnospiracea y Ruminococcaceae, provoca un mayor riesgo de CDI (Ross, 2016).

Para apoyar la idea del desplazamiento del nicho ecológico mediante mecanismos competitivos, la colonización en ratones con cepas no toxigénicas de *C. difficile* previamente a la colonización con cepas toxigénicas, previene completamente la aparición de colitis. Esto es debido a que la cepa no toxigénica ocupa el nicho que la cepa toxigénica ocuparía y, por tanto, esta última es incapaz de colonizar (Sambol, 2002).

La capacidad del FMT de curar la CDI recurrente con un éxito de casi el 100% apoya la idea que restaurar la diversidad de la microbiota es un proceso clave, y que varios grupos de bacterias estarían implicados en prevenir o tratar la CDI (Britton, 2014). Al comprobar la restauración de la microbiota intestinal en pacientes con CDI previa y posteriormente a un FMT, se ha evidenciado que la composición y cantidad de los ácidos biliares son totalmente diferentes en ambas situaciones. La presencia de una carga elevada de ácidos biliares primarios y conjugados en muestras “pre FMT” sugiere su hidrólisis incompleta (Weingarden, 2014). El ácido taurocólico está muy aumentado en muestras previas y el litocólico y otros ácidos biliares secundarios muy disminuidos, y viceversa, en muestras “post FMT”. También la reposición de la producción de antimicrobianos “post FMT”, como la turicina o la nisina, tiene una potencial contribución en el éxito de la FMT (Baktash, 2018).

La dieta también jugaría su papel en la resistencia a la colonización. Se ha visto que el zinc de la dieta juega su papel en la severidad y susceptibilidad de la

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

CDI (Zackular, 2016), ya que altera la microbiota intestinal y disminuye la resistencia a la colonización. También se ha visto que la dieta baja en proteínas supone protección en el desarrollo de CDI en ratones (Moore, 2015).

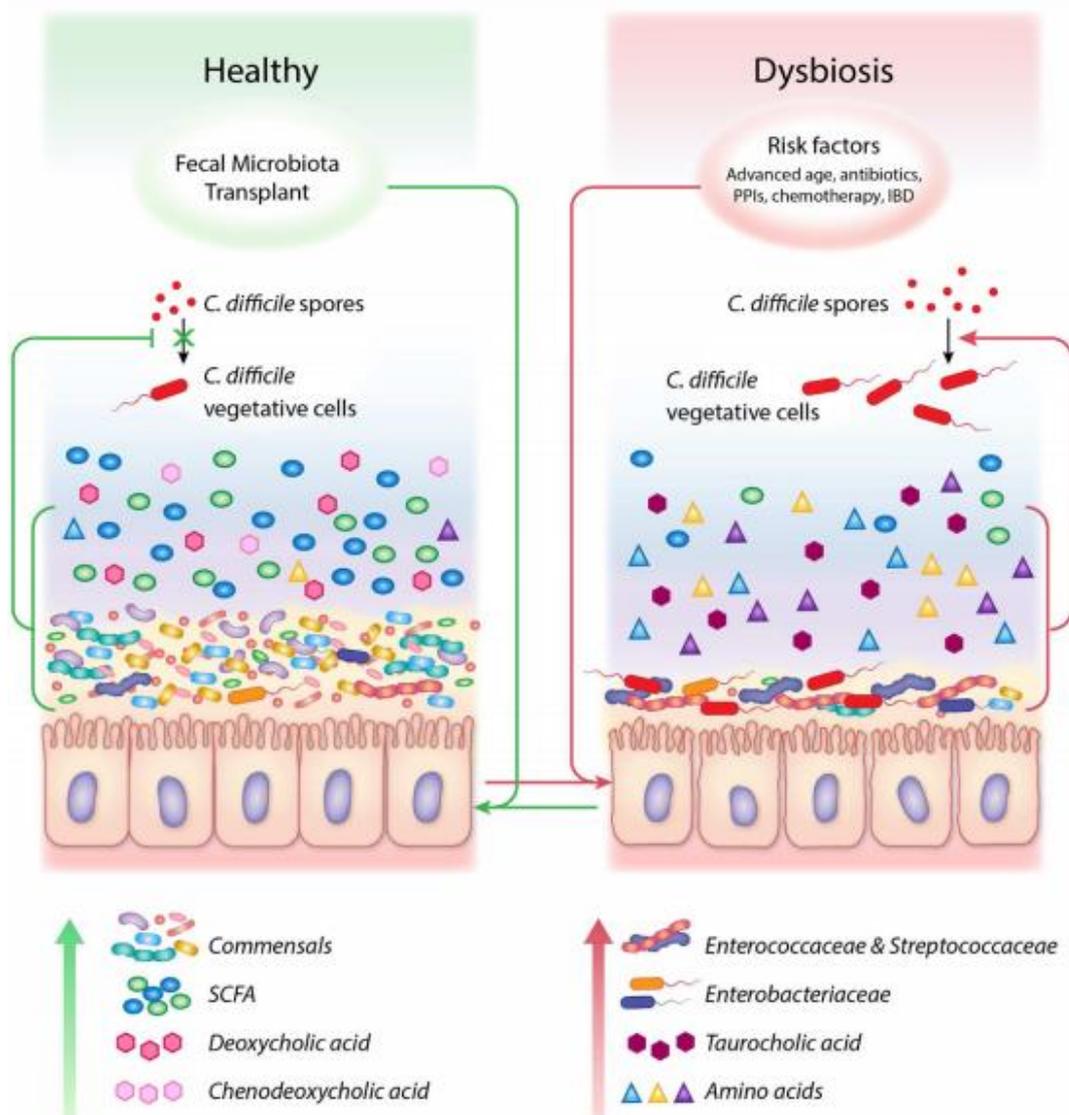


FIGURA 20: Esquema de la pérdida de la resistencia a la colonización durante la disbiosis y su susceptibilidad al desarrollo de CDI. (Ross, 2016).

1.10.3 Alteraciones de la microbiota Intestinal en pacientes con infección de *C. difficile*.

Como hemos visto la microbiota intestinal mediante los mecanismos de resistencia a la colonización puede ser una de las claves de la prevención de la CDI. La disrupción de la microbiota intestinal predispone a la colonización por *C. difficile* o a CDI. Descubrir cuál es el patrón de disrupción de la microbiota intestinal en ambos casos nos permitiría entender los mecanismos subyacentes, encontrar especies o grupos protectores o predisponentes y poder diseñar nuevas terapias moduladoras de la microbiota con bacterias probióticas más enfocadas y precisas. Debido a la gran variabilidad de composición de la microbiota intestinal que encontramos en controles sanos, la mejor forma de caracterizar estos procesos sería mediante un estudio prospectivo, anterior y posterior a una colonización o CDI. Este abordaje es costoso y se prolongaría mucho tiempo en la práctica, de ahí que se planteen alternativas como comparar diferentes cohortes de pacientes con CDI, pacientes colonizados por *C. difficile*, pacientes con diarrea nosocomial sin CDI y pacientes sin diarrea o controles sanos. Todos estos estudios suelen ser con un número de muestras bastante reducido, siendo la interpretación de resultados bastante compleja. Aun así, se han visto claras diferencias en la composición de la microbiota intestinal entre algunos de estos grupos de pacientes.

En uno de los pocos estudios prospectivos realizados al respecto con pacientes hospitalizados, se analizó la microbiota intestinal de 4 pacientes portadores asintomáticos de *C. difficile* y 4 pacientes con CDI a lo largo de su ingreso. Se observó la dinámica de cambio de ciertos grupos de bacterias potencialmente protectores. Interesantemente, días antes de que la colonización fuera detectada en los portadores se observó una abundancia relativa elevada de *Clostridium cluster XI Incertae Sedis*, otros *Clostridium* y *Eubacterium*, con respecto a los pacientes con CDI. Se trata de uno de los trabajos que mejor sustentan la hipótesis de que algunos grupos de bacterias inhibirían la transición del estado de colonización a infección (Vincent, 2016).

Lee y col. en 2017, diseñaron también un estudio prospectivo de caracterización de microbiota intestinal en pacientes hematológicos receptores de

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

trasplante de médula ósea, ya que la CDI es una frecuente causa de diarrea en estos pacientes, puesto que reciben profilaxis antibiótica después del trasplante. Se había visto que estos pacientes tienen altas de colonización de *C. difficile*. El objetivo del estudio fue identificar bacterias protectoras a desarrollar CDI. De 234 trasplantados, 53 padecieron CDI. Se identificaron 3 grupos de bacterias protectoras: el *phylum* Bacteroidetes, la familia Lachnospiraceae (*Clostridium cluster* XIVa) y la familia Ruminococcaceae (*Clostridium cluster* IV). La pérdida de diversidad no sería un factor predictivo de desarrollo inexcusable de CDI, ya que se requeriría alguna alteración específica más (Lee, 2017).

Asimismo, se ha observado que la disbacteriosis es muy profunda en pacientes con CDI recurrente. Weingarden y col. en 2014 estudiaron la microbiota intestinal de 12 pacientes de forma anterior y posterior ser tratado con FMT, y en los 2 donantes de heces que se requirieron para realizarlo. La diversidad fue significativamente más elevada en las muestras “post FMT” que en las muestras “pre FMT”. Esto fue debido a los cambios en abundancia relativa de los *phylum* Bacteroidetes, Firmicutes y Proteobacteria. Las muestras de los donantes, representativas de una microbiota sana, estaba compuesta por Bacteroidetes y Firmicutes (80 –90% de las OTUs de cada muestra), con muy poca abundancia de Proteobacteria (2% o menos de las OTUs de cada muestra). Por el contrario, las muestras “pre FMT” tendían a ser dominadas por Proteobacteria, comprendiendo sobre un 30-50% de las OTUs de cada muestra. Después del FMT, la microbiota de los pacientes fue muy parecida a la de los donantes, con un aumento de Firmicutes y Bacteroidetes, y disminución de Proteobacteria. De forma notable, se observaron también grandes alteraciones a nivel de familia. Lachnospiraceae, Bacteroidaceae y Ruminococcaceae comprendieron el 50% de las OTUs de cada muestra de donante. Por el contrario, estas familias se encontraron en mucha menor abundancia relativa en las muestras “pre FMT”, con Lachnospiraceae en menos del 2%, Bacteroidaceae al 1% y Ruminococcaceae al 1%. Por el contrario, aparecieron Enterobacteriaceae, Veillonellaceae y Verrucomicrobiaceae, componentes menores en los donantes sanos, pero que representaron alrededor del 50% de las OTUs en las muestras “pre FMT”. Después del FMT el patrón de la microbiota a nivel de familia revirtió (Weingarden, 2014).

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

Antharam y col. en 2013 compararon la microbiota intestinal en 39 pacientes con CDI, 36 pacientes con diarrea nosocomial no debida a *C. difficile* (CDN, *Clostridium Difficile-negative nosocomial diarrhoea*) y 40 controles sanos. Tanto los pacientes con CDI como los que tenían CDN presentaron una microbiota con menor diversidad, sobre todo a expensas del *phylum* Firmicutes (De 75% en controles sanos pasó a 40% en ambos grupos). La mayor parte de los Firmicutes correspondieron a la clase Clostridia. El *cluster Clostridium XIVa* (con el género *Eubacterium*) y en menor medida el IV estuvieron significativamente disminuidos en ambos grupos CDI y CDN con respecto a los controles sanos (XIVa: 5.5% y 6.6% frente 18.4%; IV: 0.47% y 0.40% frente 2.95%). Estos grupos incluyen una gran cantidad de bacterias beneficiosas productoras de butirato. A nivel de familia, hubo una disminución en la abundancia de familias de bacterias productoras de butirato, como Lachnospiraceae y Ruminococcaceae en ambos grupos CDI y CDN. Sin embargo y de forma notable, no hubo diferencias significativas en cuanto a la composición de ambos grupos. Algunos géneros estuvieron más abundantes en los pacientes CDI con respecto a los controles sanos, por ejemplo, *Veillonella* (4.5% frente 0.6%), *Enterococcus* (7.1% frente 0.05%) y *Lactobacillus* (3.7% frente 0.4%). *Enterococcus* y *Lactobacillus* son bacterias productoras de ácido láctico del orden Lactobacillales. La familia Desulfovibrionaceae de la clase Proteobacteria, que incluye un número importante de bacterias Gram negativas reductoras de sulfato estuvo disminuido en los pacientes con CDI. Los géneros *Blautia*, *Pseudobutyrvibrio*, *Roseburia*, *Faecalibacterium*, *Anaerostipes*, *Subdoligranulum*, *Ruminococcus*, *Streptococcus*, *Dorea* y *Coprococcus* fueron los principales géneros disminuidos en los grupos CDI y CDN que permite diferenciarlo del grupo de controles sanos. En líneas generales, los autores concluyeron que la disbacteriosis no específica entre los grupos CDI y CDN pudo deberse a la alta frecuencia de exposición antibiótica previa (CDI: 87.2%, CDN: 58.3% frente a 22.5% controles), sugiriendo que el grupo CDN podría ser susceptible al desarrollo de CDI (Antharam, 2013).

Skraban y col. en 2013 comparando pacientes con CDI y controles sanos identificaron que la especie *Bifidobacterium longum* era la más importante especie asociada a las muestras de los controles sanos. Además, este trabajo observó cómo, aunque la presencia de ciertas combinaciones de especies se asoció a la

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

colonización por *C. difficile* o a CDI, la presencia de algunos ribotipos (como el 027) se asociaría a una disbacteriosis más profunda (Skraban, 2013).

Milani y col. en 2016 mediante la combinación de estudios moleculares metagenómicos y metabolómicos en 25 pacientes con CDI, en 29 pacientes con exposición a antibióticos pero sin CDI (AB+) y en 30 pacientes sin exposición antibiótica ni CDI (AB-), intentaron caracterizar la microbiota intestinal de los pacientes con CDI para dilucidar los mecanismos que subyacen en este proceso. Los pacientes AB+ tuvieron una diversidad de microbiota similar a la de los AB-, pero los pacientes CDI presentaron una diversidad menor a ambos grupos. Al comparar el grupo AB- con el grupo CDI se encontraron varios grupos de bacterias disminuidos en los pacientes CDI, como *Faecalibacterium*, *Bifidobacterium*, *Akkermansia*, *Bacteroides*, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae* y *Alistipes*, todas bacterias con funciones beneficiosas. Asimismo, aparte de la familia Peptostreptococcaceae que incluye a *C. difficile*, se encontraron varios grupos de bacterias patógenas o patógenas oportunistas aumentadas en el grupo CDI con respecto al grupo AB-, como *Klebsiella*, *Escherichia/Shigella*, *Sutterella*, *Enterococcus*, *Citrobacter*, *Veilonella*, *Proteus*, *Helicobacter*, *Morganella*, *Hafnia*, *Corynebacterium* y *Staphylococcus*. Con el fin de identificar grupos de bacterias que permitieran caracterizar el riesgo de desarrollar CDI, se comparó el grupo AB+ y CDI frente al AB- y se encontró que la disminución de *Alistipes* y el aumento de *Enterococcus* era la alteración de la microbiota intestinal que mejor discriminaba el riesgo a desarrollar CDI. Por otra parte, la caracterización metabolómica de los pacientes con CDI permitió identificar un incremento de las glicosil hidrolasas y otros genes relacionados con la producción de butirato, y un descenso de los genes responsables de la degradación de los ácidos biliares primarios (Milani, 2016).

Gu y col. en 2016 investigaron las diferencias en la microbiota intestinal en 15 pacientes con CDI, 18 con diarrea nosocomial no de debida a *C. difficile* (CDN) y 25 controles sanos. Con respecto a las diferencias entre CDI y controles, en Firmicutes, hubo una reducción en CDI con respecto a controles, sobre todo debido a la reducción del orden Clostridiales. En CDI se observa una dramática bajada de *Lachnospiraceae* y *Ruminococcaceae*, productoras de butirato en muchos géneros. En esta última familia, sobre todo fue debido a géneros como

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

Faecalibacterium, *Clostridium IV*, *Oscillospira* y *Ruminococcus*. Por el contrario, hay aumento en la familia Clostridiaceae_1, donde hay géneros de *Clostridium* patógenos. Además, bacterias productoras de ácido láctico, como Enterococcaceae, Streptococcaceae y Lactobacillaceae aumentaron en CDI. Como era de esperar la familia Peptostreptococcaceae, donde se incluye *C. difficile*, era más abundante en el grupo CDI. El *phylum* Bacteroidetes fue el dominante en controles sanos, pero estuvo en menor abundancia en CDI, con reducciones en los géneros *Bacteroides* y *Alistipes*. En el *phylum* Actinobacteria hubo similitud en porcentaje total, pero diferencias a nivel de algunos géneros, por ejemplo, incrementos de los órdenes Actinomycetales y Corinebacteriales, y a nivel de género incrementos de *Actinomyces* y *Rothiabacterium* mientras que *Colinisella* (genero productor de AGCC) estuvo reducida. A nivel Proteobacteria, la abundancia fue mucho mayor en CDI, debido sobre todo a gammaproteobacterias, que a su vez fue debido a aumenos en la familia Enterobacteriaceae, considerada patógena oportunista, especialmente *Escherichia/Shigella*, *Kleibsiella*, *Proteus* y *Providencia*. Con respecto a la comparación del grupo CDI con respecto al grupo CDN, no hubo diferencias en cuanto riqueza y diversidad, pero si diferencias, por ejemplo, dentro del *phylum* Fusobacteria, representado por el género *Fusobacterium* que presentó incrementos solo en el grupo CDN, pero no en el grupo CDI ni en el de controles sanos. *Gemminger*, *Paraprevotella*, *Faecalobacterium*, *Fusobacterium* y *Collinsela* estuvieron disminuidos en los pacientes con CDI, pero *Providencia* y *Proteus* fueron más abundantes en el grupo CDI que en el CDN. Por tanto, la microbiota intestinal de los pacientes CDN podría ser susceptible a desarrollar CDI, ya que en la mayoría de los casos ha habido exposición previa a antibióticos, y es muy parecida a la de CDI, pero con la diferencia de que no ha habido exposición a esporas de *C. difficile*. La reducción de *Faecalibacterium* en CDI que no se observó en CDN y controles es importante. *Faecalibacterium Prausnitzii* es un gran productor de butirato y su reducción es compatible con la inflamación existente en la CDI. En conclusión, se objetivó una disminución de bacterias productoras de butirato en los grupos CDI y CDN, y un aumento de patógenos oportunistas productores de endotoxinas y grupos de bacterias productores de lactato en el grupo CDI al comparar con los controles sanos (Gu, 2016).

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

La inclusión de individuos colonizados de *C. difficile* en los estudios de comparación de microbiota intestinal de cohortes frente a pacientes con CDI, es probable que aporte información sobre la susceptibilidad o protección frente a la CDI. Se han realizado varios trabajos al respecto, diferentes todos de ellos, y de los cuales podemos extraer ciertas hipótesis de interés. Ya en 2004 Ozaki y col. establecieron la relación entre la colonización de *C. difficile* y la abundancia en heces de *Enterococcus* (Ozaki, 2004). Rea y col. en 2012, estudiaron la tasa de colonización de *C. difficile* en ancianos, ya que se sabe que en ancianos es elevada debido a varias causas como un estado inmune reducido, aumento de la probabilidad de uso de antibióticos y a su más frecuente hospitalización. De 323 pacientes ancianos estudiados se detectaron 22 pacientes con estudio de *C. difficile* en heces positivo y de estos 22, solo 2 casos fueron diagnosticados de CDI con clínica, por tanto, el resto de casos positivos podemos estipular que se trataban de portadores asintomáticos. A nivel *phylum* la única diferencia significativa fue la reducción en Spirochaetes en portadores, el resto era similar salvo Proteobacteria, que estuvo a 2,3% en controles y 4,3% en portadores. Hubo mucha variabilidad entre las muestras en ambos grupos. Por ejemplo, Bacteroidetes estuvo entre el 4% y el 92% en los controles. A nivel familia, Erysipelotrichaceae, Aerococaccae y Flavobacteriaceae estuvieron más elevadas en portadores y Enterococcaceae, Spirochaetaceae, Prevotellaceae, estuvieron disminuidas. A nivel de género, solo se vieron diferencias en aquellos grupos minoritarios que estuvieron en muy baja proporción. Las diferencias más obvias se vieron en los 2 pacientes con CDI. En estos pacientes el género dominante fue *Parabacteroides*, comparado con controles y el resto de los portadores. Interesantemente, *Bifidobacteria spp* no fue detectada en pacientes con CDI, pero si en el resto portadores y en los controles. Por otra parte, solo en tres pacientes se detectó el ribotipo 027, en un portador y en los dos casos de CDI. Además, hubo una tendencia en los CDI de tener poco *Faecalibacterium spp* con respecto al grupo de portadores asintomáticos. Esta es una bacteria de reconocido efecto antiinflamatorio. Por tanto, aunque no hubo unas alteraciones dramáticas en ambos grupos a nivel de *phylum*, existió una gran variabilidad individual en la microbiota de estos pacientes ancianos (Rea, 2012).

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

Zhang y col. en 2015 consideraron que la colonización asintomática de *C. difficile* estaba asociada a cambios en la microbiota intestinal, pero la transición a un estado de CDI podría deberse a la influencia de otros grupos de bacterias y también a otros factores como el estado inmune del paciente. Presentaron un estudio con 3 grupos: 8 pacientes con CDI, 8 portadores asintomáticos de *C. difficile* y 9 controles sanos. La hipótesis fue que la microbiota intestinal podría contribuir a la patogénesis de CDI y el estado de la enfermedad. La microbiota de infectados y colonizados tuvo menor diversidad que la de los controles sanos, pero no difirieron en diversidad de manera estadísticamente significativa los dos primeros grupos. Asimismo, la microbiota de los 3 grupos fue diferentes a nivel estructural. A nivel *phylum* se observó que en controles sanos predominaba Bacteroidetes (48,2%) y Firmicutes (41,5%) mientras que en los pacientes con CDI había más abundancia relativa de Proteobacteria (33,6%) y menor de Bacteroidetes (23,8%) y Firmicutes (23,8%). La microbiota de los cololizados fue más parecida a la de los controles sanos que a la de los pacientes con CDI, pero también hubo aumento de Proteobacteria y reducción de Firmicutes y Bacteroidetes, aunque no tan pronunciada. Destacó el alto porcentaje de Fusobacteria en individuos portadores y pacientes con CDI. A nivel de género, la cantidad de *Clostridium XI* (donde se incluye *C. difficile*) fue de 6,5%, 1,6% y 0,0% en los grupos de pacientes con CDI, portadores y controles sanos respectivamente. En Bacteroidetes hubo disminución de *Alistipes*, *Bacteroides* y *Prevotella*, y aumento de *Parabacteroides* en pacientes con CDI y portadores con respecto a controles sanos. En Proteobacteria hubo aumento de *Escherichia/Shigella*, *Klebsiella*, *Haemophilus*, *Pseudomonas* y *Biophila* en pacientes con CDI y portadores, pero disminución de *Parasutterella* y *Gemminger* en ambos grupos. Dentro de Firmicutes, *Clostridium XIVa*, *Clostridium Sensu Strict*, *Enterococcus*, *Veillonella* y *Lactobacillus* estuvieron aumentados en pacientes con CDI y portadores y *Phascolarctobacterium*, *Roseburia*, *Megamonas*, *Ruminococcus*, *Faecalobacterium* y *Coprococcus* estuvieron disminuidos en ambos. A destacar que *Bacteroides* aumentó de 10,8%, 24% y 31% desde los pacientes con CDI, portadores y controles sanos, mientras que en *Escherichia/Shigella* fue disminuyendo de 23,9%, 8,7% y 3,6%. Destacó también la escasez de *Bifidobacterium* en pacientes con CDI con respecto a portadores y controles sanos. Se objetivó una escasez de bacterias productoras de butirato como *Coprococcus* y *Roseburia* (Lachnospiraceae) y

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN. MARCO TEÓRICO

Faecalibacterium y *Ruminococcus* (Ruminococcaceae) en CDI y portadores. Los autores concluyeron que en los colonizados por *C. difficile* la microbiota podría ser susceptible a desarrollar CDI, pero esto también dependería del estado inmune del hospedador. El estudio confirmó que, si bien hay pérdida de resistencia a la colonización en portadores, debe existir algo más que dé lugar al estado de enfermedad en estos pacientes, puesto que se objetiva una reducción de bacterias productoras de butirato y una disbacteriosis con pérdida de riqueza, además de una microbiota alterada con respecto a los controles sanos. Asimismo, también la no transición a CDI desde el estado de portador asintomático podría deberse a cepas poco virulentas (Zhang, 2015).

Daquigan y col. en 2017, mediante un método de secuenciación más sensible para caracterizar la microbiota intestinal, reexaminaron muestras de otros trabajos, corroborándose la correlación negativa con *Clostridium scindens* e identificando nuevas correlaciones negativas con otras especies de *Blautia* (*Blautia faecis*, *Blautia luti*, *Blautia schinkii* y *Blautia wexlerae*). Este grupo de bacterias interviene en el metabolismo de los ácidos biliares ya que tiene actividad BaiCD y transforma los ácidos biliares primarios en secundarios. También, otros Clostridiales como *Clostridium paraputrificum* y *Clostridium neonatale* y *Veillonella* mostraron correlación positiva. Además, los datos sustentaron que la abundancia relativa de *C. difficile* es menor en controles que en pacientes con CDI (Daquigan, 2017).

II-JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO Y OBJETIVOS.

CAPITULO II. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO Y OBJETIVOS.

En este capítulo justificaremos el estudio diseñado en base a la importancia del tema. A continuación, expondremos trabajos relevantes acerca de la microbiota intestinal y la relación estrecha que se establece con respecto a la patogénesis de la CDI. Asimismo, también expondremos los principales trabajos pioneros que han aportado luz acerca de los mecanismos subyacentes al estado de colonización asintomática por *C. difficile*. En el último párrafo desarrollaremos los objetivos del presente estudio en base a lo expuesto anteriormente.

C. difficile produce una infección que causa desde manifestaciones clínicas leves, como una diarrea leve o moderada, hasta complicaciones más graves como la colitis pseudomembranosa fulminante y el megacolon tóxico que son mortales en un gran número de casos (Crobach, 2016). El tipo de manifestaciones clínicas que va a producir dependerá del microorganismo y del estado del paciente. Del microorganismo en cuanto a la virulencia de este, por tanto, del tipo de cepa de *C. difficile* causante de la infección, y del paciente, en cuanto a su estado inmune, comorbilidades asociadas y edad, principalmente. Es destacable que existe una elevada probabilidad de que se produzcan recurrencias a las 2-8 semanas una vez resuelto el primer episodio. El riesgo de recurrencia tras un episodio inicial es del 10-30%, después de una primera recurrencia es del 40% para ser de más del 50% en episodios posteriores (Kwon, 2015).

Los principales factores de riesgo asociados a la CDI hospitalaria son la edad avanzada, que a su vez se asocia potencialmente a una mayor severidad de la enfermedad de base y mayores comorbilidades, y la duración de la hospitalización (McDonald, 2006). El incremento diario en el riesgo de padecer CDI durante una hospitalización ya nos sugiere que la misma hospitalización es representativa de la duración y el grado de exposición a la bacteria, probabilidad de exposición a antibióticos y severidad de la enfermedad de base subyacente (Loo, 2011). La exposición a antibióticos es el factor de riesgo modificable más importante. Cualquier antibiótico se asocia con CDI, pero las cefalosporinas de

CAPITULO II – JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO Y OBJETIVOS

tercera y cuarta generación, carbapenems, fluorquinolonas y la clindamicina presentan elevado riesgo (Hensgens, 2012; Pépin, 2005; Johnson, 1999). Este riesgo y su asociación con la CDI dependen de la prevalencia local de los ribotipos circulantes y de si son particularmente virulentos o bien resistentes al antibiótico administrado. El riesgo de CDI aparece al iniciar el tratamiento y durante los 3 meses posteriores a la finalización de la terapia, aunque el mayor riesgo dentro de este periodo (7 a 10 veces) ocurre durante el primer mes post administración antibiótica (Pépin, 2005). Por otra parte, los factores de riesgo para los casos de CDI provenientes de la comunidad no están exactamente definidos, aunque podrían asociarse al uso de antibióticos o a la edad avanzada.

La CDI supone un problema muy importante en cuanto a mortalidad, morbilidad y costes asociados que supone. Se ha evidenciado que la epidemiología de la CDI ha cambiado en los últimos años. Durante mucho tiempo se ha creído que la CDI ocurría únicamente en el ámbito hospitalario, pero la incidencia de casos provenientes de la comunidad parece que ha venido aumentando progresivamente, aunque es difícil estimar su incidencia. Durante la década de los 90, *C. difficile* fue una causa importante de diarrea nosocomial, de difícil manejo, pero de mortalidad baja. A principios del siglo XXI la situación cambió radicalmente ya que muchos estudios empezaron a alertar del aumento de la mortalidad que producía esta infección y de la asociación de estos casos más severos a una cepa anteriormente descrita como de escasa patogenicidad; el ribotipo 027 (Pépin, 2004).

C. difficile es una especie que presenta una gran diversidad genética, lo que hace que existan múltiples cepas circulantes. Por tanto, tenemos diferentes ribotipos circulantes y algunos de ellos se asocian a una mayor virulencia, debido a una variabilidad genética en cuanto a los factores de virulencia posibles. La producción de las exotoxinas TcdA y TcdB son el mayor factor de virulencia de *C. difficile* y su producción es la causa de la sintomatología de la CDI. La expresión de las toxinas se produce al entrar el microorganismo en la fase estacionaria de crecimiento y está en equilibrio bidireccional e influenciado por varios factores de tipo ambiental. Pueden producirse cambios en la región codificante de las toxinas que conforman una heterogeneidad genética, dando lugar a una serie de

CAPITULO II – JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO Y OBJETIVOS

diferentes toxintipos. Esto supone que haya cepas con diferente actividad y especificidad de sus toxinas con respecto a la cepa de referencia de *C. difficile* (Rupnik, 2016). A diferencia de la mayoría de las bacterias patógenas productoras de toxinas, donde los genes que las codifican son muy estables en cuanto a sus secuencias, con *C. difficile* no ocurre esto. Existe una alta tasa de mutación en tcdB. Es posible que esta variación toxintípica conduzca a una falta de protección inmunitaria y que la población carezca de ella al exponerse a cepas con variantes de toxinas. La tercera toxina de *C. difficile*, la toxina binaria o CDT hace unos años era muy infrecuente en cepas productoras de CDI (menos del 10%), pero en los últimos 10 años su prevalencia se ha incrementado de forma notoria (Rupnik, 2008). Esto es debido a que está frecuentemente asociada a las llamadas cepas hipervirulentas de reciente aparición (ribotipo 027 y 078 principalmente), las cuales presentan mayor tasa de mortalidad y morbilidad (Gerding, 2014).

Las toxinas desencadenan una respuesta inmune exacerbada que puede resultar patogénica, aunque de forma global, la respuesta inmune frente a *C. difficile* no está completamente dilucidada ya que también presenta efectos protectores. Este mecanismo dual demuestra la importancia de la relación entre las bacterias comensales intestinales y la respuesta inflamatoria del hospedador durante la infección. Es probable que la respuesta inmune sea polifacética y pueda adoptar los dos roles. La clave está en mantener un balance inflamatorio adecuado para combatir la infección limitando los efectos colaterales como los daños tisulares. El grado de severidad de la clínica producida por la CDI gira entorno a la intensidad y el tipo de respuesta inmune obtenida (Buonomo, 2016).

La interrelación entre la microbiota y el epitelio intestinal juega un papel importante en el modelaje de la respuesta inmune. Las alteraciones en la composición de la microbiota pueden provocar cambios en la reactividad de las células inmunes y esto puede contribuir en la severidad de la infección de *C. difficile*. Además, la microbiota intestinal induce de formación de capa mucosa y esto reduciría la inflamación al crear una barrera física entre la luz intestinal y el epitelio, y provocaría que las células dendríticas activen su capacidad reguladora de la respuesta inmune (Shan, 2013). El tratamiento antibiótico también produce un ambiente proinflamatorio intestinal ya que aumenta la traslocación bacteriana

CAPITULO II – JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO Y OBJETIVOS

desde el intestino al exterior, con la consecuente activación de una respuesta inmune desequilibrada.

El otro factor de virulencia más importante de *C. difficile* es su capacidad de formar esporas. Del morfotipo de esta spora latente, variable según la cepa, va a depender su patogenia y su transmisibilidad, ya que su forma vegetativa es de naturaleza anaeróbica estricta y es incapaz de sobrevivir en ambientes aeróbicos (Deakin, 2012). También, la germinación de las esporas, su mecanismo de activación, la cascada de reacciones que se producen y los factores que la afectan es clave para estudiar su posible modulación e inhibición y para comprender el efecto de la microbiota intestinal sobre ella. Además, también existe una variabilidad de activación de la germinación dependiente de la cepa. La germinación de las esporas de *C. difficile* comienza cuando los germinantes ácidos biliares y cogerminantes aminoácidos se unen a sus receptores específicos (Paredes-Sabja, 2014). Por tanto, los ácidos biliares intestinales juegan un papel clave en la colonización y patogénesis de *C. difficile*. Básicamente son derivados del colesterol sintetizados en el hígado, secretados en el duodeno, reabsorbidos en su mayor parte mediante circulación enterohepática y devueltos al hígado. Los ácidos biliares primarios que llegan al intestino grueso son biotransformados en ácidos biliares secundarios mediante enzimas secretados por la microbiota intestinal de forma específica. Esto es lo más importante ya que la depleción de bacterias que tienen dotación enzimática para obtener ácidos biliares secundarios generan una disminución de la resistencia a la infección (Buffie, 2015). Además, los ácidos biliares secundarios inhiben también el crecimiento y la actividad y cantidad de la toxina causante de la clínica (Thanissery, 2017). En estudios donde se observa la restauración de la microbiota intestinal en pacientes con CDI antes y después al FMT se ha evidenciado que la composición y cantidad de ácidos biliares son totalmente diferentes en ambas situaciones. La presencia de una carga elevada de ácidos biliares primarios y conjugados en muestras pre FMT sugiere su hidrólisis y transformación en ácidos biliares secundarios incompleta (Weingarden, 2014). La microbiota intestinal aporta dos enzimas que transforman los ácidos biliares primarios germinantes de *C. difficile*; BSH y BaiCD. BSH hidroliza los ácidos biliares conjugados en ácidos biliares libres. BaiCD es capaz de transformar los ácidos biliares primarios en secundarios. Las bacterias cuyo

CAPITULO II – JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO Y OBJETIVOS

genoma codifique estas enzimas producirían un efecto inhibitorio sobre la germinación de las esporas de *C. difficile*. BaiCD se encuentra presente en muy pocos grupos de bacterias, que representan menos del 0,025% de la microbiota intestinal normal (Winston, 2016), principalmente dentro del *phylum* Firmicutes en los géneros *Clostridium*, *Eubacterium* y *Blautia* (Buffie, 2015). Por tanto, la disbiosis intestinal secundaria a un tratamiento antibiótico conducirá en el intestino grueso a un descenso en el metabolismo de los ácidos biliares germinantes y a una rápida absorción de los ácidos biliares inhibidores, produciendo un desbalance entre los procesos de inhibición y germinación de las esporas de *C. difficile*, estableciéndose un nicho ecológico muy favorable para su proliferación.

Llegados a este punto hemos establecido la importancia actual de la CDI por diferentes motivos: el fuerte impacto sanitario que supone, el cambio en su epidemiología global con la aparición de cepas hipervirulentas, la variabilidad genética particularmente elevada de *C. difficile* que le confiere unas propiedades variables en cuanto a virulencia debido a la multitud de ribotipos circulantes, y la estrecha relación con la microbiota intestinal. Pero no hemos tratado de una situación como es el estado de colonización asintomática de *C. difficile*. En este grupo de individuos colonizados centraremos parte del estudio para intentar esclarecer que aspecto diferencial presentan en su microbiota intestinal que hace que no desarrollen CDI, es decir, que no se establezca la clínica. La tasa de portadores asintomáticos es muy variable y depende de la edad, siendo bastante elevada en niños, mientras que en adultos va a depender de las características de la población que estudiemos. De forma general, esta incidencia es más elevada en caso de contacto con ámbitos hospitalarios y en ciertas situaciones concomitantes que favorecen la colonización como ocurre en los pacientes con fibrosis quística y enfermedad inflamatoria intestinal (McDonald, 2018). La naturaleza del estado de colonización suele ser transitoria y sin sintomatología, siempre y cuando no haya una exposición repetida a factores de riesgo. Los pacientes con diarrea y con evidencia de presencia de cepas no toxigénicas de *C. difficile* siempre deben ser considerados portadores asintomáticos, ya que no hay evidencia de que las cepas no toxigénicas sean capaces de producir clínica.

CAPITULO II – JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO Y OBJETIVOS

El interés por saber los mecanismos mediante los cuales la microbiota intestinal de un paciente sano es capaz de prevenir la colonización de *C. difficile* y la CDI es bastante reciente. Se ha visto que los antibióticos tienen efectos profundos y duraderos en la estructura de la microbiota intestinal, afectando tanto a su riqueza como a su diversidad (Antonopoulos, 2016). Ambas situaciones disminuyen la resistencia a la colonización por *C. difficile*. Asimismo, la diversidad disminuida no es recuperable en pacientes con CDI recurrente, mientras que en pacientes con CDI recuperada vuelve a valores normales (Chang, 2008).

Un aspecto esencial es que el metabolismo de *C. difficile* en el contexto de la microbiota intestinal que ha colonizado está íntegramente relacionado con su patogénesis. El desarrollo de la CDI involucra a dos mecanismos claves como son el metabolismo de los ácidos biliares y la competición con otras bacterias por los nutrientes (Britton, 2012). Otros mecanismos también importantes serían la síntesis de antibacterianos peptídicos que estaría disminuida cuando la microbiota pierde riqueza, y la existencia de una comunicación entre el sistema inmune y la microbiota intestinal que también se vería alterada en una disbiosis (Hryckowian, 2017). Con respecto al metabolismo de los ácidos biliares y su influencia en la patogénesis de la CDI, Buffie y col. en 2015, encontraron que la inhibición de la germinación de las esporas de *C. difficile* es uno de los mecanismos inhibitorios del desarrollo de infección principales que ocurren en los individuos colonizados que no desarrollan clínica. Asimismo, esto sería posible gracias a escasos grupos de bacterias que actuarían favoreciendo la síntesis de ácidos biliares secundarios (con acción inhibitoria de la germinación), debido a la síntesis del enzima BaiCD. Estas bacterias pertenecerían a diferentes especies del género *Clostridium*, sobre todo del *cluster Clostridium XIVa* y otros géneros como *Blautia* y *Eubacterium* (Buffie, 2015). Por otra parte, la capacidad del FMT de curar la CDI recurrente con un éxito de casi el 100% apoya la idea de que la restauración de la microbiota intestinal es un proceso clave. Asimismo, este hecho implica que varios grupos de bacterias estarían implicados en prevenir o tratar la CDI (Britton, 2014). Al estudiar la restauración de la microbiota intestinal en pacientes con CDI sometidos a FMT, se ha evidenciado que la composición y cantidad de los ácidos biliares son totalmente diferentes en ambas situaciones

CAPITULO II – JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO Y OBJETIVOS

(Weingarden, 2014), evidenciándose un predominio superior de ácidos biliares primarios germinantes en los pacientes con CDI no tratada con respecto a la tratada y curada.

La pérdida de la resistencia a la colonización por patógenos intestinales como *C. difficile* al administrar antibióticos, provoca una pérdida de diversidad y riqueza que disminuye la competición por los nutrientes y deja vía libre para nichos ecológicos antes inaccesibles. Para apoyar la idea del desplazamiento del nicho ecológico mediante mecanismos competitivos, la colonización en ratones con cepas no toxigénicas de *C. difficile* previamente a la colonización con cepas toxigénicas, previene completamente la aparición de colitis. Esto es debido a que la cepa no toxigénica ocupa el nicho que la cepa toxigénica ocuparía y, por tanto, es incapaz de colonizar (Sambol, 2002).

Asimismo, la reducción de los AGCC que se suele observar en una disbiosis se ha asociado también a pérdida de resistencia a la colonización, ya que se ha visto que inhiben la expansión de *C. difficile* por diferentes mecanismos. Entre ellos estarían la disminución del pH luminal y los efectos antiinflamatorios del ácido butírico, con reducción de la permeabilidad, aumento de la producción de mucina y aumento de la síntesis de péptidos antimicrobianos. La caída de los grupos butirogénico, presentes sobre todo en las familias Lachnospiraceae y Ruminococcaceae, provocaría un mayor riesgo o susceptibilidad de desarrollo de CDI (Ross, 2016).

Por consiguiente, la microbiota intestinal de un individuo sano, mediante los mecanismos de resistencia a la colonización puede ser una de las claves de la prevención de la CDI. Descubrir cuál es el patrón de disrupción de la microbiota intestinal en casos de colonización asintomática por *C. difficile* o CDI, nos permitiría entender los mecanismos subyacentes, encontrar especies o grupos protectores o predisponentes y poder diseñar en un futuro nuevas terapias moduladoras con bacterias probióticas más enfocadas y precisas. Debido a la gran variabilidad en la composición de la microbiota intestinal que encontramos en controles sanos, la mejor forma de caracterizar estos procesos sería mediante estudios prospectivos, antes y después de una colonización por *C. difficile* o una

CAPITULO II – JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO Y OBJETIVOS

CDI. Este abordaje es costoso y se prolongaría mucho en el tiempo en la práctica. Debido a esto la alternativa que planteamos es la comparación de tres cohortes de individuos: pacientes con CDI, pacientes colonizados por *Clostridium Difficile* y controles sanos. Hasta la fecha, los estudios que han incorporado una cohorte de individuos colonizados son bastante escasos y con pequeño tamaño muestral, quizás por la dificultad de incorporar sujetos a este grupo. Esto ha hecho que la interpretación de los resultados sea bastante compleja. No obstante, la composición de la microbiota intestinal en los pacientes con CDI ha sido mostrada y caracterizada en varios trabajos, evidenciando unas diferencias en cuanto a composición y estructura totalmente diferentes a la de los controles sanos. Lee y col. en 2017, estudiando la microbiota intestinal de 53 pacientes con CDI, identificaron 3 grupos de bacterias identificadas como protectoras de forma significativa de CDI: el *phylum* Bacteroidetes y las familias Lachnospiraceae y Ruminococcaceae. Además, concluyeron que la pérdida de diversidad no era un factor predictivo de desarrollo inexcusable hacia CDI, afirmando que se requieren otros factores que intervengan en este fenómeno (Lee, 2017). Otro hecho importante es que la disbacteriosis es más profunda en pacientes con CDI recurrente. Weingarden y col. en 2014 estudiaron la resaturación de la microbiota intestinal en pacientes con CDI sometidos a FMT. La diversidad fue significativamente más elevada en las muestras “post FMT” que en las muestras “pre FMT”, debido a los cambios la composición en los *phylum* Bacteroidetes, Firmicutes y Proteobacteria. Las muestras de los donantes, representativas de una microbiota sana estaba compuesta por Bacteroidetes-Firmicutes principalmente, con muy poca abundancia de Proteobacteria. Por el contrario, las muestras “pre FMT” tendían a ser dominadas por Proteobacteria. De forma notable, se observaron también dramáticas alteraciones a nivel de familia. Lachnospiraceae, Bacteroidaceae y Ruminococcaceae comprendieron el 50% de las OTUs de cada muestra de donante. Por el contrario, estas familias se encontraron en mucha menor abundancia en las muestras “pre FMT”. Por el contrario, aparecieron Enterobacteriaceae, Veillonellaceae y Verrucomicrobiaceae, componentes menores de la microbiota intestinal de los donantes de heces, pero que representaron alrededor del 50% de las OTUs en las muestras “pre FMT”. Después del FMT el patrón de la microbiota a nivel de familia revirtió (Weingarden, 2014). Este estudio nos indicaría que la disbacteriosis existente en la

CAPITULO II – JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO Y OBJETIVOS

CDI se basa en la pérdida de Firmicutes y Bacteroidetes y la ganancia de enterobacterias, grupo de bacterias potencialmente patógenas u oportunistas, además de una pérdida fehaciente de bacterias productoras de butirato. Este puede que sea el hallazgo más evidente que encontramos en estos pacientes. Estos resultados se han sustentando en otros trabajos (Antharam, 2013). Milani y col. en 2016 mediante la combinación de estudios moleculares metagenómicos y metabolómicos en 25 pacientes con CDI, en 29 pacientes con exposición a antibióticos, pero sin CDI y en 30 pacientes sin exposición antibiótica ni CDI también intentó caracterizar la microbiota intestinal de los pacientes con CDI para dilucidar los mecanismos que subyacen en este proceso. Se encontraron varios géneros disminuidos en los pacientes CDI como *Faecalibacterium*, *Bifidobacterium*, *Akkermansia*, *Bacteroides*, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae* y *Alistipes*, todas bacterias con funciones beneficiosas. Asimismo, aparte de la familia Peptostreptococcaceae que incluye actualmente a *Clostridium Difficile*, se encontraron varios grupos de bacterias patógenas o patógenas oportunistas aumentadas en el grupo CDI, como *Klebsiella*, *Escherichia/Shigella*, *Sutterella*, *Enterococcus*, *Citrobacter*, *Veilonella*, *Proteus*, *Helicobacter*, *Morganella*, *Hafnia*, *Corynebacterium* y *Staphylococcus* (Milani, 2016). Gu y col. en 2016, en un estudio similar, observaron además que bacterias productoras de ácido láctico, como las familias Enterococcaceae, Streptococcaceae y Lactobacillaceae aumentan dramáticamente en CDI.

El **objetivo principal de este estudio** es la comparación de la microbiota intestinal entre un grupo de pacientes con CDI y un grupo de individuos colonizados por *C. difficile* con respecto a un grupo de controles sanos. Como hemos visto, los estudios sobre la microbiota intestinal en determinadas situaciones patológicas son bastante recientes, debido a la instauración de los métodos moleculares basados en la secuenciación de ADNr 16S bacteriano. Más concretamente los estudios sobre microbiota intestinal en pacientes con CDI ha ayudado hasta la fecha a descubrir algunos de los mecanismos de resistencia la colonización, germinación y expansión de *C. difficile*. Caracterizar el patrón de la disbacteriosis que se produce nos permitiría entender los mecanismos que subyacen, encontrar grupos de bacterias protectores o predisponentes a CDI y con esto poder diseñar nuevos probióticos con acción preventiva o terapéutica. Es un

CAPITULO II – JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO Y OBJETIVOS

hecho que la interpretación de los datos obtenidos es compleja y que la variabilidad intraindividual de la microbiota es considerable. Debido a lo costoso de los estudios prospectivos, en los que se necesita un periodo de tiempo de seguimiento con análisis repetidos en los pacientes para evaluar la evolución temporal de las mismo y su relación con determinada intervención, se suele optar por comparar los resultados de dos cohortes con características diferentes evaluando la relación entre esas diferencias y los patrones de la microbiota intestinal en ambas. En este sentido, comparar la microbiota intestinal en pacientes con CDI con respecto a individuos colonizados por *C. difficile* que no presentan clínica (o si la presentan se puede demostrar que es debido a otras causas) ha sido poco estudiado. Este enfoque puede aportar información relevante sobre la susceptibilidad o protección frente al desarrollo de CDI desde la fase de portador (colonización). Es interesante saber porque muchos pacientes que están colonizados de forma transitoria permanecen en ese estado un tiempo prolongado sin desarrollar clínica. De los pocos trabajos al respecto, se obtienen similitudes y diferencias entre estos dos grupos estudiados (Rea, 2012; Zhang, 2015; Han, 2019). Además, estos estudios son diferentes en algunos aspectos. Por consiguiente, consideramos muy interesante nuestro abordaje en base a todo lo expuesto anteriormente.

III-HIPÓTESIS.

CAPÍTULO III: HIPÓTESIS.

La hipótesis de trabajo que manejamos es que la microbiota intestinal de los pacientes con CDI y de los individuos colonizados por *C. difficile* es muy diferente en cuanto a diversidad, riqueza, estructura y composición con respecto a los controles sanos, pero no obstante es bastante similar entre si. Las diferencias existentes en los individuos colonizados e infectados por *C. difficile* al respecto de la microbiota intestinal se situarían en un conjunto de disimilitudes en la composición, que explicarían, al menos en parte, la no evolución desde un estado de colonización, que se observa en algunos casos, a un estado de infección con desarrollo de clínica y sintomatología.

IV-MATERIAL Y MÉTODOS.

CAPITULO IV. MATERIAL Y MÉTODOS.

4.1 DISEÑO DEL ESTUDIO.

Este trabajo de tesis doctotal es el resultado de un un estudio descriptivo observacional transversal, donde comparamos la microbiota intestinal de 15 pacientes con CDI, 15 individuos colonizados por *C. difficile* y 15 controles sanos. Los sujetos de estudio fueron incluidos desde el Hospital Universitario del Vinalopó (Elche). El estudio fue aprobado por la Comisión de Investigación del Hospital Universitario del Vinalopó el día 9 de noviembre de 2017.

Se definió como un caso de CDI aquel que presentaba diarrea (3 deposiciones o más catalogadas a partir del tipo 5 en la escala Bristol en las últimas 24 horas), colitis pseudomembranosa o megacolon tóxico (McDonald, 2018; Surawicz, 2013) y donde se evidencia la presencia de *C. difficile* toxigénico mediante las siguientes pruebas de laboratorio:

- Detección de las toxinas TcdA y/o TcdB y/o de la GDH de *C. difficile* en heces mediante inmunocromatografía.
- Detección del gen tcdB de la toxina TcdB de *C. difficile* en heces mediante PCR.
- Detección del gen TPI (*triose phosphate isomerase*) de *C. difficile* en heces mediante PCR.

Por otra parte, en la definición de caso colonizado por *C. difficile* el individuo debía presentar ausencia de síntomas digestivos o en caso de tener diarrea tuvo que ser atribuible a otras causas, junto con las pruebas de laboratorio mencionadas para los casos de CDI para evidenciar la presencia de *C. difficile* en heces, teniendo en cuenta que las cepas no toxigénicas (No detección del gen tcdB de la toxina TcdB de *C. difficile* en heces mediante PCR y detección del gen TPI de *C. difficile* en heces mediante PCR) siempre fueron incluídas en individuos colonizados únicamente (Gerding, 2015)

CAPÍTULO IV - MATERIAL Y MÉTODOS

4.1.1 Criterios de inclusión y de exclusión.

Los criterios de inclusión para el grupo de los pacientes con CDI (a partir de ahora lo llamaremos grupo CDI) fueron los siguientes:

- Paciente mayor de 15 años.
- Presencia de diagnóstico clínico y microbiológico de CDI.
- Firma de consentimiento informado.

Por otra parte, los criterios de inclusión para el grupo de individuos colonizados por *C. difficile* (a partir de ahora lo llamaremos grupo P) fueron los siguientes:

- Individuo mayor de 15 años
- Ausencia de manifestaciones clínicas compatibles con CDI. En caso de presentar diarrea ha de poder ser atribuida a otras causas diferentes.
- Evidencia de la presencia de *C. difficile* en heces mediante diagnóstico microbiológico.
- Firma de consentimiento informado.

Con el fin de que ambos grupos fueran homogéneos y disminuir la variabilidad de la microbiota relacionada con la edad, en este estudio no se incluyeron pacientes pediátricos, ya que estos presentan una elevada tasa de colonización de *C. difficile* "fisiológica"

Con respecto a los controles sanos (a partir de ahora lo llamaremos grupo CTRL), los criterios de inclusión fueron los siguientes:

- Voluntarios sin síntomas digestivos.
- Pruebas negativas para la detección de *C. difficile* en heces.
- No administración antibiótica en los últimos tres meses.
- Firma de consentimiento informado.

4.1.2 Inclusión de los pacientes en el estudio.

En la siguiente figura describiremos el algoritmo multinivel para el diagnóstico de CDI que se aplica en el Hospital Universitario del Vinalopó (Alcalá-Hernández, 2016):

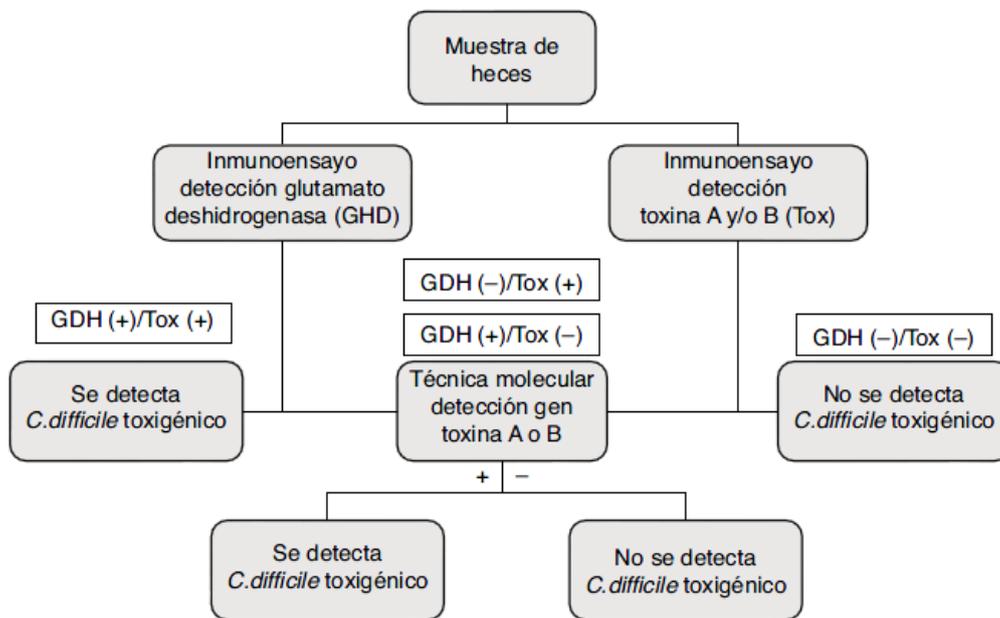


FIGURA 15: Algoritmo diagnóstico de la CDI multinivel. (Alcalá-Hernández, 2016).

La inclusión de los sujetos de los grupos CDI y P estuvo basada en la forma convencional de diagnóstico de la CDI del Hospital Universitario del Vinalopó. El hecho de pertenecer a un grupo u otro fue determinada por las manifestaciones clínicas que presentaban los sujetos, como hemos visto en los criterios de inclusión, que quedó evidenciada mediante revisión de las historias clínicas.

Puesto que la identificación de individuos colonizados por *C. difficile* no estaba implementada en la práctica asistencial y resulta dificultoso que los médicos soliciten la determinación de toxinas y GDH de *C. difficile* sin sospecha clínica de CDI, se realizaron varias estrategias para aumentar su captación. alguna de ellas fue consensuar un *screening* general con los facultativos

CAPÍTULO IV - MATERIAL Y MÉTODOS

responsables de alguna localización teórica de elevada tasa de portadores asintomáticos como la unidad de hemodiálisis, cuidados intensivos, residencias de la 3º edad, etc.

4.1.3 Características de los grupos de estudio.

Las características clínicas y demográficas de los grupos de estudio quedan descritas en la siguiente tabla:

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y DEMOGRÁFICAS	GRUPO CDI	GRUPO P	GRUPO CTRL
SEXO, n (%)			
HOMBRES	4	10	7
MUJERES	11	5	8
EDAD (MEDIA + SD)	69 ± 19	51 ± 26	44 ± 12
ANTIBIÓTICOS PREVIOS (ULTIMOS 3 MESES), n (%)	14 (93%)	8 (53%)	No aplica
CEFALOSPORINAS	5 (33%)	2 (13%)	No aplica
FLUORQUINOLONAS	4 (27%)	2 (13%)	No aplica
B-LACTÁMICOS	5 (33%)	3 (20%)	No aplica
CLINDAMICINA	1 (7%)	0 (0%)	No aplica
OTROS ANTIBIÓTICOS	5 (33%)	4 (27%)	No aplica
SIN TOMAR ANTIBIÓTICOS, n (%)	1 (7%)	2 (13%)	No aplica
DESCONOCIDO, n (%)	0 (0%)	4 (27%)	No aplica
TIPO DE CEPA, n (%)			No aplica
CEPA TOXIGÉNICA	15 (100%)	8 (53%)	No aplica
CEPA NO TOXIGÉNICA	0 (0%)	7 (47%)	No aplica
DIARREA, n (%)	15 (100%)	7 (47%)	No aplica
COMORBILIDADES			No aplica
ENFERMEDAD HEPÁTICA	1 (7%)	0 (0%)	No aplica
ENFERMEDAD DE CROHN	1 (7%)	0 (0%)	No aplica
HEMOPATÍA MALIGNA	2 (13%)	0 (0%)	No aplica
ENFERMEDADES INTESINALES	3 (20%)	0 (0%)	No aplica
OTRAS COMORBILIDADES	13 (87%)	6 (40%)	No aplica
HISTORIA PREVIA DE CDI	2 (13%)	0 (0%)	No aplica
PROCEDENCIA, n (%)			No aplica
HOSPITALIZACIÓN	7 (47%)	2 (13%)	No aplica
COMUNIDAD	8 (53%)	13 (87%)	No aplica
RESOLUCIÓN, n (%)			
COMPLETA	11 (73%)	No aplica	No aplica
EXITUS	3 (20%)	No aplica	No aplica
RECURRENCIA POSTERIOR	1 (7%)	No aplica	No aplica

TABLA 1: Características clínicas y demográficas de los grupos de estudio.

CAPÍTULO IV - MATERIAL Y MÉTODOS

4.1.4 Recogida y Almacenamiento de las muestras de heces.

Una vez identificados los sujetos de estudio mediante la revisión de la base de datos con los casos con diagnóstico microbiológico en el periodo de enero a diciembre de 2018, se contactó con los pacientes y se le proporcionó una hoja informativa donde se explicaba brevemente el estudio. También se les entregó el consentimiento informado que firmaron todos aquellos que consintieron participar en el estudio y cumplían todos los criterios de inclusión.

, haciéndoles hincapié en la importancia de que una vez obtenida la muestra de heces, debía llegar lo más pronto posible al laboratorio del Hospital Universitario del Vinalopó. En caso de ser recogida el día anterior, era imprescindible su refrigeración y almacenamiento en nevera.

Para la recogida de la muestra de heces se hizo hincapié en la importancia de que una vez obtenida, debía llegar lo más pronto posible al laboratorio del Hospital Universitario del Vinalopó de Elche. En caso de ser recogida el día anterior, era imprescindible su refrigeración y almacenamiento en nevera. Una vez la muestra de heces llegó al laboratorio, se procedió a congelarla a -80°C hasta su procesamiento para el análisis de la microbiota intestinal.

4.2 PRUEBAS DE LABORATORIO PARA EL DIAGNOSTICO DE LOS PACIENTES CON CDI E IDENTIFICACIÓN DE LOS INDIVIDUOS COLONIZADOS POR *C. DIFFICILE*.

4.2.1 Determinación de TcdA/TcdB y GDH en heces

La determinación en heces de TcdA/TcdB y GDH se realizó en el laboratorio del Hospital Universitario del Vinalopó. Se utilizó el kit *C. difficile GDH-toxins A-B MonlabTests* (Código MO-804022) de la casa comercial Monlab (Barcelona, España), siguiendo las indicaciones del fabricante.

La prueba *C. difficile GDH-toxins A-B MonlabTests* es un test rápido que permite la detección cualitativa simultáneamente de TcdA, TcdB y GHD. Se trata de un método inmunocromatográfico, en donde en la fase estacionaria que

CAPÍTULO IV - MATERIAL Y MÉTODOS

consiste en una membrana, se adsorben anticuerpos específicos frente a TcdA, TcdB y GDH. Si se diera presencia de alguna de ellas en la muestra de heces, previamente diluida, se produciría una reacción específica al añadir un anticuerpo conjugado que se manifestará mediante una banda de color.

4.2.2 Determinación de los genes *tcdB* y TPI de *C. difficile*.

A las muestras a las que se les detectó TcdA/TcdB y/o GDH en heces se les determinó la presencia de los genes *tcdB* y TPI, específicos de *C. difficile*. Se utilizó el kit *FluoroType CDiff*, específico para el instrumento *FluoroCycler* de la casa comercial Hain Lifescience (Nehren, Alemania). La presencia en heces del gen *tcdB* pondría de manifiesto que existe una cepa toxigénica de *C. difficile*, mientras que la presencia del gen TPI solo pondría de manifiesto la presencia de *C. difficile* (gen constitutivo de cepa toxigénica o no toxigénica. Ambos resultados deben valorarse en conjunto. Los dos resultados positivos posibles serían:

- *tcdB*+/*tpi*+: Presencia de *C. difficile* Toxigénico.
- *tcdB*-/*tpi*+: Presencia de *C. difficile* No Toxigénico.

El procedimiento de la prueba constó de dos fases principales. El primer paso fue la extracción del ADN de las muestras de heces y se utilizó para ello el kit *GXT Stool Extraction*, adaptado específicamente para el instrumento *GenoXtract* de la casa comercial Hain Lifescience (Nehren, Alemania). Al ADN extraído se le adicionaron 2 mezclas de amplificación y detección. La primera llevaba los nucleótidos, el buffer y la Taq polimerasa. El segundo llevaba las sondas de ADN de detección marcadas con fluorescencia, el buffer y los *primers*. El fundamento es que la sonda si no se une a su cadena complementaria de ADN no emite fluorescencia, puesto que es amortiguada (fenomeno de *Quenching*) por las bases contiguas. En caso de unirse a su cadena ADN complementaria, el fluoróforo se libera porque la base contigua no ejerce este efecto sobre él.

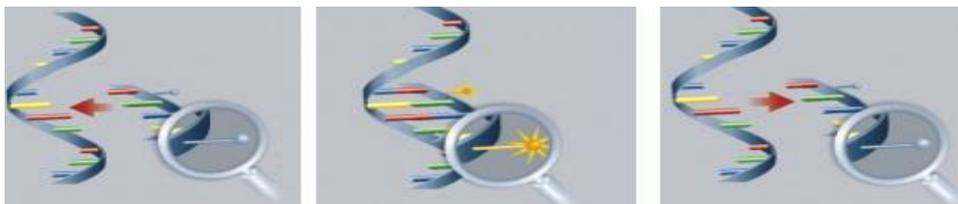


FIGURA 21: Funcionamiento de una Sonda Fluorescente en *FluoroCycler*.

CAPÍTULO IV - MATERIAL Y MÉTODOS

Una vez realizada la mezcla con los reactivos específicos se introdujo en el instrumento *FluoroCycler* para su amplificación mediante PCR e hibridación. Después de esto, los fluoróforos de las sondas específicas para los genes de *C. difficile* estudiados fueron excitados mediante luz en el *FluoroCycler*, emitiéndose una fluorescencia que fue medida, mientras se fue elevando la temperatura gradualmente. Si los genes *tcdB* y/o *TPI* estaban presentes en la muestra de ADN, aparecerían dos picos durante la construcción de la curva de *melting*.

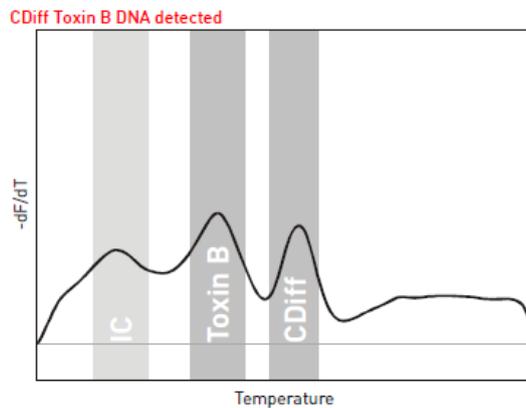


FIGURA 22: Ejemplo de curva de *melting* con dos picos para *tcdB* y *tpi*. IC: Control Interno.

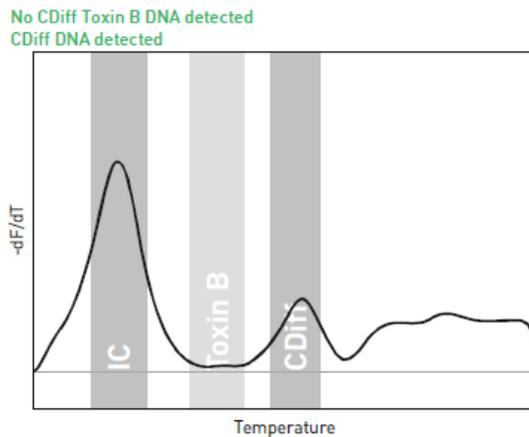


FIGURA 23: Ejemplo de curva de *melting* con un pico para *TPI*. IC: Control Interno.

CAPÍTULO IV - MATERIAL Y MÉTODOS

4.3 DETERMINACIÓN METATAXONÓMICA DE LA COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL.

En este apartado se describirá la metodología que se siguió para determinar la composición de la microbiota intestinal mediante la amplificación del gen que codifica la subunidad 16S del ribosoma bacteriano, su secuenciación masiva y como se realizó la asignación taxonómica de las secuencias obtenidas.

El gen bacteriano ADNr 16S, con un tamaño aproximado de 1500 pb, presenta estructura muy conservada. Se utiliza de forma universal en la identificación taxonómica puesto que presenta regiones variables que han acumulado cambios genéticos que nos permite diferenciar bacterias filogenéticamente próximas.

En el presente estudio, realizamos la determinación metataxonómica de la composición de la microbiota intestinal de los grupos de pacientes con CDI y de individuos colonizados por *C. difficile*, así como de los controles sanos, en el Servicio de Secuenciación de la Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunitat Valenciana (Fisabio).

4.3.1 Extracción del ADN.

Para la extracción del ADN se utilizó el robot *MagNA Pure 2.0 LC* (Código 0519768600) y el kit *MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit - Large Volume* (Código 03264793001), ambos de la casa comercial ROCHE (Mannheim, Alemania). A las muestras de heces se le añadieron tampón PBS 1.5 veces en volumen y se vortearon hasta conseguir una solución homogénea. A continuación, se centrifugaron a 2000 rpm 5 minutos y se recogió el sobrenadante. 500 µl de este sobrenadante fue sometido a la extracción automática del ADN siguiendo las instrucciones del fabricante de acuerdo al *protocol total NA external lysis*.

Para valorar una correcta extracción, la cuantificación del ADN obtenido de cada muestra se realizó mediante el lector *Qubit Fluorometric Quantitation*

CAPÍTULO IV - MATERIAL Y MÉTODOS

(Código Q33226) de la casa comercial ThermoFisher Scientific (Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) mediante el kit *Qubit 1x dsDNA HS Assay* (Código Q33231). La medición de la concentración mediante este lector está basada en emisión de fluorescencia a diferencia de la lectura de la absorbancia ultravioleta que se ha venido utilizando en los últimos tiempos. Con esto se consigue una mayor especificidad de lectura de ADN sobre el ARN. La concentración mínima aceptable fue de 5 ng/dL.

4.3.2 Amplificación y secuenciación del ADN.

Los amplicones del gen ADNr 16S bacteriano fueron obtenidos siguiendo el protocolo *16S rDNA gene Metagenomic Sequencing Library Preparation Illumina protocol* (Código 15044223 Revisión A), de la casa comercial Illumina (San Diego, California, Estados Unidos). Las secuencias específicas amplificadas están en la región V3 y V4 (459 bp) del gen ADNr 16S. Los *primers* específicos fueron seleccionados a partir de bibliografía vigente al respecto (Klindworth, 2013):

16S rDNA gene Amplicon PCR Forward Primer = 5'

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG

16S rDNA gene Amplicon PCR Reverse Primer = 5'

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC

FIGURA 24: Nomenclatura IUPAC del *Forward primer* y *Reverse primer* utilizados en la secuenciación del gen ADNr 16S bacteriano.

En cada pocillo (hay 96 pocillos por plato) de reacción de PCR se puso el ADN extraído de las heces a concentración de 5 ng/dL, los *reverse* y *forward primers* y la ADN polimerasa del kit *KAPA HiFi HotStart ReadyMixPCR* (Código

CAPÍTULO IV - MATERIAL Y MÉTODOS

KK2602) de la casa comercial Kapa Biosystems (Wilmington, Massachusetts, Estados Unidos), siguiendo el protocolo mencionado. A continuación, se introdujo el plato de muestras en el termociclador y se procedió a realizar el siguiente ciclo de temperaturas:

- Desnaturalización inicial: 3 minutos a 95°C.
- 25 ciclos: 30 segundos a 95°C + 30 segundos a 55°C + 30 segundos a 72°C.
- 5 minutos a 72°C.
- Fin de la reacción mediante enfriamiento a 4°C

Previamente a la secuenciación se tuvieron que preparar, adaptar, purificar y normalizar los amplicones al modelo de secuenciación Illumina mediante fragmentación enzimática. Se utilizó el *Nextera XT index kit v2* (Código FC-131-2001). Para asegurar la normalización de tamaño se procesó 1µL del producto de la PCR en un 2100 *Bioanalyzer instrument* usando un *Bioanalyzer DNA 1000 chip* de la casa comercial Agilent (Santa Clara, Estados Unidos). El tamaño esperado debe ser sobre 550 bp.

Las librerías de amplicones fueron secuenciadas en un *MiSeq Sequencer* de la casa comercial Illumina (San Diego, California, Estados Unidos) siguiendo las especificaciones del fabricante, utilizando el *MiSeq Reagen kit v3* (Código MS-10223001). El Sistema Illumina aplica un método de secuenciación basado en la polimerización del ADN, donde la incorporación de un nucleótido marcado con fluorescencia y protegido en la cadena nascente impide que siga creciendo. Después de detectar la señal fluorescente se elimina el grupo protector pudiéndose incorporar otro nucleótido marcado e iniciar un nuevo ciclo. Para ello, básicamente consiste en un cartucho de un solo uso que contiene reservorios con sello metálico prerrellenos con los reactivos de secuenciación y *clustering*, junto con una *flow cell* que consiste en una placa con carriles hechos de vidrio donde las reacciones de secuenciación se producen. La secuenciación se realizó usando un ciclo 2x300pb *paired-end*, como recomienda el fabricante. El *mix* de amplicones fue reforzado con *PhiX control* (Código FC-110-3001), con el fin de mejorar la incorporación de bases durante la secuenciación como recomienda el fabricante Illumina.

CAPÍTULO IV - MATERIAL Y MÉTODOS

4.3.3 Análisis bioinformático de las secuencias de amplicones del gen bacteriano ADNr 16S y asignación taxonómica.

El análisis bioinformático constó de varias etapas. En primer lugar, se realizó un control de calidad de las secuencias obtenidos y una eliminación de las secuencias quiméricas, entre otros procesos de filtrado. Después ya se pudo proceder a la asignación taxonómica.

El formato de los archivos de las secuencias obtenidas en bruto fue FASTQ, que suele ser el estándar actual y es el que proporciona el sistema de secuenciación Illumina.

En la fase de control de calidad el objetivo es el filtrado y recorte (*trimming*) de las secuencias con el fin de eliminar aquellas cortas o de baja calidad. Con esto nos aseguramos una buena asignación taxonómica (Schmieder, 2011). Este proceso fue realizado mediante el programa prinseq-lite (<http://prinseq.sourceforge.net>). Se aplicó una longitud mínima de secuencia de 50 nucleótidos (*min_length: 50*). Además, se aplicó un recorte de base por base desde la derecha, midiéndose que la calidad no bajara del umbral de 30 en una ventana de 20 nucleótidos usando la media (*trim_qual_right: 30, trim_qual_type: mean, trim_qual_window: 20*).

Se debe tener en cuenta que los sistemas Illumina proporcionan las secuencias desaparejadas R1 y R2 (*forward/reverse*), y estas deben ser aparejadas para para obtener el amplicón completo.

A continuación, mediante el *pipeline* DADA2 (<https://benjjneb.github.io/dada2/index.html>), se procedió a realizar otro control de calidad y para la corrección de errores que supuestamente produce Illumina durante la amplificación se realizó un *trimming* a 280 y 210 bp en R1 y R2, se unieron y se buscó las secuencias quiméricas para eliminarlas. Las secuencias quiméricas son productos erróneos de la amplificación, pero son detectables puesto que los extremos difieren mucho en cuanto a su asignación taxonómica. El pipeline DADA2 introduce un método novedoso de corrección de errores, ya que

CAPÍTULO IV - MATERIAL Y MÉTODOS

es capaz de discriminar con mejor exactitud errores de amplificación de secuencias biológicas variantes (Callahan, 2016)

Para el análisis metataxonómico de las secuencias se utilizó el programa QIIME 2 (<http://qiime.org>), el cual permite mediante *plugins* de acceso libre realizar la amplia mayoría de los análisis necesarios para el estudio de la microbiota, obtención de gráficas y estadísticas. Mediante un *pipeline* diseñado específicamente a tal efecto, escrito en entorno RStatistics (<https://cran.r-project.org/index.html>) se concatenan todos los pasos y se genera el flujo de trabajo desde que obtenemos las secuencias hasta el informe final.

La asignación taxonómica fue realizada utilizando la base de datos SILVA_release_132 (<https://www.arb-silva.de>) (Quast, 2013). Para las afiliaciones taxonómicas se usó un clasificador bayesiano *naive* (<https://github.com/qiime2/q2-feature-classifier>) integrado en QIIME 2. Cada OTU correlacionó por definición en un 97% con la secuencia que se precie de la base de datos.

Los estudios ecológicos de diversidad y riqueza fueron realizados mediante el *plugin Community Ecology Package* (<https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/index.html>).

4.4 EXPRESIÓN DE RESULTADOS.

Los resultados que obtenemos se expresan en su forma original como abundancia relativa en porcentajes de los diferentes *phylum*, clase, orden, familia y género. Para comparar la estructura de la microbiota intestinal de los grupos de estudios utilizamos conceptos provenientes de la ecología microbiana como la diversidad y la riqueza.

4.4.1 Estructura de las comunidades microbianas.

Los ecosistemas microbianos suelen tener pocas especies con muchos individuos y muchas especies con pocos individuos. Las especies menos abundantes determinan la diversidad específica del nivel trófico y en general de

CAPÍTULO IV - MATERIAL Y MÉTODOS

todo el nicho ecológico. La diversidad disminuye cuando alguna población alcanza una elevada densidad, puesto que significa que ha superado la competencia y domina el ecosistema. Los nichos ecológicos complejos, con riqueza de especies, es decir un número elevado de especies diferentes, requieren una energía menor para mantenerse.

La diversidad de especies permite una gran variedad de respuestas ante cambios dinámicos en el ecosistema. En comunidades microbianas dominadas por factores biológicos, como la microbiota intestinal, la estabilidad se asocia a una elevada diversidad, aunque no es posible definir una causa-efecto establecida.

No existe una población única esencial en una microbiota intestinal, o en general, en un ecosistema microbiano, con una elevada diversidad. Si se elimina una sola población la estructura no se altera, pero se desconoce que diversidad es la requerida para mantener la estabilidad de un nicho ecológico.

El hecho que los ecosistemas diversos pueden aguantar fluctuaciones y agresiones de su entorno no significa que puedan superar todas ellas cuando son continuadas (Atlas, 2002).

4.4.2 Estudio de la diversidad y riqueza de la microbiota intestinal.

La forma más simple de expresar la riqueza de una comunidad microbioana o de una microbiota es el de número de OTUs diferentes, sin tener en cuenta la abundancia de estas. Podemos recurrir a ciertos índices estadísticos, que serán desarrollados más adelante, para evitar inexactitudes debido al muestro, así como a la obtención de curvas de rarefacción.

Whittaker introdujo el concepto de diversidad y la dividió en varios componentes para un mayor estudio. Los componentes mejor caracterizados son la diversidad alfa y beta (Whittaker, 1972).

CAPÍTULO IV - MATERIAL Y MÉTODOS

En el presente estudio, la alfa diversidad hace referencia al número de OTUs diferentes en un grupo de pacientes, pero aunando dos variables: la riqueza de OTUs y la abundancia relativa de ellas. También recurrimos a ciertos índices estadísticos para evaluarla. Se trata de un concepto clave puesto que diversas enfermedades se han correlacionado con disminuciones en la diversidad de la microbiota intestinal, presumiblemente porque se produce un sobrecrecimiento bacteriano de ciertos grupos, dando lugar a una disbacteriosis (Morgan, 2012a)

Para entender los resultados de los índices de alfa diversidad hay que partir de dos premisas: A igualdad de OTUs, la alfa diversidad es máxima cuando todas las OTUs están en igual proporción, y a igualdad de uniformidad, la alfa diversidad es mayor cuando mayor sea el número de OTUs diferentes (Atlas, 2002).

4.4.2.1 Índices para cuantificar la alfa diversidad y riqueza.

4.4.2.1.1 Índice de Shannon.

El índice de Shannon es una herramienta muy utilizada para cuantificar la alfa diversidad de una comunidad ecológica (microbiana), o en nuestro caso microbiota intestinal (Hill, 1973). Pertenece al grupo de los índices estadísticos basados en la estructura de las comunidades, es decir, en relación con la abundancia relativa de sus respectivas OTUs. Dentro de estos, se trata de un índice de equidad, ya que tiene en cuenta la abundancia de cada OTU y cuanto de uniformemente se encuentran distribuidas. Asume, por definición, que todas las OTUS posibles están representadas en las muestras. Por consiguiente, mide el grado promedio de incertidumbre en predecir a que OTU pertenecería un individuo seleccionado al azar de la muestra.

CAPÍTULO IV - MATERIAL Y MÉTODOS

La fórmula matemática es la siguiente (Oksanen, 2017):

$$H = - \sum_{i=1}^S p_i \log_b p_i$$

Pi es la abundancia relativa.

Toma valores entre 0, cuando solo hay una OTU y $\ln S$, siendo S el total de OTUs posible, cuando todas las OTUS están representadas por el mismo número de individuos. En la práctica suele adoptar en comunidades biológicas un valor máximo de 5.

Es importante recalcar que el índice de Shannon puede aumentar cuando existe un aumento en la riqueza o bien, cuando se produce un aumento en la equitatividad de la representación en la abundancia relativa de cada OTU.

De una forma pragmática se considera que una microbiota tiene una baja diversidad cuando está por debajo de 1.5, siendo consideradas microbiotas diversas las que tienen valores por encima de 3. Entre 1.5 y 3 se situarían las microbiotas de diversidad media.

4.4.2.1.2 Índice de Simpson.

El índice de Simpson es otro índice estadístico para evaluar la alfa diversidad basado en la estructura de las comunidades, pero de forma contraria al índice de Shannon, es un índice de dominancia (Hill, 1973). Tiene más en cuenta las OTUs predominantes y menos las minoritarias. Expresa la probabilidad de que dos individuos seleccionados al azar de una población de N individuos provengan de la misma OTU.

CAPÍTULO IV - MATERIAL Y MÉTODOS

La fórmula matemática es la siguiente (Oksanen, 2017):

$$D_1 = 1 - \sum_{i=1}^S p_i^2$$

Donde P_i es la abundancia relativa de cada OTU.

También se puede expresar como índice de Simpson invertido (Oksanen, 2017):

$$D_2 = \frac{1}{\sum_{i=1}^S p_i^2}$$

Si el valor del índice de Simpson se acerca a 1 existirá una mayor diversidad alfa, y si el valor se acerca a 0, habrá una mayor dominancia por parte de una OTU y una menor heterogeneidad de OTUs. De forma pragmática podríamos considerar a una microbiota como poco diversa en base a este índice si su valor está por debajo de 0.35.

4.4.2.1.3 Estimador CHAO1.

Se trata de un estimador de riqueza mediante un modelo no paramétrico, basado en el número de OTUs *raras* (Chao, 1987). Estima el número de OTUs esperadas considerando la relación entre el número de OTUs representadas por un individuo (*singltons*) y el número de OTUs representadas por 2 individuos (*doubletons*). Mediante este estimador podremos deducir si el muestreo ha sido adecuado, puesto que si el valor CHAO1 es mayor al total de observaciones, el muestreo habrá sido insuficiente.

CAPÍTULO IV - MATERIAL Y MÉTODOS

La fórmula matemática es la siguiente (Oksanen, 2017):

$$S_1 = S_{obs} + \frac{F_1^2}{2F_2}$$

S es el número total de OTUs, F1 los *singltons* y F2 los *doubletons*.

4.4.2.1.4 Estimador ACE (Abundance-based Coverage Estimator).

Es un estimador no paramétrico, al igual que CHAO1, pero estima la riqueza en base a OTUs abundantes y raras, tomando un valor umbral para separar ambos grupos (Chiu, 2014).

La fórmula es la siguiente (Oksanen, 2017):

$$S_P = S_{abund} + \frac{S_{rare}}{C_{ace}} + \frac{a_1}{C_{ace}} \gamma_{ace}^2$$
$$C_{ace} = 1 - \frac{a_1}{N_{rare}}$$
$$\gamma_{ace}^2 = \max \left[\frac{S_{rare} \sum_{i=1}^{10} i(i-1)a_i}{C_{ace} N_{rare} (N_{rare} - 1)} - 1, 0 \right]$$

En la anterior ecuación a_i es el número de OTUs con abundancia i , y S_{rare} es el número de OTUs raras. S_{abund} es el número de OTUs abundantes y N_{rare} es el número de individuos que hay con OTUs raras.

La interpretación es la misma que con el estimador CHAO1 y se acompaña de un error estándar.

4.4.2.2 Representación gráfica de los índices de alfa diversidad y estudio de diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

La representación gráfica fue realizada mediante un diagrama de cajas (*boxplot*). Para valorar si existían diferencias estadísticamente significativas a nivel

CAPÍTULO IV - MATERIAL Y MÉTODOS

de cualquier rango taxonómico de los índices estadísticos medios de alfa diversidad de los grupos de estudio, se utilizó el test no paramétrico de Wilcoxon (Hollander, 2013). Se estimó como nivel de diferencia estadísticamente significativa un valor de $P < 0.05$. Estas pruebas estadísticas son las empleadas comúnmente en la comparación de índices de alfa diversidad entre grupos en estudios de microbiota intestinal (Xia, 2017).

4.4.2.3 *Curvas de rarefacción.*

Las curvas de rarefacción permiten realizar comparaciones de riqueza de OTUs entre muestras al suponer que el tamaño de estas no es igual. Básicamente calcula el número esperado de OTUs si todas las muestras fueran reducidas a un tamaño estándar, puesto que se sabe que la riqueza va a aumentar con el tamaño muestral y debemos descartar que las diferencias de riqueza obtenidas no se deban a ello. Se muestra el número de OTUs estadísticamente esperado según se incrementa el esfuerzo de muestreo (Gotelli, 2011).

El método de rarefacción estima el número medio de OTUs a través de submuestras repetidas al azar de n individuos a partir de la muestra original más grande. Permite construir una curva entera en la cual el número de individuos submuestreados al azar se encuentran en un rango que va de 1 a N . Esta curva se pretende llegue a ser asintótica para asegurar que se realizó un buen muestreo (en nuestro caso se alcanzó una profundidad de secuenciación apropiada) de acuerdo con el número de OTUs identificadas (Gotelli, 2011).

CAPÍTULO IV - MATERIAL Y MÉTODOS

La fórmula matemática para calcular el número de OTUs esperada en una microbiota rarificada desde N a n ($N < n$) individuos sería la siguiente (Oksanen, 2017):

$$\hat{S}_n = \sum_{i=1}^S (1 - q_i) \quad \text{Donde} \quad q_i = \frac{\binom{N-x_i}{n}}{\binom{N}{n}}$$

En dicha fórmula x_i es el total de OTUs i . El parámetro q_i nos proporciona la probabilidad de que la OTU i no aparezca en una muestra de tamaño n . Solo será de valor positivo si $N - x_i \geq n$.

4.4.2.4 Índices para cuantificar la beta diversidad.

La diversidad beta se mide como la tasa de reemplazo de especies entre hábitats. Aplicado al estudio de la microbiota puede definirse como las diferencias existentes en cuanto a composición de dos muestras diferentes. Estas diferencias en cuanto a diferencias en las proporciones de composición pueden medirse de diferentes formas. Por un lado, tenemos los índices de beta diversidad clásicos, y por otro lado tenemos los métodos basados en distancias entre las diferentes muestras a partir de datos cualitativos o cuantitativos.

4.4.2.4.1 Índice de Similitud de Jaccard

Este índice expresa el grado en que dos muestras son semejantes por la composición de sus OTUs de forma cualitativa.

La fórmula matemática es la siguiente: $I_j = c/(a + b + c)$, donde a es el número de OTUs de la muestra A, b es el número de OTUs de la muestra B y c es el número de OTUs compartidas entre ambas muestras. Los valores van desde 0 cuando no hay ninguna OTU compartida hasta 1 cuando todas las OTUs están por igual en ambas muestras.

CAPÍTULO IV - MATERIAL Y MÉTODOS

Para cada uno de los grupos de estudio, se calculó el índice de Jaccard de cada muestra con respecto al resto. Los datos obtenidos fueron representados mediante un diagrama de cajas. A continuación, para observar si había diferencias estadísticamente significativas a nivel de cualquier rango taxonómico de los grupos de estudio se utilizó el tests no paramétrico de Wilcoxon (Hollander, 2013). Se estimó como nivel de diferencia estadísticamente significativa un valor de $P < 0.05$.

4.4.3 Análisis Principal de Componentes (PCoA, *Principal Component Analysis*).

El análisis principal de componentes (PCoA) es una técnica estadística multivariante de reducción de dimensiones (número de variables). Pretende sintetizar en un espacio de 2 dimensiones, cuya representación gráfica es el *biplot*, la varianza en una nube de puntos multivariada, que serían las diferentes muestras. Proporciona una visión general de la relación lineal entre nuestras muestras y las variables, en este caso abundancias relativas, en los diferentes rangos taxonómicos. Por tanto, transforma un conjunto amplio de variables correlacionadas en un conjunto reducido de nuevas variables, que explican mejor la mayor parte de la variación existente en los datos. Por consiguiente, es una buena herramienta para comenzar un análisis multivariante permitiéndonos observar líneas de tendencias, variables clave y potenciales *outliers* (Buttigieg, 2014).

Usamos combinaciones lineales de las variables originales para construir y obtener los PCs (*Principal Component*). Partiendo de la matriz ($n \times p$) siendo n el número de muestras y p el número de variables, rotamos el espacio teórico p -dimensional para obtener una representación bidimensional que sacará a la luz la mayor variabilidad posible. El primer PC es el eje que pasa por el centroide de la nube de puntos y minimiza la distancia de cada punto a ese mismo eje, por tanto, ese eje maximiza la variabilidad de la nube de puntos. El segundo PC se construye de igual forma, pero ha de ser independiente al primer eje, por tanto, ha de ser ortogonal y también pasar por el centroide. Con el segundo PC se explica la mayor variabilidad no explicada por el primer PC. Si representamos la

CAPÍTULO IV - MATERIAL Y MÉTODOS

ubicación de los objetos en un *biplot* con nuestros PC como ejes podemos deducir si hay grupos de estudio similares o diferentes.

En el *biplot*, las muestras agrupadas estarán correlacionados, si están en zonas opuestas tendrán correlación negativa y en ángulo recto no existiría correlación.

También se proporciona la gráfica de autovalores (*eigenvalues*) ordenados de mayor a menor. Esta gráfica nos permite saber el porcentaje de varianza explicada por cada PC.

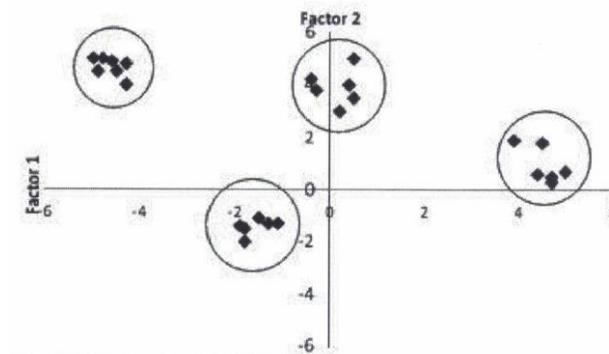


FIGURA 25: Ejemplo de *biplot* construido mediante PCoA de dos dimensiones que permite visualizar 4 subgrupos.

Los gráficos se construyeron mediante el plugin para Qiime2 *qiime2-qiime-diversity-core-metrics-phylogenetic*.

4.4.5 Análisis UniFrac.

El método UniFrac nos proporciona otro tipo de análisis de comparación de comunidades microbianas o, como en el presente estudio, de la microbiota intestinal de tres grupos de estudio. A diferencia del PCoA (basado en la distancia euclídea), está basado en las diferencias filogenéticas de las muestras.

CAPÍTULO IV - MATERIAL Y MÉTODOS

Por tanto, explora el grado de divergencia entre las diferentes secuencias que hemos obtenido, al poder observar la distancia métrica entre muestras. Asimismo, podemos comparar muchas muestras simultáneamente utilizando un análisis de coordenadas principales, al igual que con el análisis PCoA, puesto que podemos obtener una matriz de distancias. Se le considera una herramienta de mucha potencia en estudios como el presente, al tener en cuenta precisamente las diversidades filogenéticas (Lozupone, 2005). Puede usarse para agrupar muestras usando herramientas estadísticas multivariantes.

Básicamente, el concepto UniFrac se refiere al porcentaje de longitud de las ramas filogenéticas únicas para cada muestra. Cuando las comunidades sean idénticas será de valor cero y cuando estén totalmente no relacionadas será de 1. El método UniFrac balanceado o *weighted*, además tiene en cuenta las abundancias relativas existentes en los rangos taxonómicos, por tanto, enfatiza los grupos dominantes. Por otra parte, el método UniFrac desbalanceado o *unweighted*, solo tiene en cuenta presencia o ausencia, enfatizando más en los grupos menos comunes, de forma general.

Por tanto, mide la disimilitud entre dos colecciones de secuencias como la cantidad de “carga genética” que es única para alguna de ellas, la cual es medida como la fracción del brazo en el árbol filogenético que conduce a brazos descendentes de una de las dos muestras, pero nunca de las dos.

Las distancias UniFrac fueron calculadas mediante el plugin para Qiime2 *qiime2-qiime-diversity-tare-metrics-phylogenetic*. Se utilizó el visualizador Emperor (<http://emperor.microbio.me>) para obtener los gráficos en 2 dimensiones del análisis principal de componentes, correspondiendo a cada eje la varianza asignada (Vázquez-Baeza, 2013).

4.4.5 Estudio de la composición de la microbiota intestinal.

Para valorar las diferencias en la composición de la microbiota intestinal de los 3 grupos de estudio analizaremos la media de las abundancias relativas a

CAPÍTULO IV - MATERIAL Y MÉTODOS

nivel de *phylum*, familia y género y aplicaremos el test de Wilcoxon para valorar diferencias estadísticamente significativas.

V-RESULTADOS

CAPITULO V. RESULTADOS.

5.1 LECTURAS POR MUESTRA.

Como hemos visto en el apartado 4.3.3 “Análisis bioinformático de las secuencias de amplicones del gen bacteriano ADNr 16S y asignación taxonómica”, el filtrado de las secuencias obtenidas en bruto supone un paso importante, a fin de obtener una correcta y exacta asignación taxonómica y unas exactas abundancias relativas de las respectivas OTUs. A modo ilustrativo vamos a exponer las lecturas por muestra o *read counts* de cada grupo del estudio.

TABLA: READ COUNTS POR MUESTRA. GRUPO CDI					
MUESTRA	INPUT	FILTERED	DENOISED	MERGED	NON-CHIMERIC
CDI01	41945	36695	36695	35503	33176
CDI02	25438	23381	23381	22929	20484
CDI03	125778	113985	113985	113554	110768
CDI04	19329	17748	17748	17411	16455
CDI05	25524	23576	23576	23324	22325
CDI06	22997	20911	20911	19962	19389
CDI08	31245	28858	28858	28534	27039
CDI09	30847	27949	27949	27418	25916
CDI10	45737	41755	41755	41468	40667
CDI11	49742	43515	43515	42895	41964
CDI12	46573	42291	42291	41255	37228
CDI13	142762	87356	87356	86195	74624
CDI14	113644	70466	70466	69151	65435
CDI15	117108	57851	57851	57476	47417
CDI16	104209	60547	60547	59636	55760

TABLA 2: *Read Counts* por muestra en el grupo de pacientes con CDI.

CAPÍTULO V – RESULTADOS

TABLA: READ COUNTS POR MUESTRA: GRUPO INDIVIDUOS COLONIZADOS POR <i>C. DIFFICILE</i>					
MUESTRA	INPUT	FILTERED	DENOISED	MERGED	NON-CHIMERIC
P01	37029	34135	34135	33865	32505
P02	83178	76182	76182	75557	52891
P03	43708	40511	40511	40098	37099
P04	88391	81344	81344	81055	80275
P05	34518	31954	31954	31786	29948
P06	44967	40240	40240	39829	36491
P07	88428	80022	80022	79348	74514
P08	64642	59449	59449	59208	57569
P09	46761	43051	43051	42314	41507
P10	50298	45453	45453	45082	39292
P11	27666	24808	24808	24493	24084
P12	141922	88489	88489	86499	79519
P13	127951	76475	76475	75348	62604
P14	166561	102394	102394	100075	92046
P15	97571	60294	60294	60075	57803

TABLA 3: *Read Counts* por muestra en el grupo de individuos colonizados por *C. difficile*.

CAPÍTULO V – RESULTADOS

TABLA: <i>READ COUNTS</i> POR MUESTRA: GRUPO CONTROLES SANOS					
MUESTRA	<i>INPUT</i>	<i>FILTERED</i>	<i>DENOISED</i>	<i>MERGED</i>	<i>NON-CHIMERIC</i>
S01777	165583	117324	117324	114878	107965
S02777	168588	120979	120979	117722	110972
S03777	189816	129385	129385	127325	120804
S04777	211680	149787	149787	145850	139792
S05777	199256	132380	132380	130059	124964
S07777	201086	135097	135097	132791	124018
S08777	193914	129333	129333	127138	121191
S09777	208095	145726	145726	141979	136395
S10777	194064	138041	138041	136063	129130
S12777	242950	171691	171691	170226	166563
S13777	191001	130625	130625	128179	120761
S14777	221951	158758	158758	156406	152208
S15777	199387	126888	126888	123269	118903
S16777	169512	115969	115969	114322	110944

TABLA 4: *Read Counts* por muestra en el grupo de controles sanos.

En las anteriores tablas se representa como en cada proceso de filtrado de las secuencias obtenidas se va depurando el número de secuencias totales por cada muestra:

- *Input*: Es el total de lecturas obtenidas durante la secuenciación.
- *Filtered, Denoised*: Son procesos de eliminación de secuencias cortas o de mala calidad.
- *Merged*: Son las lecturas obtenidas tras la fusión de R1 y R2.
- *Non-Chimeric*: Son las lecturas obtenidas finalmente tras eliminar las secuencias quiméricas.

CAPÍTULO V – RESULTADOS

5.2 ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD Y RIQUEZA DE LA MICROBIOTA INTESTINAL DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO.

5.2.1 Índices de alfa diversidad de Shannon y Simpson.

Los índices medios de Shannon y Simpson en el rango taxonómico de género para cada grupo de estudio, y la comparación entre ellos para ver si existen diferencias estadísticamente significativas, quedan recogidas en la siguiente tabla:

GRUPO DE ESTUDIO 1	GRUPO DE ESTUDIO 2	ÍNDICE DE ALFA DIVERSIDAD	MEDIA GRUPO DE ESTUDIO 1	MEDIA GRUPO DE ESTUDIO 2	TEST DE WILCOXON (<i>P-VALUES</i>)
CDI	CTRL	Shannon	2.0	2.8	0.0002
CDI	CTRL	Simpson	0.7	0.9	0.0006
CDI	P	Shannon	2.0	1.9	0.3724
CDI	P	Simpson	0.7	0.7	0.3091
CTRL	P	Shannon	2.8	1.9	0.0003
CTRL	P	Simpson	0,9	0.7	0.0003

TABLA 5: Comparación de los Índices de Shannon y Simpson en el rango taxonómico de género.

En negrita aparecen los valores de $P < 0.05$ al aplicar el test de Wilcoxon. Entre los grupos CDI y P no existen diferencias estadísticamente significativas en los índices de Shannon y Simpson. Estos adoptan unos valores que nos indica una diversidad que podríamos calificar de media-baja.

Al comparar los grupos CDI y P frente al de CTRL observamos diferencias estadísticamente significativas en ambos índices, con valores mayores para el grupo de controles sanos. Pragmáticamente podemos considerar que el grupo CTRL presenta unos índices de Shannon y Simpson que nos indica una alfa diversidad normal, y los grupos CDI y P presentan una disminución de la alfa

CAPÍTULO V – RESULTADOS

diversidad, pero sin diferencias estadísticamente significativas entre estos dos últimos grupos.

En los siguientes diagramas de cajas se representan las diferencias en los índices de Shannon y Simpson, calculados para el rango taxonómico de género, entre los grupos CDI, P y CTRL.

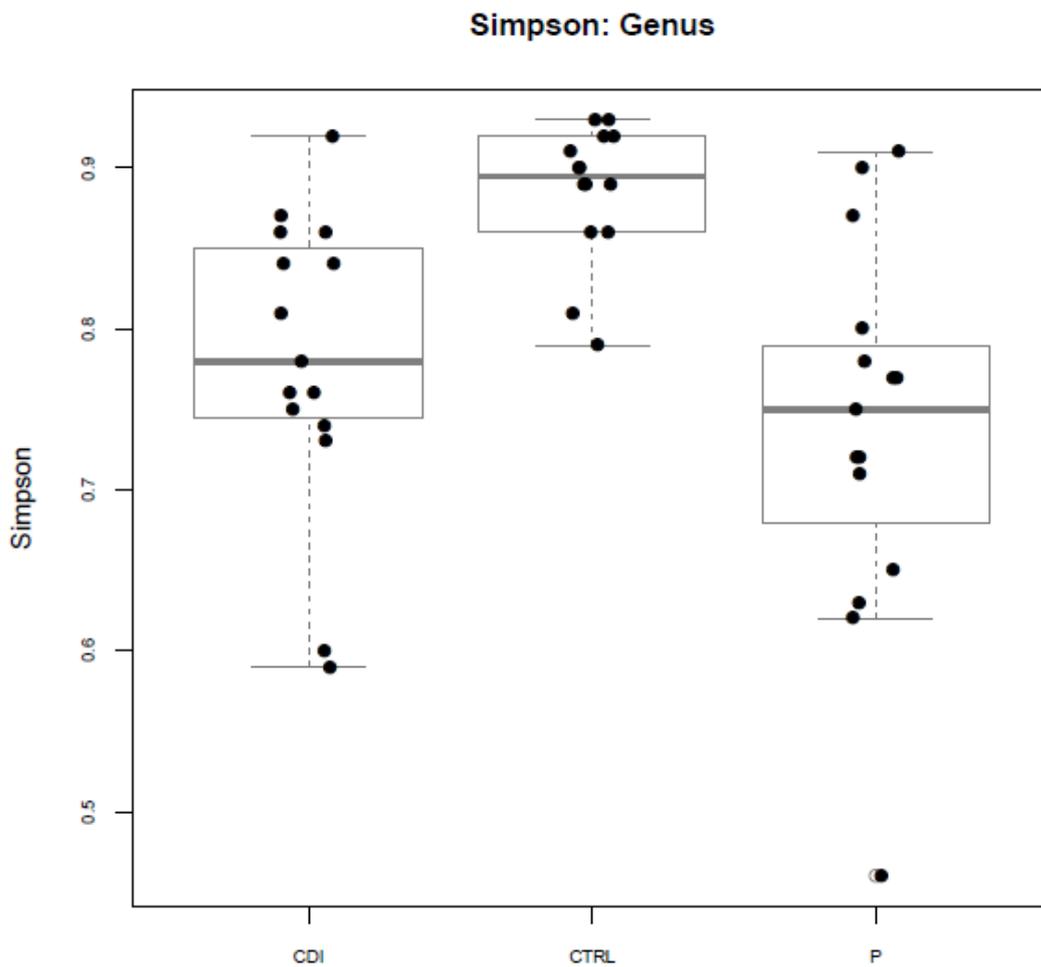


FIGURA 26: Diagrama de cajas del índice de Simpson a nivel del rango taxonómico de género de los 3 grupos de estudio.

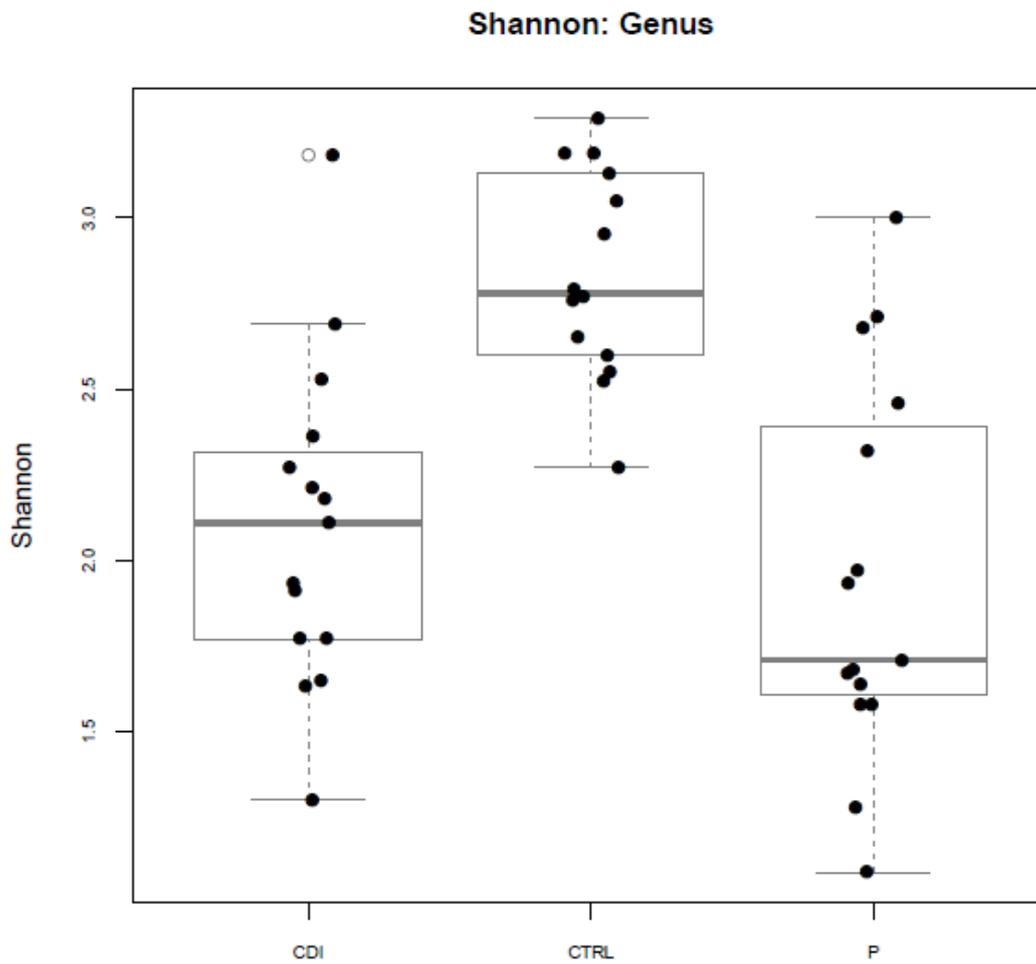


FIGURA 27: Diagrama de cajas del índice de Shannon a nivel del rango taxonómico de género de los 3 grupos de estudio.

5.2.2 Estimadores de riqueza.

Las medias de los estimadores de riqueza CHAO1 y ACE en el rango taxonómico de género para cada grupo de estudio, y la comparación entre ellos, quedan recogidas en la siguiente tabla:

CAPÍTULO V – RESULTADOS

GRUPO DE ESTUDIO 1	GRUPO DE ESTUDIO 2	ESTIMADOR DE RIQUEZA	MEDIA GRUPO DE ESTUDIO 1	MEDIA GRUPO DE ESTUDIO 2	TEST DE WILCOXON (P-VALUES)
CDI	CTRL	CHAO1	47.2	113.1	<0.0001
CDI	CTRL	ACE	47.2	113.1	<0.0001
CDI	P	CHAO1	47.2	51.6	0.9339
CDI	P	ACE	47.2	51.6	0.9339
CTRL	P	CHAO1	113.1	51.6	0.0004
CTRL	P	ACE	113.1	51.6	0.0004

TABLA 6: Comparación de los estimadores de riqueza CHAO1 y ACE en el rango taxonómico de género.

En negrita aparecen los valores de $P < 0.05$ al aplicar el test de Wilcoxon. Entre los grupos CDI y P no existen diferencias estadísticamente significativas en ambos estimadores de riqueza.

Al comparar los grupos CDI y P frente al grupo CTRL observamos diferencias estadísticamente significativas puesto que el grupo de controles sanos presenta valores mayores. Por tanto, podemos estimar que la riqueza de los grupos CDI y P está muy disminuida con respecto al grupo de controles sanos.

En los siguientes diagramas de cajas se representan los datos de la tabla 6.

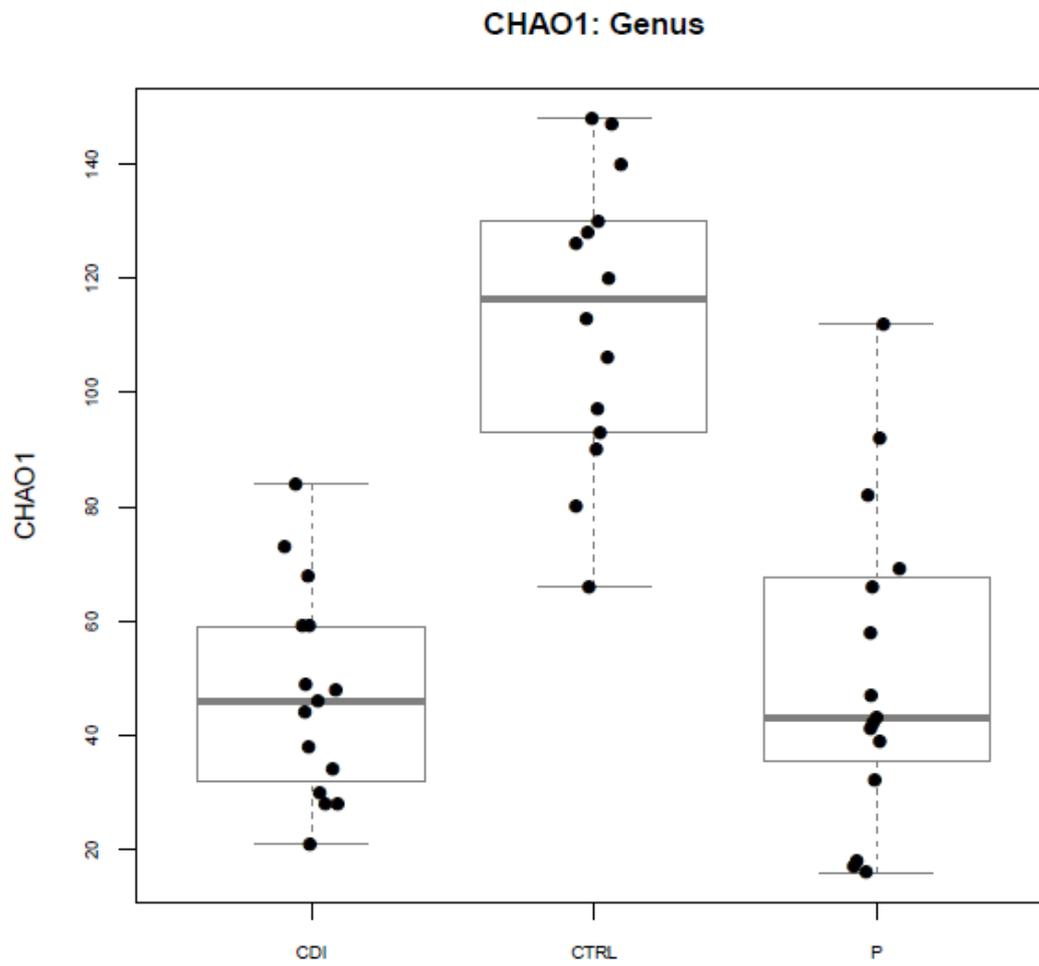


FIGURA 28: Diagrama de cajas del estimador CHAO1 a nivel del rango taxonómico de género de los 3 grupos de estudio.

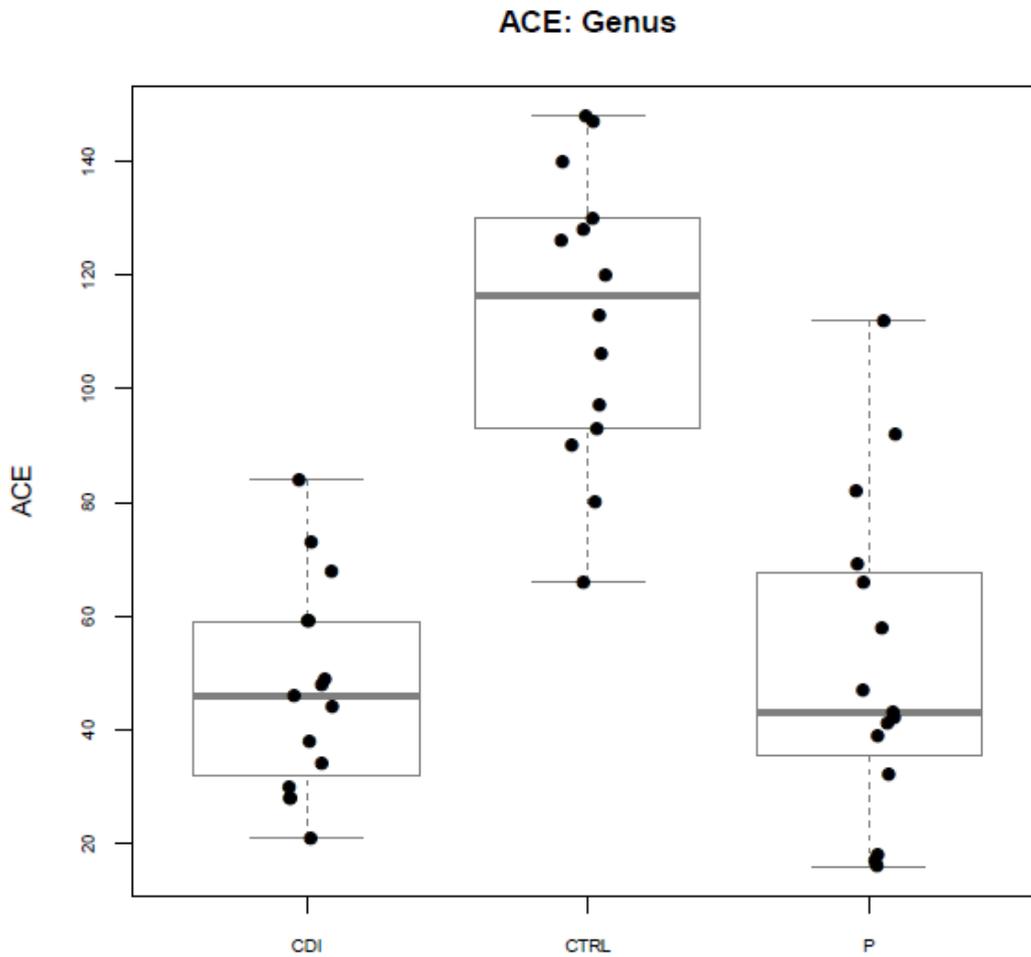


FIGURA 29: Diagrama de cajas del estimador ACE a nivel del rango taxonómico de género de los 3 grupos de estudio.

Por tanto, en base a los índices de alfa diversidad estudiados y a los estimadores de riqueza podemos establecer que existe una pérdida de diversidad y riqueza en los grupos CDI y P con respecto al de CTRL, pero no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los grupos CDI y P.

5.2.3 Curvas de rarefacción.

A continuación, se muestran las curvas de rarefacción de los grupos de estudio por separado y por último se muestra otra donde están los 3 grupos

CAPÍTULO V – RESULTADOS

juntos. Todas las curvas de rarefacción son a nivel de rango taxonómico de género.

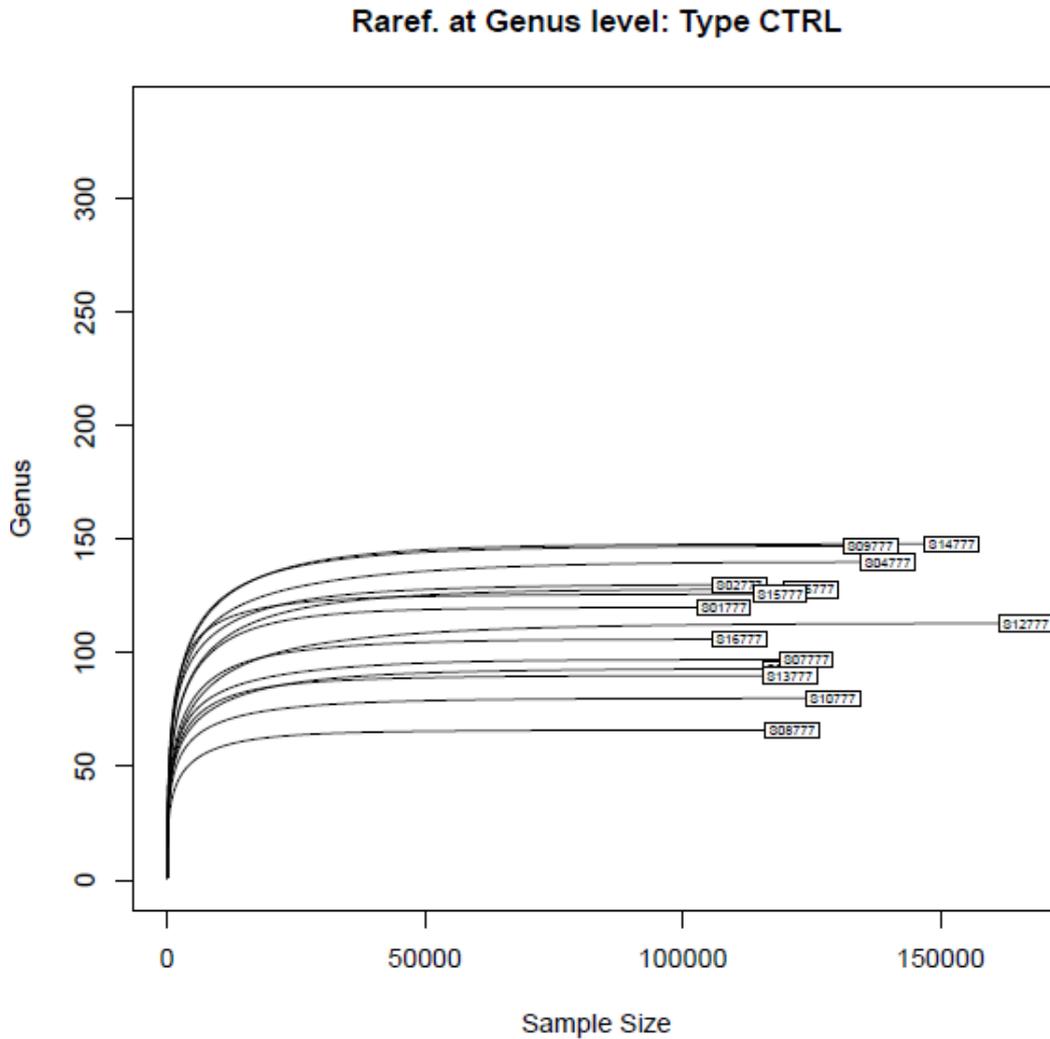


FIGURA 30: Curva de rarefacción a nivel de género del grupo de controles sanos.

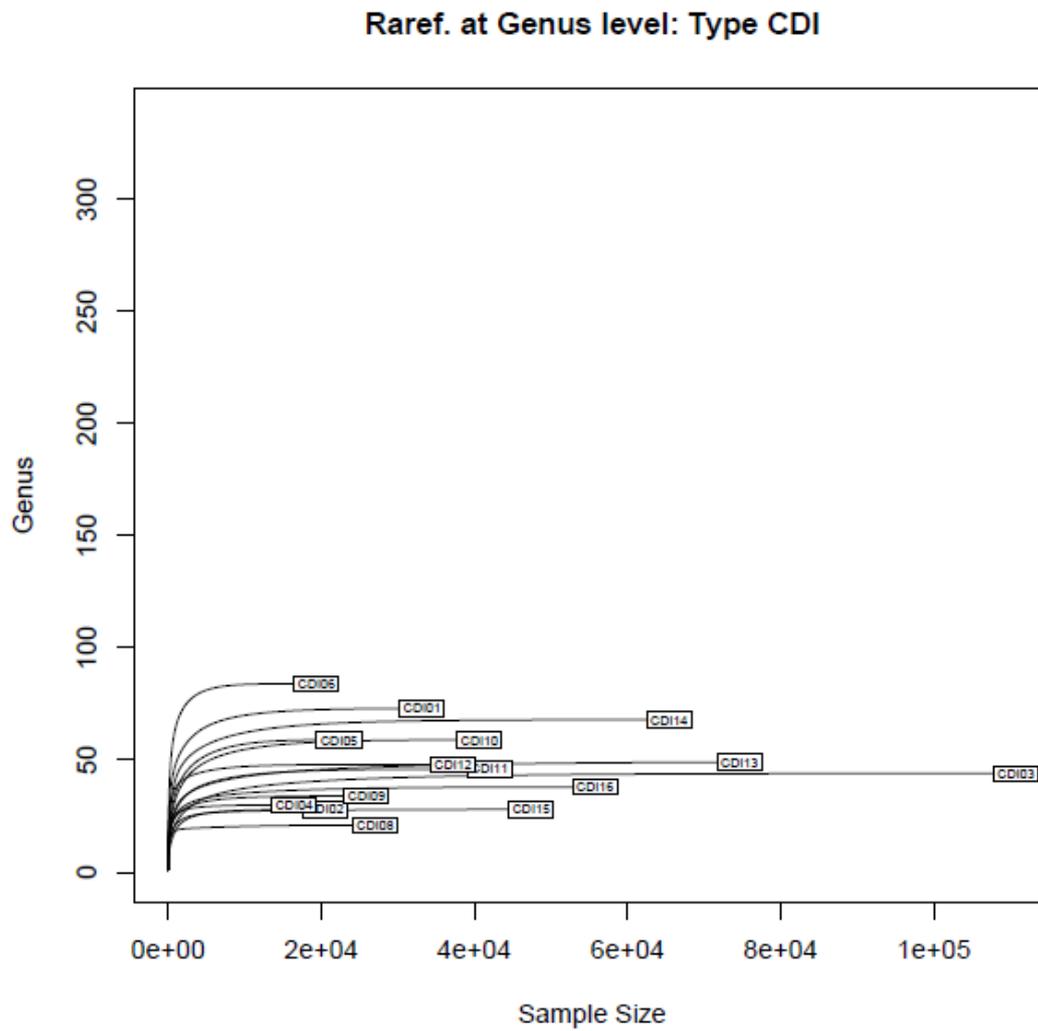


FIGURA 31: Curva de rarefacción a nivel de género del grupo CDI.

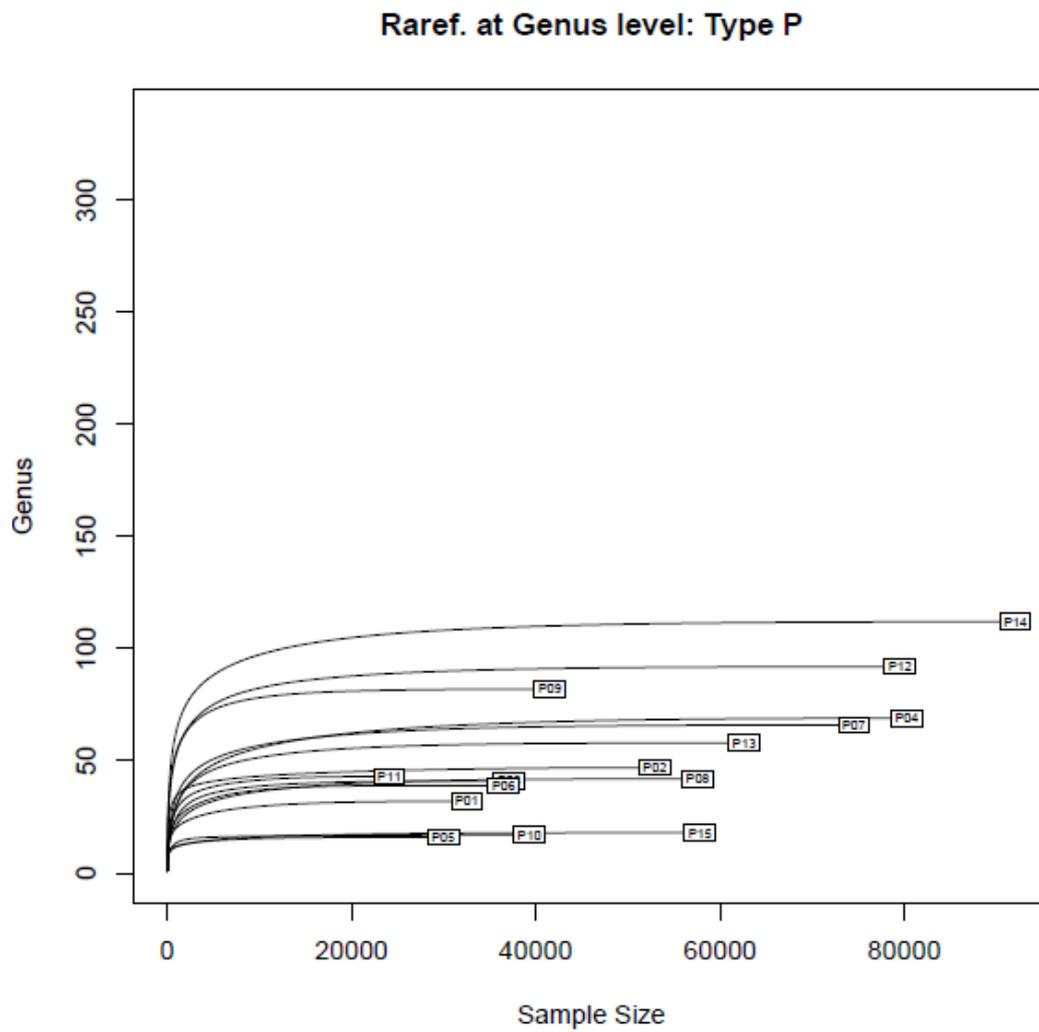


FIGURA 32: Curva de rarefacción a nivel de género del grupo P.

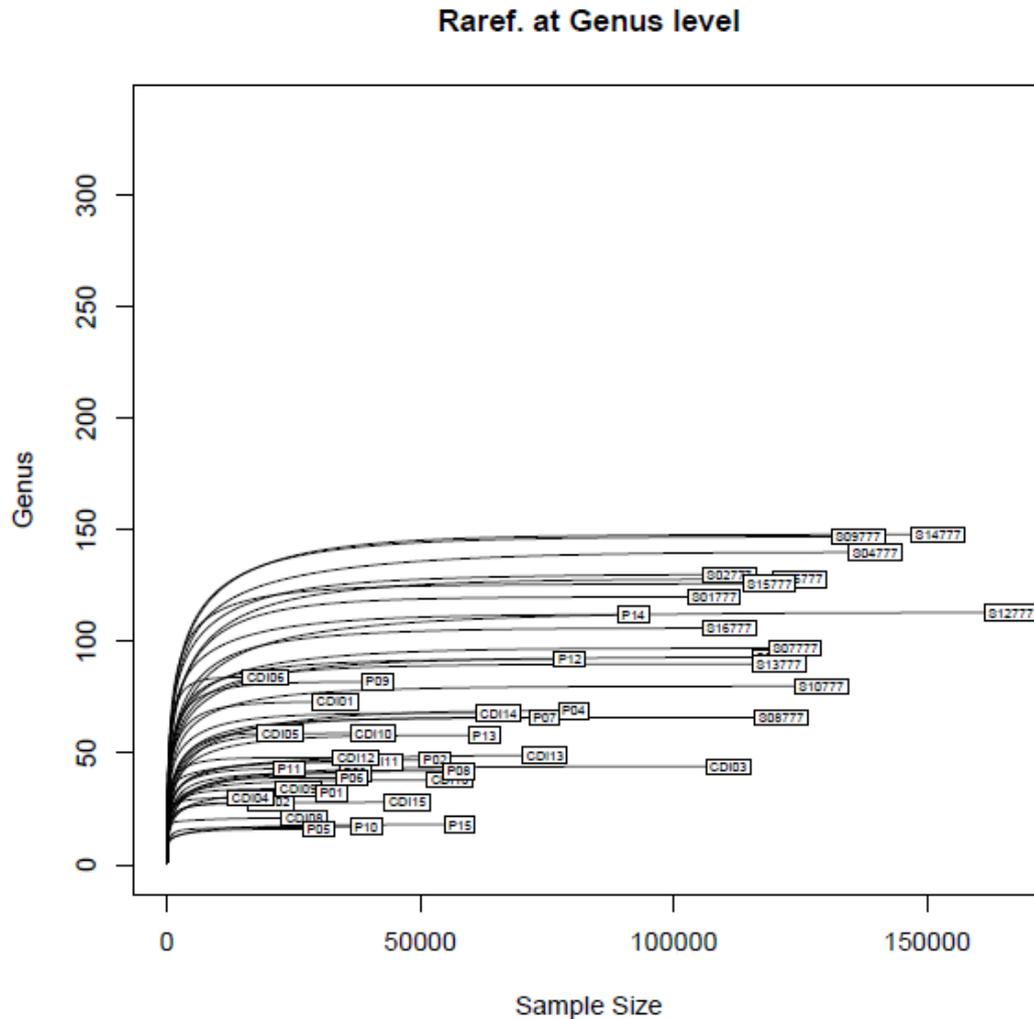


FIGURA 33: Curva de rarefacción a nivel de género con todos los grupos de estudio.

De las curvas de rarefacción podemos confirmar que el grupo de controles sanos presenta una riqueza superior a los grupos CDI y P, puesto que presentan sus muestras un mayor número de géneros cuando se alcanza la fase asintótica. Además, podemos concluir que el muestreo ha sido adecuado, es decir, la secuenciación tiene suficiente profundidad puesto que hemos obtenido un número de OTUs representativo del rango taxonómico género, al haber alcanzado todas las curvas de rarefacción la fase asintótica.

5.2.4 Índice de beta diversidad de Jaccard.

La media del índice de beta diversidad de Jaccard para el rango taxonómico de género para cada grupo de estudio, y la comparación entre ellos para ver si existen diferencias estadísticamente significativas, quedan recogidas en la siguiente tabla:

GRUPO 1	GRUPO 2	MEDIA GRUPO 1	MEDIA GRUPO 2	TEST DE WILCOXON (P-VALUES)
CDI	CTRL	0,17	0,31	<0,0001
CDI	P	0,17	0,18	0,1205
CTRL	P	0,31	0,18	<0,0001

TABLA 7: Comparación del índice de beta diversidad de Jaccard en el rango taxonómico de género.

En negrita aparecen los valores de $P < 0.05$ al aplicar el test de Wilcoxon. Entre los grupos CDI y P no existen diferencias estadísticamente significativas en cuanto a su valor medio del índice de Jaccard.

Al comparar los grupos CDI y P frente al de CTRL observamos diferencias estadísticamente significativas puesto que el grupo de controles sanos presenta valores mayores. Por tanto, podemos estimar que la beta diversidad de los grupos CDI y P está disminuida con respecto al grupo de controles sanos. No obstante, podemos considerar todos los valores como bajos, por tanto, la variabilidad intraindividual es bastante elevada, sobre todo en los grupos CDI y P.

En el siguiente diagrama de cajas se observan las diferencias en cuanto al valor medio del índice de Jaccard, calculados para el *taxa* Género, entre los grupos CDI y P, frente al CTRL.

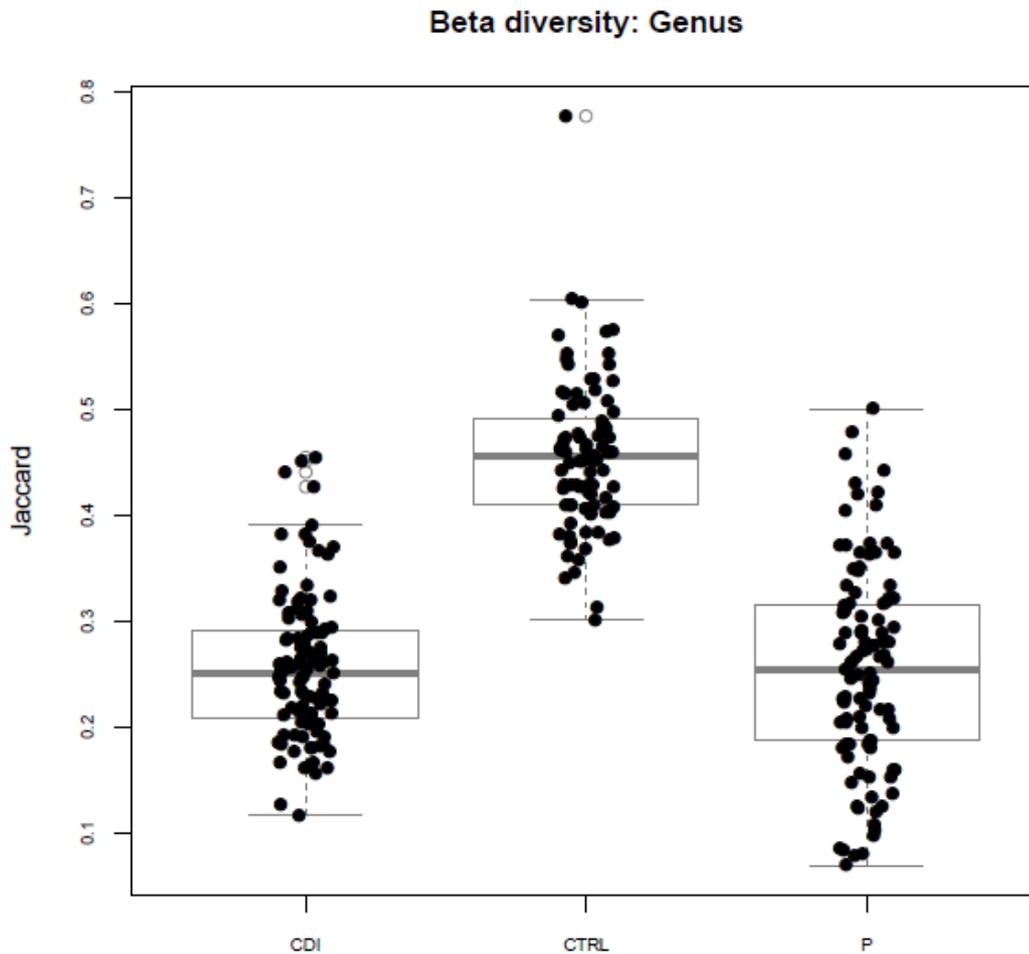


FIGURA 34: Diagrama de cajas del índice de beta diversidad de Jaccard nivel del rango taxonómico de género de los 3 grupos de estudio.

Es destacable que la mediana del índice de Jaccard para el grupo control es mayor que su media (entorno a 0.45 a diferencia de la media 0.31), aspecto que no ocurre con respecto a los grupos CDI y P.

5.3 ANÁLISIS PRINCIPAL DE COMPONENTES.

El PCoA fue obtenido de acuerdo con lo expuesto en el apartado 4.4.4 “Análisis Principal de Componentes (PCoA, Principal Coordinate Analysis)” del capítulo de Material y Métodos.

CAPÍTULO V – RESULTADOS

El *biplot* obtenido para el rango taxonómico de género fue el siguiente:

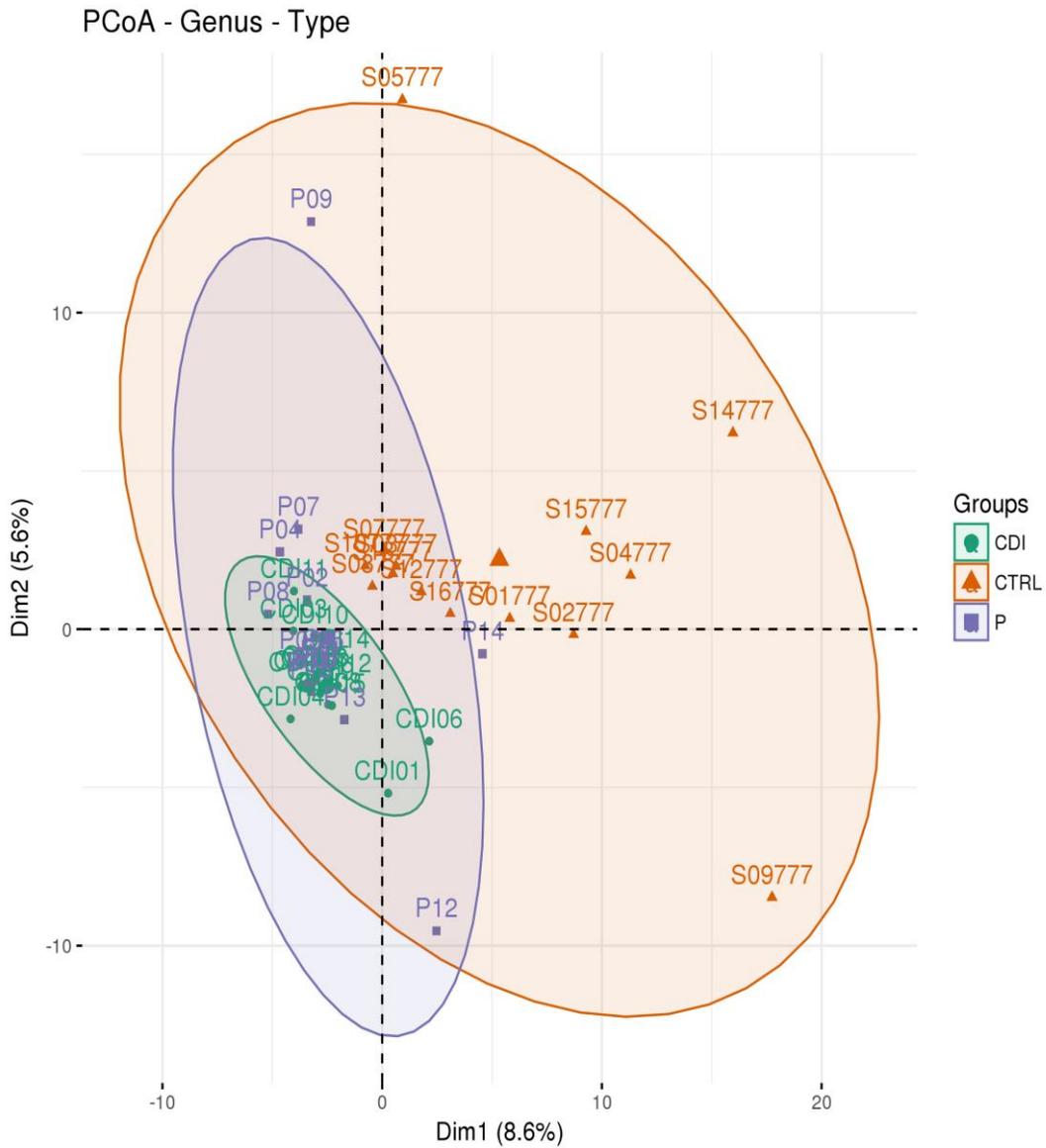


FIGURA 35: PCoA a nivel de género.

A continuación, exponemos la figura con todos los porcentajes de las varianzas explicadas por todos los componentes principales, aunque solo usamos los de mayor porcentaje que son el componente 1 y después el 2.

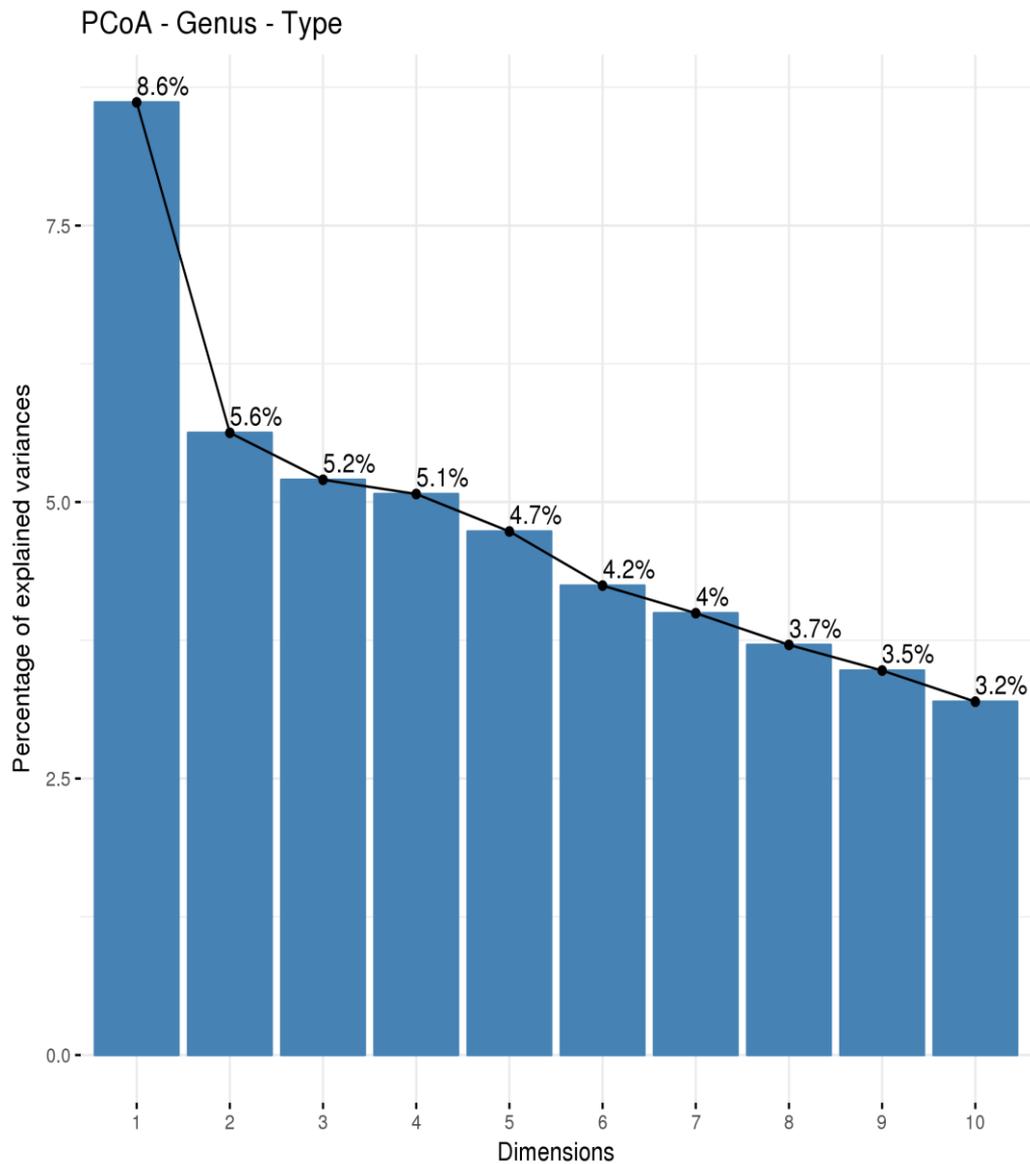


FIGURA 36: Porcentaje de las varianzas explicadas con cada uno de los componentes principales obtenidos.

Por consiguiente, partimos de un PCoA con 2 componentes principales que nos van a explicar una escasa variabilidad del 8.6% y 5.6%. Debido a esta razón este modelo no sería exitoso. No obstante, sabiendo esto podemos observar que las muestras del grupo CTRL quedan alejadas de las muestras de los grupos P y CDI. Muchas muestras de los grupos P y CDI quedan solapadas en una

CAPÍTULO V – RESULTADOS

misma región, por tanto, presentan similitudes. Las muestras del grupo CTRL quedaron más dispersas, incluso muestras como la S09777 y S05777 quedaron alejadas de la región donde se agrupan. Las muestras del grupo CDI han sido las que más agrupadas se observan, solapándose como hemos dicho con muchas del grupo P.

5.4 ANÁLISIS UNIFRAC.

El análisis UniFrac fue realizado de acuerdo con lo expuesto en el apartado 4.4.5 “*Análisis UniFrac*” del capítulo de Material y Métodos.

5.4.1 UniFrac *Weighted*.

El análisis Unifrac *Weighted* de todos los grupos de estudio queda reflejado en la siguiente figura:

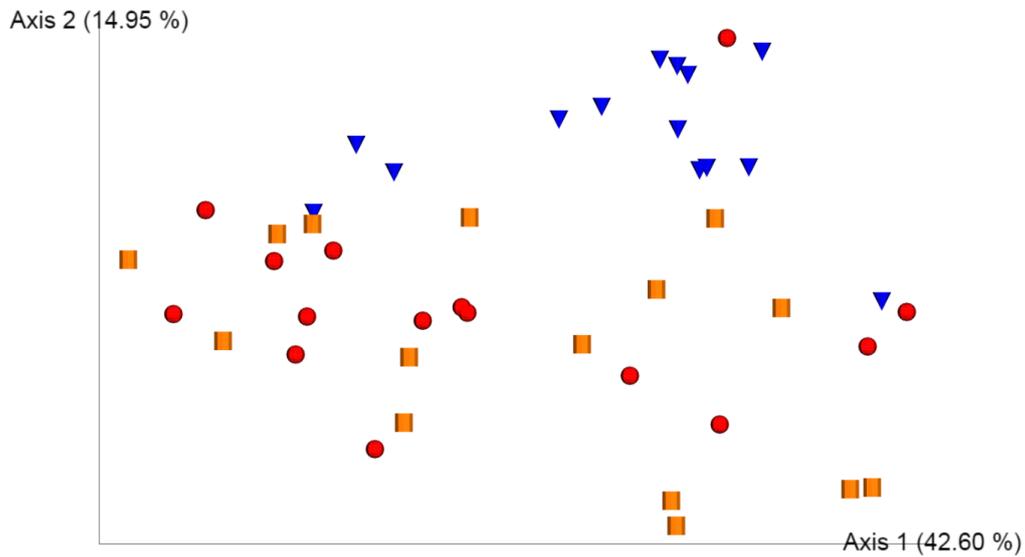


FIGURA 37: Análisis UniFrac *Weighted* para los 3 grupos de estudio. Esferas CDI, Cono CTRL y Cilindro P.

La variabilidad explicada en el eje 1 es del 42.6% y del eje 2 del 14.95%. Se puede observar que las muestras de los controles sanos quedan en una región diferente a las del resto que quedan algo dispersas pero agrupadas.

Aparte de una muestra *outlayer* del grupo CDI (muestra CDI15), podemos observar dos agrupaciones con muestras de los grupos CDI y P agrupadas.

En las siguientes figuras observamos las diferencias entre los grupos CDI y P con respecto al grupo CTRL:

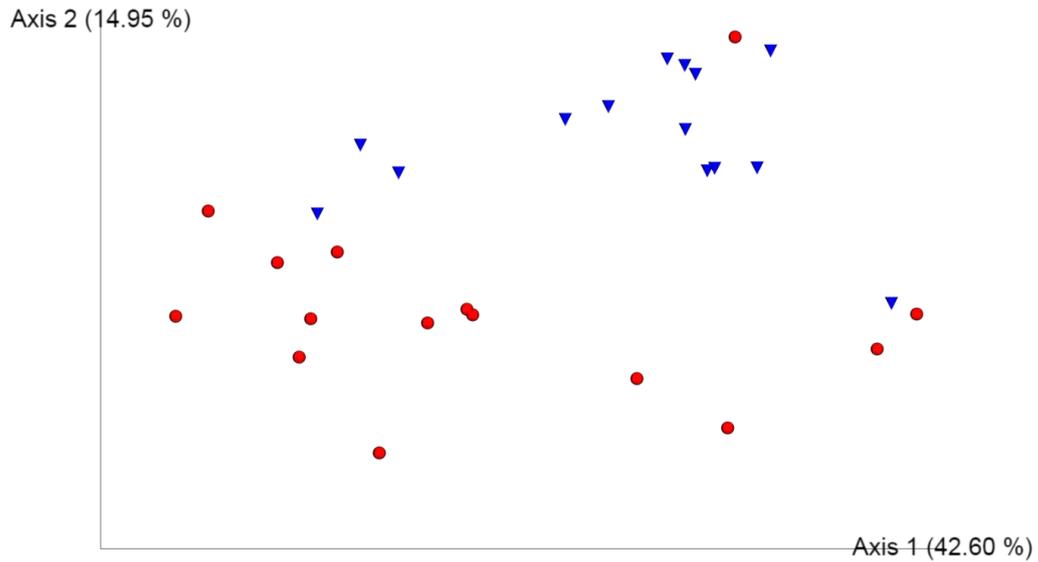


FIGURA 38: Análisis UniFrac *Weighted* para los grupos CDI y CTRL. Esferas CDI y Cono CTRL.

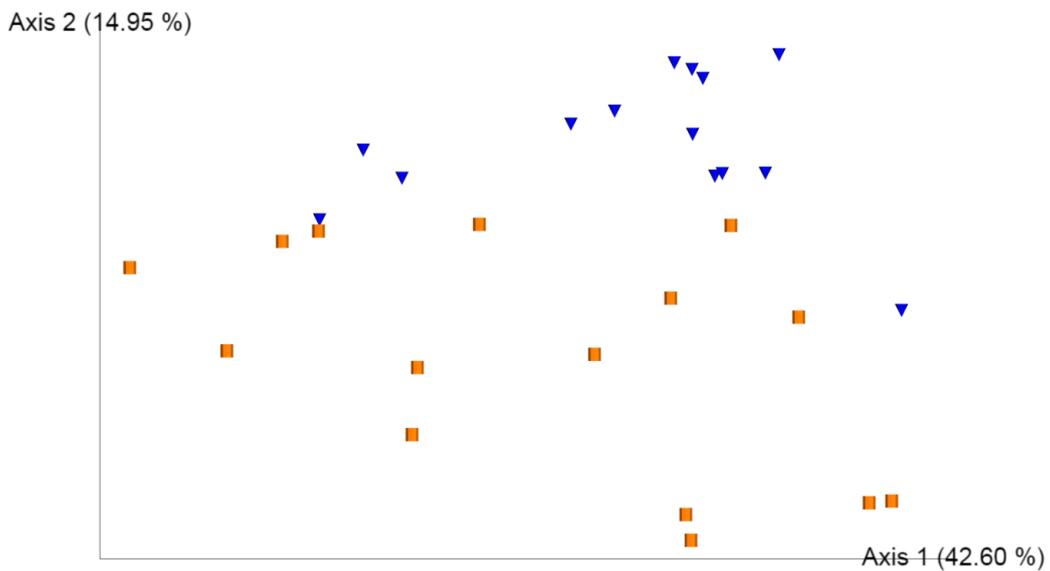


FIGURA 39: Análisis UniFrac *Weighted* para los grupos P y CTRL. Cilindro CDI y Cono CTRL.

Este modelo es bastante exitoso puesto que explica una variabilidad notable en sus componentes principales del 42.60% y 14.95%.

5.5.1 UniFrac *Unweighted*.

El análisis UniFrac *Unweighted* de todos los grupos de estudio queda reflejado en la siguiente figura:

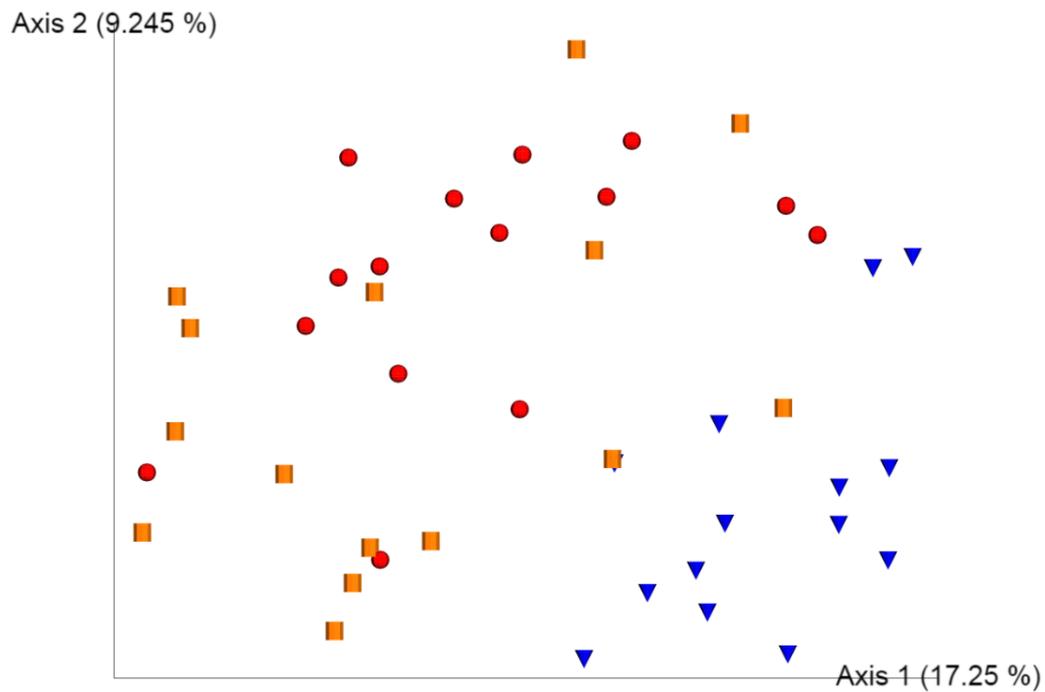


FIGURA 40: Análisis UniFrac *Unweighted* para los 3 grupos de estudio. Esferas CDI, Cono CTRL y Cilindro P.

La variabilidad explicada en el eje 1 es del 17.25% y del eje 2 del 9.245%, menor que la obtenida mediante el análisis UniFrac *Weighted*. También se puede observar que las muestras del grupo control quedan en una región diferente a las de los grupos CDI y P que quedan algo dispersas pero agrupadas.

5.5 ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL.

CAPÍTULO V – RESULTADOS

5.5.1 Diferencias a nivel de *phylum*.

5.5.1.1 Diferencias a nivel de *phylum* entre los grupos CDI y CTRL.

En la siguiente figura se observan las diferencias de composición en cuanto a abundancias relativas entre los grupos CDI y CTRL. Los grupos minoritarios han quedado excluidos debido a que apenas son visualizables en la figura.

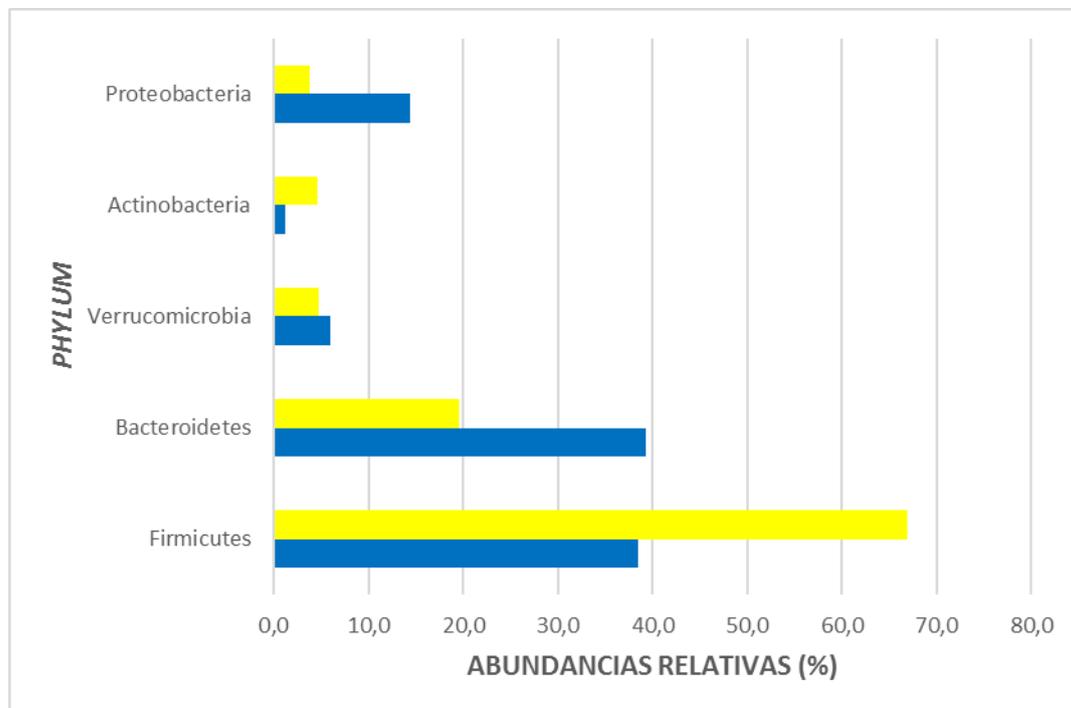


FIGURA 41: Diferencias en las abundancias relativas a nivel de *phylum* en los grupos CDI y CTRL. Grupo CDI en azul y Grupo CTRL en amarillo.

La siguiente tabla recoge todas abundancias relativas de los *phylum* existentes en los grupos CDI y CTRL y las diferencias estadísticamente significativas mediante la aplicación del test de Wilcoxon:

CAPÍTULO V – RESULTADOS

<i>PHYLUM</i>	MEDIA GRUPO CTRL (%)	MEDIA GRUPO CDI (%)	TEST DE WILCOXON (P-VALUES)
Firmicutes	66,8691	38,5533	0,0006
Bacteroidetes	19,5638	39,3656	0,0275
Verrucomicrobia	4,7534	5,9703	0,1605
Actinobacteria	4,6633	1,1694	0,0032
Proteobacteria	3,8165	14,3918	0,0154
Euryarchaeota	0,1141	0,0550	0,0260
Tenericutes	0,0680	0	0,0010
Patescibacteria	0,0618	0,0140	0,0002
Cyanobacteria	0,0533	0,0011	0,0252
Synergistetes	0,0271	0,2063	0,8314
Fusobacteria	0,0019	0,2291	0,4403
Epsilonbacteraeota	0,0000	0,0042	0,0906

TABLA 8: Diferencias en las abundancias relativas (%) a nivel de *phylum* entre los grupos CDI y CTRL. En negrita se destacan las diferencias estadísticamente significativas (P<0.05).

Por tanto, encontramos que de forma estadísticamente significativa existe una reducción en los pacientes con CDI con respecto a controles sanos en los *phylum* Firmicutes y Actinobacteria, y por otro lado, se produjo un aumento estadísticamente significativo en los *phylum* Bacteroidetes y Proteobacteria. Asimismo, es destacable el incremento no estadísticamente significativo de Verrucomicrobia en los pacientes con CDI con respecto a los controles sanos.

5.5.1.2. Diferencias a nivel de *phylum* entre los grupos P y CTRL.

En la siguiente figura se observan las diferencias de composición en cuanto a abundancias relativas entre los grupos P y CTRL. Los grupos minoritarios han quedado excluidos debido a que apenas son visualizables en la figura.

CAPÍTULO V – RESULTADOS

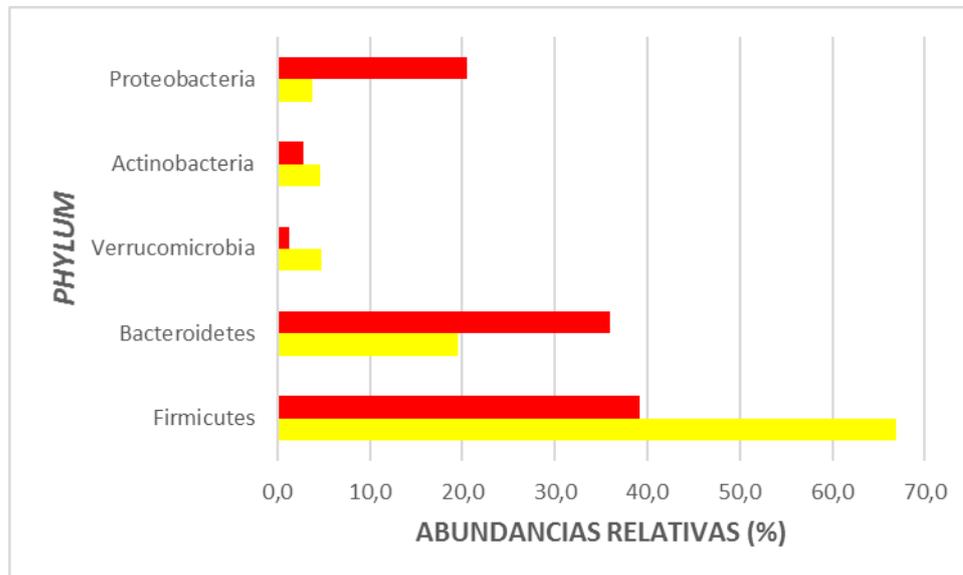


FIGURA 42: Diferencias en las abundancias relativas a nivel de *phylum* en los grupos P y CTRL. Grupo P en rojo y Grupo CTRL en amarillo.

La siguiente tabla recoge todas abundancias relativas de los *phylum* existentes en los grupos P y CTRL y las diferencias estadísticamente significativas mediante la aplicación del test de Wilcoxon:

CAPÍTULO V – RESULTADOS

<i>PHYLUM</i>	MEDIA GRUPO CTRL (%)	MEDIA GRUPO P (%)	TEST DE WILCOXON (P-VALUES)
Firmicutes	66,8691	39,1305	0,0016
Bacteroidetes	19,5638	36,0149	0,0521
Verrucomicrobia	4,7534	1,2742	0,0516
Actinobacteria	4,6633	2,7769	0,3261
Proteobacteria	3,8165	20,5514	0,0636
Euryarchaeota	0,1141	0,0369	0,0335
Tenericutes	0,0680	0,0038	0,0044
Patescibacteria	0,0618	0,1616	0,4162
Cyanobacteria	0,0533	0,0011	0,1293
Synergistetes	0,0271	0	0,0142
Fusobacteria	0,0019	0,0430	0,8388
Epsilonbacteraeota	0	0,0019	0,3697
Lentisphaerae	0	0,0016	0,3697

TABLA 9: Diferencias en las abundancias relativas (%) a nivel de *phylum* entre los grupos P y CTRL. En negrita se destacan las diferencias estadísticamente significativas (P<0.05)

Por tanto, encontramos que de forma estadísticamente significativa también observamos una reducción en los individuos colonizados por *C. difficile* con respecto a controles sanos en el *phylum* Firmicutes e incrementos en Bacteroidetes. También se observa un incremento en Proteobacteria no significativo, aunque la P es 0.0636. Asimismo, es destacable la reducción no estadísticamente significativa en los *phylum* Actinobacteria y Verrocomicrobia.

El patrón de las alteraciones encontradas a nivel de composición de *phylum* en los grupos P y CDI con respecto a los controles es sano es bastante similar. Las diferencias más notables que encontramos las podemos resumir en los siguientes puntos:

- Disminución estadísticamente significativa de Verrucomicrobia en el grupo P (1.2% frente a 4.7%) que no encontramos en el grupo CDI (5.9% frente a 4.7%).

CAPÍTULO V – RESULTADOS

- Disminución estadísticamente significativa de Actinobacteria en el grupo CDI (1.1% frente a 4.6%) que no encontramos en el grupo P (2.7% frente a 4.6%), aunque en P también existe una reducción en el *phylum* Actinobacteria aunque menos acentuada.
- El aumento en Proteobacteria es mayor en el grupo P (20.5% frente a 3.8%) que en el grupo CDI (14.3% frente a 3.8%) con respecto a controles sanos, si bien el aumento no es estadísticamente significativo en el primer grupo con respecto a los controles sanos ($P=0.0636$).

5.5.1.3. Diferencias a nivel de *phylum* entre los grupos P y CDI.

En la siguiente figura se observan las diferencias de composición en cuanto a abundancias relativas entre los grupos CDI y P. Los grupos minoritarios han quedado excluidos debido a que apenas son visualizables en la figura.

CAPÍTULO V – RESULTADOS

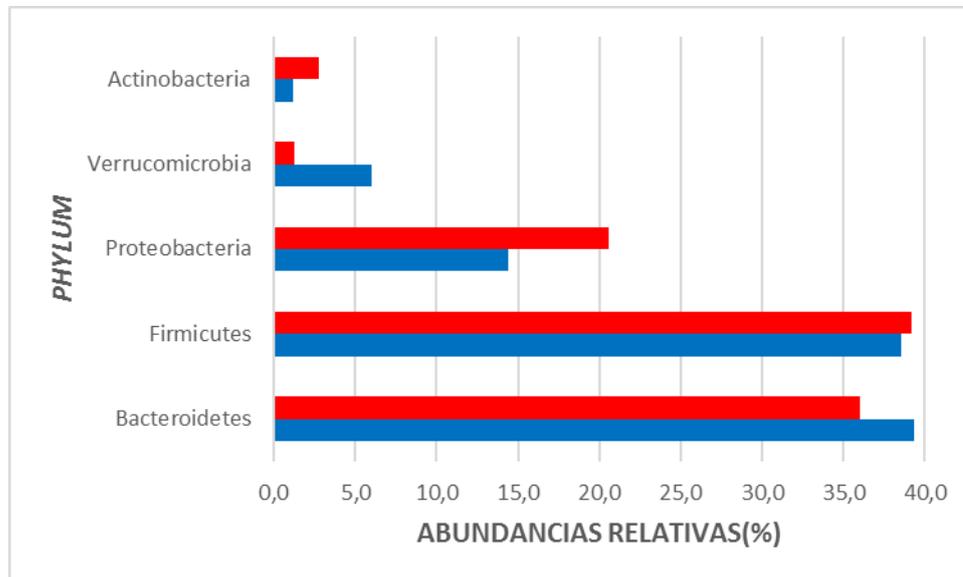


FIGURA 43: Diferencias en las abundancias relativas a nivel de *phylum* en los grupos P y CDI. Grupo P en rojo y Grupo CDI en azul.

La siguiente tabla recoge todas abundancias relativas de los *phylum* existentes en los grupos CDI y P y las diferencias estadísticamente significativas mediante la aplicación del test de Wilcoxon:

CAPÍTULO V – RESULTADOS

<i>PHYLUM</i>	MEDIA GRUPO CDI (%)	MEDIA GRUPO P (%)	TEST DE WILCOXON (<i>P-VALUES</i>)
Bacteroidetes	39,3656	36,0149	0,6783
Firmicutes	38,5533	39,1305	1
Proteobacteria	14,3918	20,5514	0,8357
Verrucomicrobia	5,9703	1,2742	0,8698
Actinobacteria	1,1694	2,7769	0,0889
Fusobacteria	0,2291	0,0430	0,3114
Synergistetes	0,2063	0	0,0384
Acetothermia	0,0652	0	0,3506
Euryarchaeota	0,0255	0,0369	1
Patescibacteria	0,0140	0,1616	0,0346
Epsilonbacteraeota	0,0042	0,0019	0,3258
Cyanobacteria	0,0011	0,0011	0,3616
Lentisphaerae	0	0,0016	0,3506
Tenericutes	0	0,0038	0,3506

TABLA 10: Diferencias en las abundancias relativas (%) a nivel de *phylum* entre los grupos P y CDI. En negrita se destacan las diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

Al comparar las abundancias relativas de los *phylum* de los grupos CDI y P corroboramos lo encontrado en los puntos 5.5.1.1 y 5.5.1.2 A nivel de *phylum* la microbiota intestinal de ambos grupos es muy similar, destacando principalmente como diferencias la reducción de Verrucomicrobia en el grupo P con respecto al grupo CDI, aunque de forma no estadísticamente significativa y la conservación en el grupo P de una mayor cantidad de Actinobacteria con respecto a la pérdida que se observa en el grupo CDI con respecto a los controles sanos.

CAPÍTULO V – RESULTADOS

5.5.2. Diferencias a nivel de familia.

5.5.2.1. Diferencias a nivel de familia entre los grupos CDI y CTRL.

En la siguiente figura se observan las diferencias de composición en cuanto a abundancias relativas a nivel de familia entre los grupos CDI y CTRL. Hemos eliminado de la figura los grupos minoritarios. Las familias mayoritarias suman en total entorno al 93% y 97% de las OTUS en los grupos CDI y CTRL respectivamente.

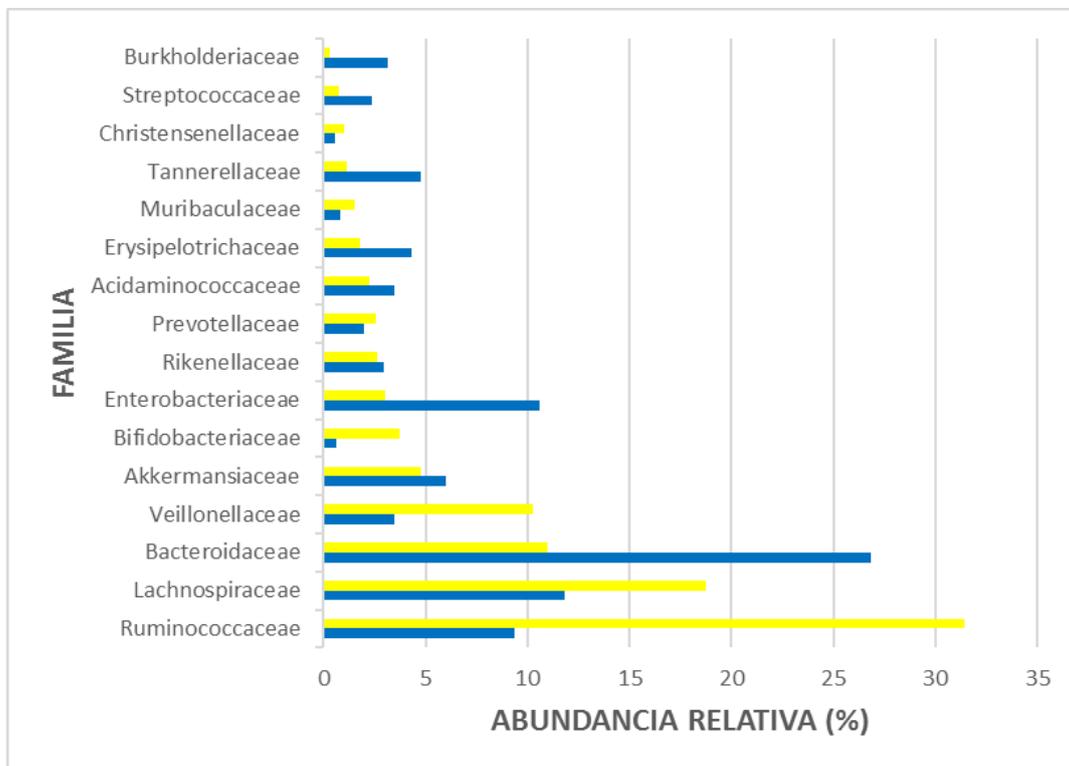


FIGURA 44: Diferencias en las abundancias relativas a nivel de familia en los grupos CDI y CTRL mayoritarias. Grupo CDI en azul y Grupo CTRL en amarillo.

CAPÍTULO V – RESULTADOS

La siguiente tabla recoge todas las diferencias en cuanto a estas abundancias relativas a nivel de familia entre los grupos CDI y CTRL y sus diferencias estadísticamente significativas aplicando el test de Wilcoxon:

<i>PHYLUM</i>	FAMILIA	MEDIA GRUPO CDI (%)	MEDIA GRUPO CTRL (%)	TEST DE WILCOXON (P-VALUES)
Firmicutes	Ruminococcaceae	9,3575	31,4165	0
Firmicutes	Lachnospiraceae	11,7971	18,7516	0,0771
Bacteroidetes	Bacteroidaceae	26,847	11,0028	0,0307
Firmicutes	Veillonellaceae	3,4787	10,2983	0,2216
Verrucomicrobia	Akkermansiaceae	5,9703	4,7534	0,1605
Actinobacteria	Bifidobacteriaceae	0,6280	3,7001	0,0076
Proteobacteria	Enterobacteriaceae	10,6111	3,0008	0,0521
Bacteroidetes	Rikenellaceae	2,9586	2,6011	0,1396
Bacteroidetes	Prevotellaceae	1,9641	2,5391	0,2280
Firmicutes	Acidaminococcaceae	3,4776	2,2511	0,9463
Firmicutes	Erysipelotrichaceae	4,3136	1,7810	0,3710
Bacteroidetes	Muribaculaceae	0,8198	1,5379	0,5039
Bacteroidetes	Tannerellaceae	4,7580	1,1344	0,4982
Firmicutes	Christensenellaceae	0,5444	1,0361	0,0076
Firmicutes	Streptococcaceae	2,3442	0,7527	0,0701
Actinobacteria	Coriobacteriaceae	0,2973	0,7479	0,0067
Bacteroidetes	Barnesiellaceae	0,7821	0,3979	0,0992
Firmicutes	<i>Clostridiales Family XIII</i>	0,6161	0,3389	0,0171
Proteobacteria	Desulfovibrionaceae	0,2491	0,3337	0,1184
Proteobacteria	Burkholderiaceae	3,1479	0,2873	0,6777
Bacteroidetes	Marinifilaceae	1,0632	0,2665	0,4355
Actinobacteria	Eggerthellaceae	0,1893	0,0848	0,3017
Firmicutes	Peptostreptococcaceae	0,5298	0,0600	0,0134
Patescibacteria	Saccharimonadaceae	0,0090	0,0554	0,0001
Proteobacteria	Pasteurellaceae	0,1624	0,0512	0,8731
Firmicutes	Peptococcaceae	0	0,0427	0,0010
Actinobacteria	Actinomycetaceae	0,0286	0,0396	0,0298
Actinobacteria	Atopobiaceae	0,0185	0,0372	0,0295
Actinobacteria	<i>Coriobacteriales Incertae Sedis</i>	0,0030	0,0355	0,0167
Synergistetes	Synergistaceae	0,2063	0,0271	0,8314

CAPÍTULO V – RESULTADOS

Firmicutes	Bacillales Family XI	0,0034	0,0188	0,0006
Firmicutes	Clostridiaceae 1	0,2619	0,0152	0,9438
Firmicutes	Defluviitaleaceae	0,0012	0,0137	0,0044
Firmicutes	Carnobacteriaceae	0,0269	0,0116	0,6495
Firmicutes	Lactobacillaceae	1,0287	0,0111	0,3307
Tenericutes	Firmicutes bacterium CAG:822	0	0,0110	0,3340
Bacteroidetes	Flavobacteriaceae	0,0360	0,0107	0,1747
Firmicutes	Leuconostocaceae	0,0005	0,0105	0,0186
Firmicutes	Clostridiales vadinBB60 Group	0,0278	0,0104	0,9152
Firmicutes	Eubacteriaceae	0,0031	0,0056	0,3905
Bacteroidetes	Porphyromonadaceae	0,0478	0,0028	0,1742
Firmicutes	Fusobacteriaceae	0,2291	0,0017	0,2800
Firmicutes	Aerococcaceae	0,0064	0,0011	0,9710
Firmicutes	Clostridiales Family XI	0,0447	0,0010	0,5987
Proteobacteria	Neisseriaceae	0,0003	0,0009	0,5359
Cyanobacteria	Family Clostridium sp. CAG:306	0	0,0006	0,3340
Firmicutes	Staphylococcaceae	0,0020	0,0005	1
Proteobacteria	Cardiobacteriaceae	0	0,0005	0,3340
Tenericutes	Anaeroplasmataceae	0	0,0005	0,3340
Actinobacteria	Corynebacteriaceae	0	0,0004	0,3340
Actinobacteria	Micrococcaceae	0,0046	0,0004	0,5634
Tenericutes	Mycoplasmataceae	0	0,0003	0,1498
Firmicutes	Leptotrichiaceae	0	0,0002	0,3340
Acetothermia	uncultured bacterium 'KTK 32'	0,0454	0	0,3697
Epsilonbacteriota	Campylobacteraceae	0,0042	0	0,0906
Firmicutes	Enterococcaceae	0,6853	0	0,0009
Proteobacteria	Rhizobiaceae	0,0006	0	0,3697
Proteobacteria	Xanthobacteraceae	0,0012	0	0,3697
Proteobacteria	Desulfohalobiaceae	0,2192	0	0,3697

TABLA 11: Diferencias en las abundancias relativas (%) a nivel de familia entre los grupos CDI y CTRL. En negrita se destacan las diferencias estadísticamente significativas (P<0.05).

Observamos que de forma estadísticamente significativa existe una reducción en los pacientes con CDI con respecto a controles sanos de las familias Ruminococcaceae, Christensenellaceae y Bifidobacteriaceae. De forma no estadísticamente significativa destacan las reducciones en ciertas familias como Lachnospiraceae, Veillonellaceae, Prevotellaceae y ya como familia muy

CAPÍTULO V – RESULTADOS

minoritaria Eubacteriaceae. Por el contrario, de forma estadísticamente significativa encontramos incrementos en los pacientes con CDI con respecto a los controles sanos en las familias Bacteroidaceae, Peptostreptococcaceae (la familia a la cual pertenece *C. difficile*) y Enterococcaceae. De forma no estadísticamente significativa destacan los aumentos en ciertas familias como Enterobacteriaceae ($P=0.0521$), Akkermansiaceae, Streptococcaceae y Burkholderiaceae y de familias minoritarias como Lactobacillaceae.

5.5.2.2. Diferencias a nivel de familia entre los grupos P y CTRL.

En las siguientes figuras se observan las diferencias de composición en cuanto a abundancias relativas de los grupos P y CTRL. No se incluye en la figura los grupos muy minoritarios e irrelevantes. Las familias mayoritarias suman en total en torno al 95% y 90% de las OTUS en los grupos P y CTRL respectivamente.

CAPÍTULO V – RESULTADOS

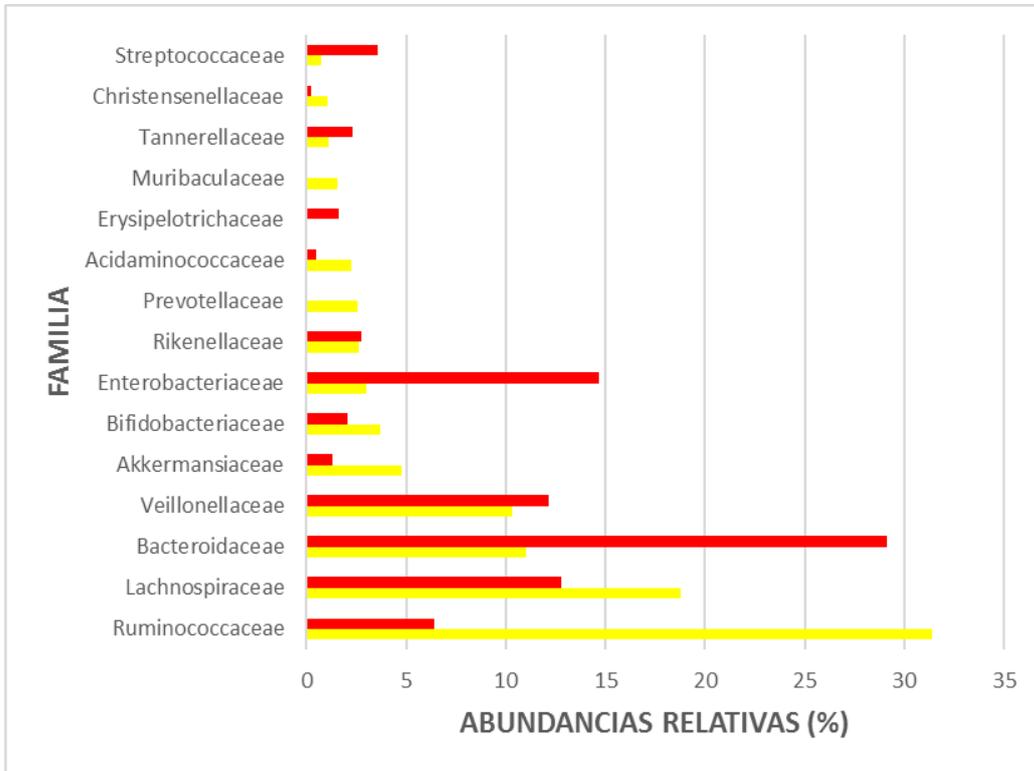


FIGURA 45: Diferencias en las abundancias relativas a nivel de familia en los grupos P y CTRL mayoritarias. Grupo P en rojo y Grupo CTRL en amarillo.

La siguiente tabla recoge todas las diferencias en cuanto a estas abundancias relativas a nivel de familia entre los grupos P y CTRL:

PHYLUM	FAMILIA	MEDIA GRUPO CTRL	MEDIA GRUPO P	TEST DE WILCOXON (P-VALUES)
--------	---------	------------------	---------------	-----------------------------

CAPÍTULO V – RESULTADOS

		(%)	(%)	
Firmicutes	Ruminococcaceae	31,4165	6,3853	0
Firmicutes	Lachnospiraceae	18,7516	12,8014	0,1213
Bacteroidetes	Bacteroidaceae	11,0028	29,1252	0,0137
Firmicutes	Veillonellaceae	10,2983	12,1379	0,7765
Verrucomicrobia	Akkermansiaceae	4,7534	1,2733	0,0516
Actinobacteria	Bifidobacteriaceae	3,7001	2,0634	0,3698
Proteobacteria	Enterobacteriaceae	3,0008	14,7078	0,0771
Bacteroidetes	Rikenellaceae	2,6011	2,7723	0,0630
Bacteroidetes	Prevotellaceae	2,5391	1,4350	0,0028
Firmicutes	Acidaminococcaceae	2,2511	0,5025	0,0278
Firmicutes	Erysipelotrichaceae	1,7810	1,6278	0,0521
Bacteroidetes	Muribaculaceae	1,5379	0	0,0318
Bacteroidetes	Tannerellaceae	1,1344	2,3343	0,2849
Firmicutes	Christensenellaceae	1,0361	0,2209	0,0028
Firmicutes	Streptococcaceae	0,7527	3,5860	0,3481
Actinobacteria	Coriobacteriaceae	0,7479	0,2547	0,0021
Bacteroidetes	Barnesiellaceae	0,3979	0,1666	0,0038
Firmicutes	Clostridiales Family XIII	0,3389	0,2075	0,0194
Proteobacteria	Desulfovibrionaceae	0,3337	0,7959	0,8773
Proteobacteria	Burkholderiaceae	0,2873	1,2026	0,5548
Bacteroidetes	Marinifilaceae	0,2665	0,1691	0,1447
Actinobacteria	Eggerthellaceae	0,0848	0,2585	0,6153
Firmicutes	Peptostreptococcaceae	0,0600	0,4781	0,0242
Patescibacteria	Saccharimonadaceae	0,0554	0,1362	0,4958
Proteobacteria	Pasteurellaceae	0,0512	0,2238	0,7095
Firmicutes	Peptococcaceae	0,0427	0,0046	0,0167
Actinobacteria	Actinomycetaceae	0,0396	0,1240	0,7590
Actinobacteria	Atopobiaceae	0,0372	0,0640	0,5083
Synergistetes	Synergistaceae	0,0271	0	0,0142
Actinobacteria	Coriobacteriales Incertae Sedis	0,0355	0,0062	0,0220
Firmicutes	Bacillales Family XI	0,0188	0,1199	0,5182
Firmicutes	Clostridiaceae 1	0,0152	0,0255	0,6938
Firmicutes	Defluviitaleaceae	0,0137	0,0013	0,0080
Firmicutes	Carnobacteriaceae	0,0116	0,0870	0,0330

CAPÍTULO V – RESULTADOS

Firmicutes	Lactobacillaceae	0,0111	0,2269	0,1475
Bacteroidetes	Flavobacteriaceae	0,0107	0	0,0061
Firmicutes	Leuconostocaceae	0,0105	0,0260	0,1747
Firmicutes	Clostridiales vadinBB60 Group	0,0104	0,0783	0,9152
Firmicutes	Eubacteriaceae	0,0056	0,0127	0,9203
Bacteroidetes	Porphyromonadaceae	0,0028	0,0114	0,1742
Fusobacteria	Fusobacteriaceae	0,0017	0,0430	0,9263
Firmicutes	Aerococcaceae	0,0011	0,0385	0,0911
Firmicutes	Clostridiales Family XI	0,0010	0,0184	0,6618
Proteobacteria	Neisseriaceae	0,0009	0	0,1498
Firmicutes	Staphylococcaceae	0,0005	0,0278	0,3258
Proteobacteria	Cardiobacteriaceae	0,0005	0	0,3340
Tenericutes	Anaeroplasmataceae	0,0005	0	0,3340
Actinobacteria	Micrococcaceae	0,0004	0,0021	0,1639
Actinobacteria	Corynebacteriaceae	0,0004	0,0003	0,9604
Tenericutes	Mycoplasmataceae	0,0003	0	0,1498
Fusobacteria	Leptotrichiaceae	0,0002	0	0,3340
Firmicutes	Enterococcaceae	0	0,4993	0,0021
Actinobacteria	Propionibacteriaceae	0	0,0037	0,3697
Bacteroidetes	Dysgonomonadaceae	0	0,0005	0,3697
Epsilonbacteraeota	Campylobacteraceae	0	0,0019	0,3697
Firmicutes	Bacillales Family XII	0	0,0002	0,3697
Firmicutes	Syntrophomonadaceae	0	0,0002	0,3697
Lentisphaerae	Victivallaceae	0	0,0016	0,3697
Proteobacteria	Holosporaceae	0	0,0002	0,3697
Proteobacteria	Paracaedibacteraceae	0	0,0002	0,3697
Proteobacteria	Xanthobacteraceae	0	0,0002	0,3697
Proteobacteria	Pseudomonadaceae	0	0,0015	0,3697
Verrucomicrobia	Puniceicoccaceae	0	0,0008	0,3697

TABLA 12: Diferencias en las abundancias relativas (%) a nivel de familia entre los grupos P y CTRL. En negrita se destacan las diferencias estadísticamente significativas (P<0.05).

Observamos que de forma estadísticamente significativa existe una reducción en los individuos colonizados por *C. difficile* con respecto a los controles sanos de las familias Rumminococcaceae, Akkermansiaceae, Prevotellaceae, Acidominococcaceae, Erysipelotrichaceae, Muribaculaceae, Christensenellaceae, y

CAPÍTULO V – RESULTADOS

Barnesiellaceae. De forma no estadísticamente significativa destacan las reducciones en ciertas familias como Lachnospiraceae y Bifidobacteriaceae. Por el contrario, de forma estadísticamente significativa observamos aumentos en los individuos colonizados por *C. difficile* con respecto a los controles sanos en las familias Bacteroidaceae, Peptostreptococcaceae (la familia a la cual pertenece *C. difficile*) y Enterococcaceae. De forma no estadísticamente significativa destacan los incrementos en ciertas familias como Veillonellaceae, Enterobacteriaceae, Rikenellaceae, Tannerellaceae y Streptococcaceae, y dentro de familias minoritarias aparecen aumentos en familias como Burkholderiaceae, Eubacteriaceae y Lactobacillaceae.

A nivel de familia podemos describir ciertas diferencias en cuanto a las abundancias relativas de ciertos grupos de bacterias, que nos permitiría caracterizar el patrón de disbiosis de ambos grupos con respecto a los controles sanos. Entre las familias mayoritarias destacamos una serie de diferencias entre los grupos P y CDI. Dentro de las familias del *phylum* Firmicutes observamos:

- Si bien en ambos grupos se producen reducciones en las familias Ruminococcaceae y Lachnospiraceae, en Ruminococcaceae es ligeramente más pronunciada en el grupo P.
- Se produce una disminución de la familia Acidominococcaceae en el grupo P y un aumento en el grupo CDI.
- Se produce un aumento de la familia Erysipelotrichaceae en el grupo CDI mientras que en el grupo P la abundancia relativa es similar a la de los controles sanos.
- En la familia Christensenellaceae se produce un descenso en ambos grupos, pero es más pronunciado en el grupo P.
- En la familia Streptococcaceae se produce un aumento en ambos grupos, pero es más pronunciado en el grupo P.
- Se produce un aumento de la familia Veillonellaceae en el grupo P y una disminución en el grupo CDI.
- Por último, destacar que la familia Enterococcaceae no aparece en los controles sanos, no obstante, en el grupo CDI y P sus abundancias relativas son respectivamente 0.6% y 0.5%.

CAPÍTULO V – RESULTADOS

Con respecto a las familias del *phylum* Bacteroidetes destacamos:

- En la familia Prevotellaceae se produce un descenso en ambos grupos, pero es más pronunciado en el grupo P.
- Se produce una desaparición total de la familia Muribaculaceae en el grupo P y una reducción en el grupo CDI con respecto a los controles sanos.
- En la familia Tamerellaceae se produce un aumento en ambos grupos, pero es más pronunciado en el grupo CDI.

En el *phylum* Proteobacteria destacamos:

- En la familia Enterobacteriaceae se produce un aumento en ambos grupos, pero es más pronunciado en el grupo P.
- En la familia Burkholderiaceae se produce un aumento en ambos grupos, pero es más pronunciado en el grupo CDI.

Por último, dentro de los *phylum* Verrucomicrobia y Actinobacteria respectivamente destacamos:

- Se produce una disminución de la familia Akkermansiaceae en el grupo P y un aumento en el grupo CDI.
- En la familia Bifidobacteriaceae se produce un descenso en ambos grupos, pero es más pronunciado en el grupo CDI.

Por otro lado, dentro de las familias minoritarias, las diferencias entre los grupos P y CDI son sutiles en muchos casos, pero destacamos las siguientes en con respecto a los controles sanos:

- La familia Peptostreptococcaceae, a la cual pertenece *C. difficile*, no aparece en los controles sanos, no obstante, en el grupo CDI y P sus abundancias relativas son respectivamente 0.5298% y 0.4781%.
- Se produce una disminución de la familia Barnesiellaceae y Marinifilaceae, ambas del *phylum* Bacteroidetes, en el grupo P y un aumento en el grupo CDI
- En la familia Lactobacillaceae (Firmicutes) se produce un aumento en ambos grupos, pero es más pronunciado en el grupo CDI (1.0287% y 0.2269%).

CAPÍTULO V – RESULTADOS

- Se produce un aumento de la familia Eubacteriaceae (Firmicutes) en el grupo P y una disminución en el grupo CDI (0.0127% y 0.0031%) frente a los controles sanos (0.0056%).

5.5.2.3. *Diferencias a nivel de familia entre los grupos P y CDI.*

En la siguiente figura se observan las diferencias de composición en cuanto a abundancias relativas de las familias mayoritarias de los grupos P y CDI. Las familias mayoritarias suman en total entorno al 90% y 93% de las OTUS en los grupos P y CDI respectivamente.

CAPÍTULO V – RESULTADOS

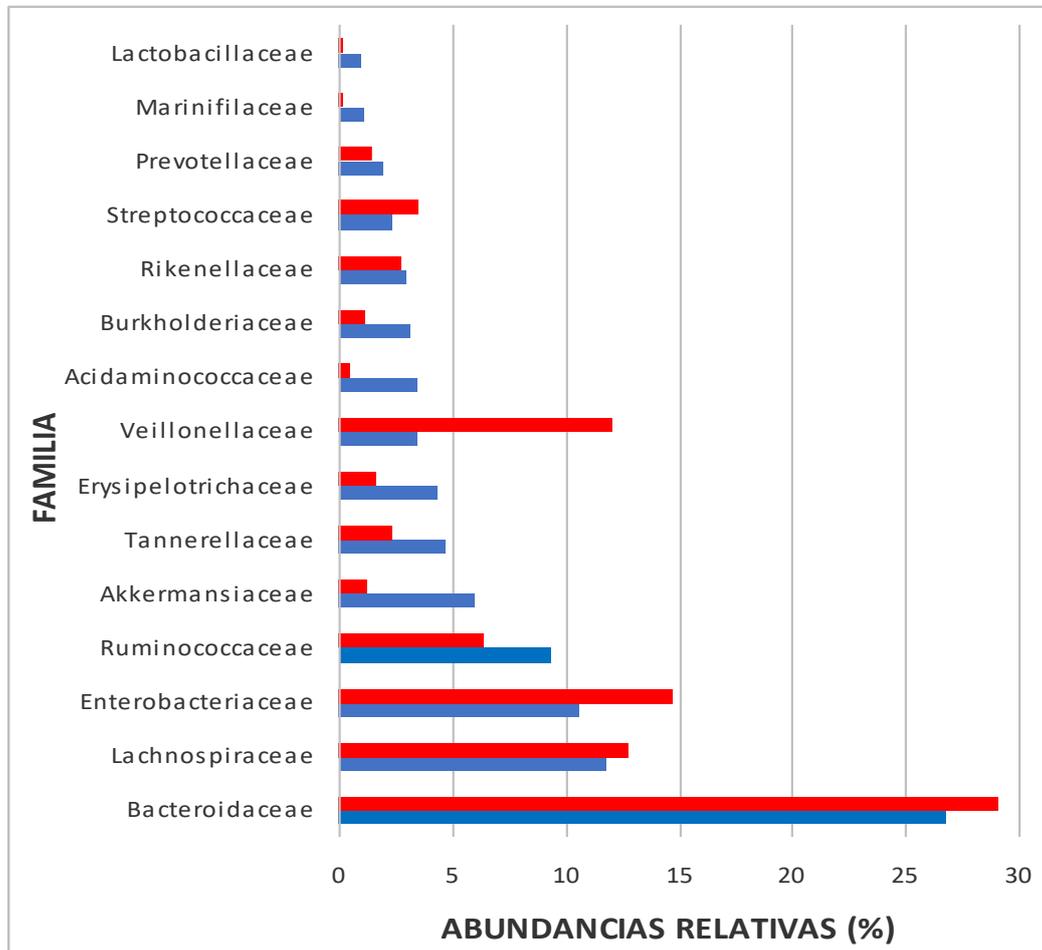


FIGURA 46: Diferencias en las abundancias relativas a nivel de familia en los grupos P y CDI mayoritarias. Grupo P en rojo y Grupo CDI en azul.

La siguiente tabla recoge todas las diferencias en cuanto a estas abundancias relativas a nivel de familia entre los grupos P y CDI:

CAPÍTULO V – RESULTADOS

<i>PHYLUM</i>	FAMILIA	MEDIA GRUPO CDI (%)	MEDIA GRUPO P (%)	TEST DE WILCOXON (<i>P-VALUES</i>)
Bacteroidetes	Bacteroidaceae	26,847	29,1252	0,7400
Firmicutes	Lachnospiraceae	11,7971	12,8014	0,8035
Proteobacteria	Enterobacteriaceae	10,6111	14,7078	0,7399
Firmicutes	Ruminococcaceae	9,3575	6,3853	0,1150
Verrucomicrobia	Akkermansiaceae	5,9703	1,2733	0,8698
Bacteroidetes	Tannerellaceae	4,7580	2,3343	0,5322
Firmicutes	Erysipelotrichaceae	4,3136	1,6278	0,0251
Firmicutes	Veillonellaceae	3,4787	12,1379	0,6185
Firmicutes	Acidaminococcaceae	3,4776	0,5025	0,1190
Proteobacteria	Burkholderiaceae	3,1479	1,2026	0,7376
Bacteroidetes	Rikenellaceae	2,9586	2,7723	0,7952
Firmicutes	Streptococcaceae	2,3442	3,5860	0,1300
Bacteroidetes	Prevotellaceae	1,9641	1,4350	0,0150
Bacteroidetes	Marinifilaceae	1,0632	0,1691	0,4092
Firmicutes	Lactobacillaceae	1,0287	0,2269	0,8470
Bacteroidetes	Muribaculaceae	0,8198	0	0,0797
Bacteroidetes	Barnesiellaceae	0,7821	0,1666	0,5015
Firmicutes	Enterococcaceae	0,6853	0,4993	1
Actinobacteria	Bifidobacteriaceae	0,6280	2,0634	0,1653
Firmicutes	Clostridiales <i>Family XIII</i>	0,6161	0,2075	0,2553
Firmicutes	Christensenellaceae	0,5444	0,2209	0,8433
Firmicutes	Peptostreptococcaceae	0,5298	0,4781	0,5755
Actinobacteria	Coriobacteriaceae	0,2973	0,2547	0,3875
Firmicutes	Clostridiaceae 1	0,2619	0,0255	0,8906
Proteobacteria	Desulfovibrionaceae	0,2491	0,7959	0,1917
Fusobacteria	Fusobacteriaceae	0,2291	0,0430	0,3114
Proteobacteria	Desulfohalobiaceae	0,2192	0	0,3506
Synergistetes	Synergistaceae	0,2063	0	0,0384
Actinobacteria	Eggerthellaceae	0,1893	0,2585	0,5235
Proteobacteria	Pasteurellaceae	0,1624	0,2238	0,9787
Bacteroidetes	Porphyromonadaceae	0,0478	0,0114	1
Firmicutes	Clostridiales <i>Family XI</i>	0,0447	0,0184	0,4885
Bacteroidetes	Flavobacteriaceae	0,0360	0	0,1644
Actinobacteria	Actinomycetaceae	0,0286	0,1240	0,0502
Firmicutes	Clostridiales <i>vadinBB60 Group</i>	0,0278	0,0783	0,9363

CAPÍTULO V – RESULTADOS

Firmicutes	Carnobacteriaceae	0,0269	0,0870	0,0414
Actinobacteria	Atopobiaceae	0,0185	0,0640	0,2517
Patescibacteria	Saccharimonadaceae	0,0090	0,1362	0,0307
Firmicutes	Aerococcaceae	0,0064	0,0385	0,1429
Actinobacteria	Micrococcaceae	0,0046	0,0021	0,4230
Epsilonbacteraeota	Campylobacteraceae	0,0042	0,0019	0,3258
Firmicutes	Bacillales Family XI	0,0034	0,1199	0,0317
Firmicutes	Eubacteriaceae	0,0031	0,0127	0,3311
Actinobacteria	Coriobacteriales Incertae Sedis	0,0030	0,0062	0,9720
Firmicutes	Staphylococcaceae	0,0020	0,0278	0,3258
Firmicutes	Defluviitaleaceae	0,0012	0,0013	0,6327
Proteobacteria	Xanthobacteraceae	0,0012	0,0002	1
Proteobacteria	Rhizobiaceae	0,0006	0	0,3506
Firmicutes	Leuconostocaceae	0,0005	0,0260	0,2615
Proteobacteria	Neisseriaceae	0,0003	0	0,3506
Firmicutes	Peptococcaceae	0	0,0046	0,1644
Actinobacteria	Corynebacteriaceae	0	0,0003	0,3506
Actinobacteria	Propionibacteriaceae	0	0,0037	0,3506
Bacteroidetes	Dysgonomonadaceae	0	0,0005	0,3506
Firmicutes	Bacillales Family XII	0	0,0002	0,3506
Lentisphaerae	Victivallaceae	0	0,0016	0,3506
Proteobacteria	Holosporaceae	0	0,0002	0,3506
Proteobacteria	Paracaedibacteraceae	0	0,0002	0,3506
Proteobacteria	Pseudomonadaceae	0	0,0015	0,3506

TABLA 13: Diferencias en las abundancias relativas (%) a nivel de familia entre los grupos P y CDI. En negrita se destacan las diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

Al comparar los grupos CDI y P, a pesar de las diferencias expuestas en el apartado 5.5.2.2 “Diferencias a nivel de Familia entre los grupos P y CTRL” con respecto a los controles sanos, encontramos pocas familias en las que se produzcan diferencias estadísticamente significativas. Asimismo, destacamos que de forma estadísticamente significativa observamos disminuciones en el grupo P con respecto al CDI de las familias Erysipelotrichaceae y Prevotellaceae.

CAPÍTULO V – RESULTADOS

5.5.3. Diferencias a nivel de género.

5.5.3.1. Diferencias a nivel de género entre los grupos CDI y CTRL.

Vamos a ir analizando dentro de cada *phylum* las diferencias que observamos en los géneros de las distintas familias. En primer lugar, vamos a observar las diferencias en cuanto a la composición a nivel del género en los grupos CDI y CTRL dentro del *phylum* Firmicutes. En la siguiente tabla se recogen las abundancias relativas y sus diferencias aplicando el test de Wilcoxon:

PHYLUM FIRMICUTES				
FAMILIA	GÉNERO	MEDIA GRUPO CDI (%)	MEDIA GRUPO CTRL (%)	TEST DE WILCOXON (P-VALUES)
Acidaminococcaceae	<i>Phascolarctobacterium</i>	2,7366	2,1897	0,6639
Acidaminococcaceae	<i>Acidaminococcus</i>	0,7410	0,0614	0,1742
Aerococcaceae	<i>Abiotrophia</i>	0,0064	0,0011	0,9710
Carnobacteriaceae	<i>Granulicatella</i>	0,0269	0,0116	0,6495
Christensenellaceae	<i>Christensenellaceae R-7 Group</i>	0,5330	0,9856	0,0043
Christensenellaceae	<i>Catabacter</i>	0	0,0171	0,0025
Clostridiaceae 1	<i>Clostridium Sensu Stricto 1</i>	0,2590	0,0152	0,9812
Clostridiaceae 1	<i>Clostridium Sensu Stricto 13</i>	0,0029	0	0,3697
Defluviitaleaceae	<i>Defluviitaleaceae UCG-011</i>	0,0012	0,0137	0,0044
Enterococcaceae	<i>Enterococcus</i>	0,6853	0	0,0009
Erysipelotrichaceae	<i>Erysipelotrichaceae UCG-003</i>	0,0018	0,7502	0
Erysipelotrichaceae	<i>Catenibacterium</i>	0	0,3247	0,0318
Erysipelotrichaceae	<i>Holdemanella</i>	0,0149	0,2120	0,9604
Erysipelotrichaceae	<i>Faecalitalea</i>	0,0014	0,1819	0,0013
Erysipelotrichaceae	<i>Erysipelatoclostridium</i>	2,9142	0,1754	0,0595
Erysipelotrichaceae	<i>Solobacterium</i>	0,0108	0,0392	0,0006
Erysipelotrichaceae	<i>Holdemania</i>	0,0134	0,0357	0,0079
Erysipelotrichaceae	<i>Clostridium innocuum Group</i>	0,9964	0,0115	0,0001
Erysipelotrichaceae	<i>Merdibacter</i>	0,0505	0,0114	0,0938
Erysipelotrichaceae	<i>Faecalicoccus</i>	0	0,0080	0,1498
Erysipelotrichaceae	<i>Erysipelotrichaceae UCG-006</i>	0	0,0040	0,3340

CAPÍTULO V – RESULTADOS

Erysipelotrichaceae	<i>Coprobacillus</i>	0,0452	0,0031	0,8388
Erysipelotrichaceae	<i>Dielma</i>	0,0028	0,0028	0,0449
Erysipelotrichaceae	<i>Erysipelotrichaceae UCG-004</i>	0	0,0023	0,0694
Erysipelotrichaceae	<i>Turicibacter</i>	0,0106	0,0017	0,7403
Erysipelotrichaceae	<i>Catenisphaera</i>	0	0,0012	0,3340
Eubacteriaceae	<i>Anaerofustis</i>	0,0020	0,0053	0,0901
Eubacteriaceae	<i>Eubacterium</i>	0,0011	0,0003	0,5634
Bacillales Family XI	<i>Gemella</i>	0,0034	0,0188	0,0006
Bacillales Family XI	<i>Parvoimonas</i>	0,0002	0,0005	0,3258
Bacillales Family XI	<i>Anaerococcus</i>	0,0433	0,0002	1
Bacillales Family XI	<i>Peptoniphilus</i>	0,0012	0,0002	0,9710
Bacillales Family XI	<i>Ezakiella</i>	0	0,0001	0,3340
Clostridiales Family XIII	Family XIII AD3011 Group	0,5922	0,2136	0,0112
Clostridiales Family XIII	Family XIII UCG-001	0	0,0575	0
Clostridiales Family XIII	<i>Eubacterium brachy</i> Group	0	0,0334	0,0004
Clostridiales Family XIII	<i>Eubacterium nodatum</i> Group	0,0239	0,0196	0,0261
Clostridiales Family XIII	<i>Mogibacterium</i>	0	0,0013	0,1498
Lachnospiraceae	<i>Agathobacter</i>	0,0374	6,2873	0
Lachnospiraceae	<i>Roseburia</i>	0,1196	2,7259	0
Lachnospiraceae	<i>Lachnospiraceae NK4A136</i> Group	0,1112	1,4926	0,0001
Lachnospiraceae	<i>Ruminococcus torques</i> Group	1,1256	0,9151	0,4958
Lachnospiraceae	<i>Coprococcus 3</i>	0,0024	0,7409	0
Lachnospiraceae	<i>Ruminococcus gnavus</i> Group	3,2177	0,7389	0,0954
Lachnospiraceae	<i>Dorea</i>	0,0377	0,7318	0
Lachnospiraceae	<i>Eubacterium ventriosum</i> Group	0	0,7224	0
Lachnospiraceae	<i>Blautia</i>	0,5904	0,6994	0,1831
Lachnospiraceae	<i>Lachnoclostridium</i>	3,2330	0,3400	0,0195
Lachnospiraceae	<i>Eubacterium eligens</i> Group	0,0063	0,3189	0,0260
Lachnospiraceae	<i>Coprococcus 2</i>	0	0,2555	0,0142
Lachnospiraceae	<i>Tyzzarella 3</i>	0	0,2178	0,0142
Lachnospiraceae	<i>Anaerostipes</i>	0,0109	0,1775	0,0093
Lachnospiraceae	<i>Eubacterium xylanophilum</i> Group	0	0,1578	0,0001
Lachnospiraceae	<i>Fusicatenibacter</i>	0	0,1452	0
Lachnospiraceae	CAG-56	0	0,1232	0
Lachnospiraceae	<i>Tyzzarella 4</i>	0,8277	0,0977	0,0746
Lachnospiraceae	<i>Lachnospiraceae UCG-010</i>	0,0961	0,0932	0,0028
Lachnospiraceae	<i>Sellimonas</i>	0,1300	0,0650	0,6169

CAPÍTULO V – RESULTADOS

Lachnospiraceae	<i>Lachnospira</i>	0	0,0578	0,0025
Lachnospiraceae	<i>Howardella</i>	0	0,0576	0,0142
Lachnospiraceae	<i>Eubacterium ruminantium Group</i>	0	0,0420	0,1498
Lachnospiraceae	Lachnospiraceae UCG-001	0	0,0408	0,0142
Lachnospiraceae	<i>Shuttleworthia</i>	0,0033	0,0348	0,2542
Lachnospiraceae	<i>Lachnospiraceae UCG-004</i>	0,0003	0,0329	0,0522
Lachnospiraceae	GCA-900066575	0	0,0298	0,0001
Lachnospiraceae	Lachnospiraceae FCS020 Group	0,0062	0,0203	0,0043
Lachnospiraceae	UC5-1-2E3	0	0,0179	0,0025
Lachnospiraceae	<i>Eisenbergiella</i>	0,1793	0,0168	0,4838
Lachnospiraceae	<i>Ruminococcus gauvreauii Group</i>	0,0324	0,0138	0,0043
Lachnospiraceae	<i>Coprococcus 1</i>	0	0,0135	0,0025
Lachnospiraceae	<i>Moryella</i>	0,0010	0,0131	0,0217
Lachnospiraceae	Lachnospiraceae ND3007 Group	0	0,0095	0,0142
Lachnospiraceae	<i>Marvinbryantia</i>	0	0,0083	0,0061
Lachnospiraceae	<i>Eubacterium fissicatena Group</i>	0,0082	0,0053	0,5155
Lachnospiraceae	<i>Eubacterium hallii Group</i>	0,0011	0,0040	0,0790
Lachnospiraceae	<i>Tyzzarella</i>	0,0053	0,0035	0,8899
Lachnospiraceae	<i>Lachnospiraceae UCG-008</i>	0	0,0034	0,0694
Lachnospiraceae	GCA-900066755	0,0022	0,0031	0,0901
Lachnospiraceae	<i>Oribacterium</i>	0,0005	0,0031	0,5359
Lachnospiraceae	Hungatella	0,5656	0,0028	0,0126
Lachnospiraceae	<i>Lachnospiraceae NK4B4 Group</i>	0	0,0023	0,3340
Lachnospiraceae	<i>Butyrivibrio</i>	0,0217	0,0021	0,5916
Lachnospiraceae	<i>Acetitomaculum</i>	0	0,0019	0,3340
Lachnospiraceae	<i>Lactonifactor</i>	0,0024	0,0014	1
Lachnospiraceae	<i>Johnsonella</i>	0,0012	0,0010	0,5916
Lachnospiraceae	<i>Lachnoanaerobaculum</i>	0	0,0006	0,3340
Lachnospiraceae	<i>Eubacterium oxidoreducens Group</i>	0	0,0001	0,3340
Lachnospiraceae	<i>Anaerospobacter</i>	0,0024	0	0,3697
Lachnospiraceae	<i>Cellulosilyticum</i>	0,0044	0	0,3697
Lachnospiraceae	<i>Epulopiscium</i>	0,5071	0	0,3697
Lachnospiraceae	<i>Lachnoclostridium 5</i>	0,0447	0	0,3697
Lachnospiraceae	<i>Lachnospiraceae NC2004 Group</i>	0,0007	0	0,3697
Lachnospiraceae	<i>Robinsoniella</i>	0,0207	0	0,1800
Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i>	1,0017	0,0111	0,3307
Lactobacillaceae	<i>Pediococcus</i>	0,0270	0	0,3697

CAPÍTULO V – RESULTADOS

Leptotrichiaceae	<i>Sneathia</i>	0	0,0002	0,3340
Leuconostocaceae	<i>Leuconostoc</i>	0,0005	0,0057	0,0522
Leuconostocaceae	<i>Weissella</i>	0	0,0049	0,1498
Peptococcaceae	<i>Peptococcus</i>	0	0,0093	0,0694
Peptostreptococcaceae	<i>Romboutsia</i>	0,1560	0,0592	0,0298
Peptostreptococcaceae	<i>Intestinibacter</i>	0	0,0004	0,3340
Peptostreptococcaceae	<i>Peptostreptococcus</i>	0,0047	0,0003	0,2913
Peptostreptococcaceae	<i>Clostridioides</i>	0,3668	0	0
Peptostreptococcaceae	<i>Paeniclostridium</i>	0,0017	0	0,1800
Peptostreptococcaceae	<i>Terrisporobacter</i>	0,0006	0	0,3697
Ruminococcaceae	<i>Faecalibacterium</i>	3,2948	11,2857	0,0013
Ruminococcaceae	<i>Ruminococcus 2</i>	0,1022	4,5458	0,0009
Ruminococcaceae	<i>Subdoligranulum</i>	0,3407	4,0918	0,0001
Ruminococcaceae	<i>Ruminococcaceae UCG-002</i>	1,1564	1,8603	0,0043
Ruminococcaceae	<i>Ruminococcaceae UCG-014</i>	0,0794	1,6804	0,0009
Ruminococcaceae	<i>Eubacterium coprostanoligenes Group</i>	0,0939	1,3705	0,0001
Ruminococcaceae	<i>Ruminococcaceae UCG-013</i>	0,0017	0,9993	0
Ruminococcaceae	<i>Ruminococcus 1</i>	0,0444	0,9807	0,0018
Ruminococcaceae	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>	0,5085	0,7718	0,0104
Ruminococcaceae	<i>Butyricicoccus</i>	0,4306	0,7215	0,0219
Ruminococcaceae	<i>Ruminococcaceae NK4A214 Group</i>	0,0462	0,4698	0,0001
Ruminococcaceae	<i>Negativibacillus</i>	0,0228	0,3450	0,0002
Ruminococcaceae	<i>Ruminiclostridium 5</i>	0,4855	0,3234	0,7767
Ruminococcaceae	<i>Ruminococcaceae UCG-010</i>	0,0229	0,2095	0,0109
Ruminococcaceae	<i>Oscillibacter</i>	0,0999	0,1614	0,2067
Ruminococcaceae	<i>Ruminiclostridium 6</i>	0,0184	0,1550	0,0703
Ruminococcaceae	<i>Fournierella</i>	0,0065	0,1326	0,0911
Ruminococcaceae	<i>Flavonifractor</i>	0,4630	0,1061	0,9824
Ruminococcaceae	<i>Ruminococcaceae UCG-003</i>	0,0548	0,0956	0,0090
Ruminococcaceae	<i>Ruminiclostridium 9</i>	0,0592	0,0849	0,0353
Ruminococcaceae	<i>Ruminococcaceae UCG-004</i>	0,0387	0,0825	0,1387
Ruminococcaceae	<i>CAG-352</i>	0,0072	0,0804	0,2298
Ruminococcaceae	<i>UBA1819</i>	0,8726	0,0769	0,3469
Ruminococcaceae	<i>GCA-900066225</i>	0,0427	0,0352	0,0418
Ruminococcaceae	<i>Anaerotruncus</i>	0,0501	0,0234	0,2318
Ruminococcaceae	<i>Oscillospira</i>	0,0048	0,0195	0,2913
Ruminococcaceae	<i>Intestinimonas</i>	0,0816	0,0174	0,9800

CAPÍTULO V – RESULTADOS

Ruminococcaceae	DTU089	0,4988	0,0166	0,0193
Ruminococcaceae	Ruminiclostridium 1	0	0,0077	0,0318
Ruminococcaceae	<i>Harryflintia</i>	0,0122	0,0075	0,1742
Ruminococcaceae	<i>Caproiciproducens</i>	0,0004	0,0074	0,0690
Ruminococcaceae	Ruminococcaceae UCG-009	0	0,0069	0,0318
Ruminococcaceae	<i>Anaerofilum</i>	0,0011	0,0066	0,0790
Ruminococcaceae	Ruminococcaceae UCG-007	0	0,0061	0,0318
Ruminococcaceae	<i>Ruminiclostridium</i>	0,0041	0,0046	0,3516
Ruminococcaceae	Papillibacter	0,0010	0,0045	0,0186
Ruminococcaceae	Phocea	0	0,0042	0,0142
Ruminococcaceae	<i>Ruminococcaceae UCG-008</i>	0	0,0027	0,1498
Ruminococcaceae	<i>Hydrogenoanaerobacterium</i>	0,0042	0,0025	0,9754
Ruminococcaceae	<i>Acetanaerobacterium</i>	0,0028	0,0023	0,3258
Ruminococcaceae	<i>Angelakisella</i>	0	0,0016	0,1498
Ruminococcaceae	<i>Pygmaibacter</i>	0,0070	0,0009	0,9710
Ruminococcaceae	<i>Ruminococcaceae V9D2013 Group</i>	0	0,0007	0,3340
Ruminococcaceae	<i>Pseudoflavonifractor</i>	0,0006	0	0,3697
Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	0,0020	0,0005	1
Streptococcaceae	<i>Streptococcus</i>	2,3431	0,7448	0,0701
Streptococcaceae	<i>Lactococcus</i>	0,0012	0,0079	0,3092
Veillonellaceae	<i>Megasphaera</i>	0,0026	5,0857	0,2808
Veillonellaceae	<i>Dialister</i>	0,0765	4,1317	0,0862
Veillonellaceae	<i>Megamonas</i>	0	0,9779	0,1498
Veillonellaceae	<i>Veillonella</i>	2,9121	0,0824	0,1075
Veillonellaceae	<i>Allisonella</i>	0	0,0207	0,3340
Veillonellaceae	<i>Anaeroglobus</i>	0,4780	0	0,1800

TABLA 14: Diferencias en las abundancias relativas (%) a nivel de género entre los grupos CDI y CTRL dentro del *phylum* Firmicutes. En negrita se destacan las diferencias estadísticamente significativas (P<0.05).

Destacamos que de forma estadísticamente significativa existe una reducción en los pacientes con CDI con respecto a controles sanos de los siguientes géneros dentro del *phylum* Firmicutes: *Christensenellaceae R-7 Group*, *Eubacterium brachy Group*, *Agathobacter*, *Roseburia*, *Lachnospiraceae NK4A136 Group*, *Coprococcus 3*, *Eubacterium ventriosum Group*, *Eubacterium eligens Group*, *Eubacterium xylanophilum Group*, *Faecalibacterium*, *Ruminococcus 2*, *Subdoligranulum*

CAPÍTULO V – RESULTADOS

y *Eubacterium coprostanogenes* Group. Por el contrario, de forma estadísticamente significativa existe un aumento en los pacientes con CDI con respecto a controles sanos de siguientes géneros dentro del *phylum* Firmicutes: *Clostridium innicuum* Group, *Eubacterium nodatum* Group y *Lachnoclostridium*.

A nivel de familia encontramos como principal alteración cuantitativa en los pacientes con CDI con respecto a controles sanos una depleción abundante de Ruminococcaceae y Lachnospiraceae. Vamos a ver cuales son las alteraciones principales de los géneros dentro de estas dos familias en los pacientes con CDI con respecto a los controles sanos. Con respecto a Ruminococcaceae destacamos:

- Disminuciones muy acentuadas de *Faecalobacterium* (3.9% en CDI frente a 11.2% en CTRL), *Ruminococcus* 2 (0.1% en CDI frente a 4.5% en CTRL) y *Subdoligranulum* (0.3% en CDI frente a 4.0% en CTRL).
- Disminucion más moderadas *Eubacterium coprostanoligenes* Group (0.0939% en CDI frente a 1.3705% en CTRL).

En la familia Lachnospiraceae destacamos:

- Disminuciones acentuadas de *Agathobacter* (0.0374% en CDI frente a 6.2873% en CTRL), *Roseburia* (0.1% en CDI frente a 2.7% en CTRL) y *Lachnospiraceae* NK4A136 Group (0.1% en CDI frente a 1.5% en CTRL).
- Disminuciones más moderadas de *Eubacterium ventriosum* Group (0% en CDI frente a 0.7224% en CTRL), *Eubacterium eligens* Group (0.0063% en CDI frente a 0.3189% en CTRL) y *Eubacterium xylanophilum* Group (0% en CDI frente a 0.1578% en CTRL).
- Aumentos de *Ruminococcus gnavus* Group (3.2% en CDI frente a 0.7% en CTRL) y *Lachnoclostridium* (3.2% en CDI frente a 0.3% en CTRL).

Dentro de otras familias dentro del *phylum* Firmicutes destacan las siguientes alteraciones en el grupo CDI con respecto a los controles sanos:

- Reducción acentuada de *Megasphaera* (0.0374% en CDI frente a 6.2873% en CTRL) y *Dialister* (0.0765% en CDI frente a 4.1317% en CTRL) y *Megamonas* (0% en CDI frente a 0.9779% en CTRL) y aumento significativo de *Veillonella* (2.9121 en CDI % frente a 0.0824% en CTRL), dentro la familia Veillonellaceae.

CAPÍTULO V – RESULTADOS

- Aumento significativo de *Erysipelatoclostridium* (2.9% en CDI frente a 0.1% en CTRL) y más moderado de *Clostridium innocuum Group* (0.9964% en CDI frente a 0.0115% en CTRL), dentro de la familia Erysipelotrichaceae.
- Aumento acentuado del género *Streptococcus* de la familia Streptococcaceae (2.3% en CDI frente a 0.7% en CTRL).
- Aumento moderado del género *Acidaminococcus* de la familia Acidaminococcaceae (0.7410% en CDI frente a 0.0614% en CTRL).
- Aumento moderado del género *Lactobacillus* de la familia Lactobacillaceae (1.0017% en CDI frente a 0.0111% en CTRL).
- Aumento moderado del género *Enterococcus* de la familia Enterococcaceae (0.6853% en CDI frente a 0% en CTRL).

Con respecto al *phylum* Bacteroidetes la siguiente tabla recoge las diferencias en la composición a nivel de género en los grupos CDI y CTRL:

CAPÍTULO V – RESULTADOS

PHYLUM BACTEROIDETES				
FAMILIA	GENERO	MEDIA GRUPO CDI (%)	MEDIA GRUPO CTRL (%)	TEST DE WILCOXON (P-VALUES)
Bacteroidaceae	Bacteroides	26,847	11,0028	0,0307
Barnesiellaceae	<i>Barnesiella</i>	0,7501	0,3836	0,1184
Barnesiellaceae	<i>Coprobacter</i>	0,0310	0,0114	0,4838
Marinifilaceae	<i>Odoribacter</i>	0,8563	0,1674	0,1371
Marinifilaceae	<i>Butyricimonas</i>	0,2069	0,0941	0,7110
Marinifilaceae	<i>Sanguibacteroides</i>	0	0,0049	0,1498
Muribaculaceae	<i>CAG-873</i>	0,1587	0	0,3697
Porphyromonadaceae	<i>Porphyromonas</i>	0,0478	0,0028	0,1742
Prevotellaceae	<i>Prevotella 9</i>	0,0213	1,8201	0,1193
Prevotellaceae	<i>Prevotellaceae NK3B31 group</i>	0,0131	0,4546	0,1358
Prevotellaceae	<i>Paraprevotella</i>	0,4986	0,1805	0,5943
Prevotellaceae	<i>Prevotellaceae UCG-001</i>	0	0,0690	0,0694
Prevotellaceae	<i>Alloprevotella</i>	0	0,0026	0,1498
Prevotellaceae	<i>Prevotella</i>	0,1934	0,0010	0,9710
Prevotellaceae	<i>Prevotella 7</i>	1,2242	0,0003	0,2913
Prevotellaceae	<i>Prevotella 6</i>	0,0008	0,0002	0,6204
Prevotellaceae	<i>Prevotellaceae UCG-003</i>	0,0127	0	0,3697
Rikenellaceae	<i>Alistipes</i>	2,8709	2,5705	0,1075
Rikenellaceae	<i>Rikenellaceae RC9 gut group</i>	0,0877	0,0263	1
Rikenellaceae	Rikenella	0	0,0043	0,0318
Tannerellaceae	<i>Parabacteroides</i>	4,7580	1,1344	0,4982

TABLA 14: Diferencias en las abundancias relativas (%) a nivel de género entre los grupos CDI y CTRL dentro del *phylum* Bacteroidetes. En negrita se destacan las diferencias estadísticamente significativas (P<0.05).

Observamos que de forma estadísticamente significativa se produce un aumento en el grupo CDI con respecto a controles sanos en el género *Bacteroides* con un cambio en la abundancia relativa que pasa desde el 11.0% al 26.8%. El aumento en el *phylum* Bacteroidetes y de la familia Bacteroidaceae en el grupo CDI es a expensas únicamente del género *Bacteroides*. Otras alteraciones en el

CAPÍTULO V – RESULTADOS

grupo CDI de interés que encontramos en los géneros de este *phylum* son el aumento de *Prevotella 7* (1.2242% en CDI frente a 0.0003% en CTRL) y *Paraprevotella* (0.5% en CDI frente a 0.2% en CTRL) y la disminución de *Prevotella 9* (0.0213% en CDI frente a 1.8201% en CTRL) de la familia Prevotellaceae, y un aumento del género *Parabacteroides* (4.7% en CDI frente a 1.1% en CTRL) de la familia Tannerellaceae.

Siguiendo con el estudio de las diferencias de composición a nivel de género de los grupos CDI y CTRL, la siguiente tabla recoge estos datos con respecto al *phylum* Proteobacteria:

CAPÍTULO V – RESULTADOS

PHYLUM PROTEOBACTERIA				
FAMILIA	GENERO	MEDIA GRUPO CDI (%)	MEDIA GRUPO CTRL (%)	TEST DE WILCOXON (P-VALUES)
Burkholderiaceae	<i>Parasutterella</i>	3,0870	0,2155	0,2927
Burkholderiaceae	<i>Sutterella</i>	0,0608	0,0571	0,9090
Burkholderiaceae	<i>Oxalobacter</i>	0	0,0147	0,0025
Cardiobacteriaceae	<i>Cardiobacterium</i>	0	0,0005	0,3340
Desulfohalobiaceae	<i>Desulfovermiculus</i>	0,2192	0	0,3697
Desulfovibrionaceae	<i>Desulfovibrio</i>	0,0999	0,2551	0,0327
Desulfovibrionaceae	<i>Bilophila</i>	0,1454	0,0656	0,1050
Enterobacteriaceae	<i>Escherichia-Shigella</i>	9,1685	2,5561	0,1620
Enterobacteriaceae	<i>Klebsiella</i>	0,0179	0,309	0,1930
Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter</i>	0,0014	0,0157	0,9604
Enterobacteriaceae	<i>Kluyvera</i>	0	0,0117	0,1498
Enterobacteriaceae	<i>Citrobacter</i>	0,0101	0	0,3697
Enterobacteriaceae	<i>Morganella</i>	0,0043	0	0,0906
Enterobacteriaceae	<i>Proteus</i>	0,8832	0	0,3697
Neisseriaceae	<i>Neisseria</i>	0	0,0009	0,1498
Neisseriaceae	<i>Eikenella</i>	0,0003	0	0,3697
Pasteurellaceae	<i>Haemophilus</i>	0,1624	0,0512	0,8731
Xanthobacteraceae	<i>Bradyrhizobium</i>	0,0012	0	0,3697

TABLA 15: Diferencias en las abundancias relativas (%) a nivel de género entre los grupos CDI y CTRL dentro del *phylum* Proteobacteria. En negrita se destacan las diferencias estadísticamente significativas (P<0.05).

Las alteraciones más llamativas en las diferencias de composición de los grupos CDI y CTRL son el aumento en el grupo CDI de los géneros de la familia Enterobacteriaceae como *Escherichia-Shigella* (9.1% en CDI frente 2.5% en CTRL) y *Proteus* (0.8832% en CDI frente a 0% en CTRL) y el aumento del género *Parasutterella* (3.0% en CDI frente a 0.2% en CTRL) de la familia Burkholderiaceae.

Con respecto al *phylum* Actinobacteria solo es destacable la disminución estadísticamente significativa que se produce en el grupo CDI con respecto a los

CAPÍTULO V – RESULTADOS

controles sanos del género *Bifidobacterium* (0.6% en CDI frente a 3.7% en CTRL) de la familia Bifidobacteriaceae.

Del resto de *phylum* Cyanobacteria, Epsilonbacteraota, Patescibacteria, Synergistetes, Tenericutes y Verrucomicrobia, solo destaca el aumento en *Akkermansia* en CDI con respecto a controles sanos (5.9% en CDI frente a 4.7% en CTRL) de la familia Akkermansiaceae del *phylum* Verrucomicrobia.

CAPÍTULO V – RESULTADOS

Por último, la siguiente figura muestra las principales diferencias cuantitativas en la composición a nivel de género (suman en torno al 65% de las abundancias relativas de ambos grupos) entre los grupos CDI con respecto a controles, para resumir la disbacteriosis encontrada en el grupo CDI:

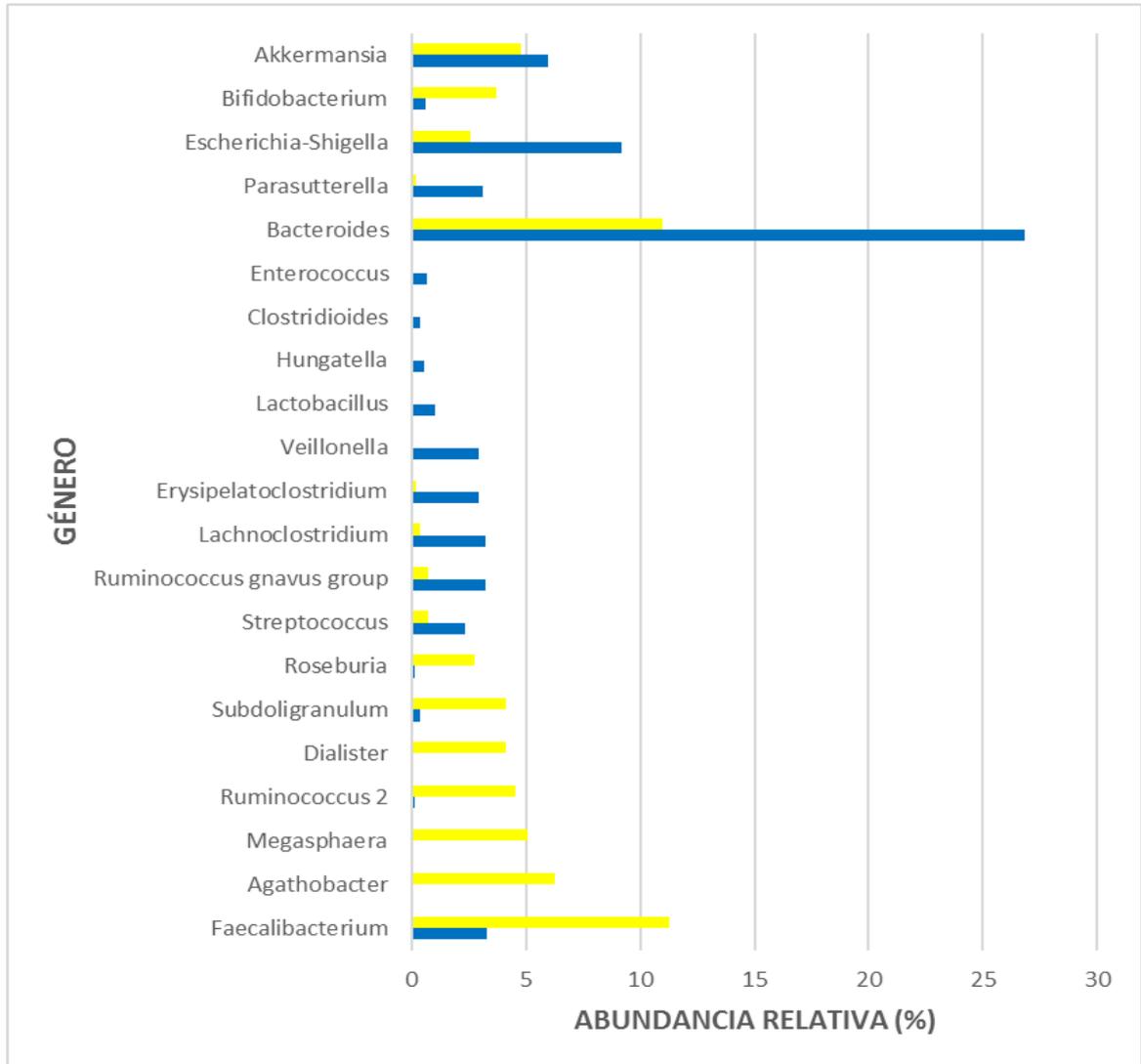


FIGURA 47: Diferencias en las abundancias relativas a nivel de los géneros mayoritarios en los grupos CDI y CTRL. Grupo CDI en azul y Grupo CTRL en amarillo.

CAPÍTULO V – RESULTADOS

5.5.3.2. Diferencias a nivel de género entre los grupos P y CTRL.

Al igual que en el apartado anterior analizamos dentro de cada *phylum* las diferencias en la composición a nivel de género que observamos. A continuación, en primer lugar, vamos a observar las diferencias dentro de los géneros del *phylum* Firmicutes. En la siguiente tabla se recogen las abundancias relativas de los distintos géneros de los grupos P y CTRL:

PHYLUM FIRMICUTES				
FAMILIA	GÉNERO	MEDIA GRUPO CTRL (%)	MEDIA GRUPO P (%)	TEST DE WILCOXON (P-VALUES)
Acidaminococcaceae	<i>Phascolarctobacterium</i>	2,1897	0,5025	0,0511
Acidaminococcaceae	<i>Acidaminococcus</i>	0,0614	0	0,0318
Aerococcaceae	<i>Abiotrophia</i>	0,0011	0,0377	0,1909
Aerococcaceae	<i>Aerococcus</i>	0	0,0007	0,3697
Bacillales Family XI	<i>Gemella</i>	0,0188	0,1199	0,5182
Bacillales Family XII	<i>Exiguobacterium</i>	0	0,0002	0,3697
Carnobacteriaceae	<i>Granulicatella</i>	0,0116	0,0870	0,0330
Christensenellaceae	<i>Christensenellaceae R-7 Group</i>	0,9856	0,1902	0,0008
Christensenellaceae	<i>Catabacter</i>	0,0171	0,0171	0,0885
Clostridiaceae 1	<i>Clostridium Sensu Stricto 1</i>	0,0152	0,0196	0,7283
Clostridiaceae 1	<i>Clostridium Sensu Stricto 13</i>	0	0,0016	0,3697
Clostridiaceae 1	<i>Clostridium sensu Stricto 2</i>	0	0,0043	0,3697
Clostridiales Family XI	<i>Parvimonas</i>	0,0005	0	0,0694
Clostridiales Family XI	<i>Anaerococcus</i>	0,0002	0	0,3340
Clostridiales Family XI	<i>Peptoniphilus</i>	0,0002	0,0007	0,9710
Clostridiales Family XI	<i>Ezakiella</i>	0,0001	0,0053	0,2913
Clostridiales Family XI	<i>Tepidimicrobium</i>	0	0,0086	0,3697
Clostridiales Family XI	<i>Tissierella</i>	0	0,0013	0,3697
Clostridiales Family XIII	<i>Family XIII AD3011 Group</i>	0,2136	0,0913	0,0021
Clostridiales Family XIII	<i>Family XIII UCG-001</i>	0,0575	0,0005	0
Clostridiales Family XIII	<i>Eubacterium brachy Group</i>	0,0334	0,0051	0,0036
Clostridiales Family XIII	<i>Mogibacterium</i>	0,0013	0	0,1498
Clostridiales Family XIII	<i>Eubacterium nodatum Group</i>	0,0196	0,1099	0,1174

CAPÍTULO V – RESULTADOS

Clostridiales <i>Family XIII</i>	<i>S5-A14a</i>	0	0,0008	0,3697
Defluviitaleaceae	<i>Defluviitaleaceae UCG-011</i>	0,0137	0,0013	0,0080
Enterococcaceae	<i>Enterococcus</i>	0	0,4993	0,0021
Erysipelotrichaceae	<i>Erysipelotrichaceae UCG-003</i>	0,7502	0,0431	0,0001
Erysipelotrichaceae	<i>Catenibacterium</i>	0,3247	0	0,0318
Erysipelotrichaceae	<i>Holdemanella</i>	0,2120	0	0,3340
Erysipelotrichaceae	<i>Faecalitalea</i>	0,1819	0,0088	0,0044
Erysipelotrichaceae	<i>Erysipelatoclostridium</i>	0,1754	1,2124	0,4273
Erysipelotrichaceae	<i>Solobacterium</i>	0,0392	0,0928	0,7751
Erysipelotrichaceae	<i>Holdemania</i>	0,0357	0,0148	0,0041
Erysipelotrichaceae	<i>Clostridium innocuum Group</i>	0,0115	0,2158	0,0004
Erysipelotrichaceae	<i>Merdibacter</i>	0,0114	0	0,0001
Erysipelotrichaceae	<i>Faecalicoccus</i>	0,0080	0	0,1498
Erysipelotrichaceae	<i>Erysipelotrichaceae UCG-006</i>	0,0040	0	0,3340
Erysipelotrichaceae	<i>Coprobacillus</i>	0,0031	0,0053	0,7056
Erysipelotrichaceae	<i>Dielma</i>	0,0028	0,0098	0,2752
Erysipelotrichaceae	<i>Erysipelotrichaceae UCG-004</i>	0,0023	0	0,0694
Erysipelotrichaceae	<i>Turcibacter</i>	0,0017	0,0171	0,7403
Erysipelotrichaceae	<i>Catenisphaera</i>	0,0012	0	0,3340
Eubacteriaceae	<i>Anaerofustis</i>	0,0053	0,0008	0,1462
Eubacteriaceae	<i>Eubacterium</i>	0,0003	0,0118	0,0790
Lachnospiraceae	<i>Agathobacter</i>	6,2873	0,1254	0
Lachnospiraceae	<i>Roseburia</i>	2,7259	0,1674	0,0001
Lachnospiraceae	<i>Lachnospiraceae NK4A136 Group</i>	1,4926	0,3200	0,0015
Lachnospiraceae	<i>Ruminococcus torques Group</i>	0,9151	1,8731	1
Lachnospiraceae	<i>Coprococcus 3</i>	0,7409	0	0
Lachnospiraceae	<i>Ruminococcus gnavus Group</i>	0,7389	5,3744	0,0209
Lachnospiraceae	<i>Dorea</i>	0,7318	0,2986	0,0014
Lachnospiraceae	<i>Blautia</i>	0,6994	1,5385	0,1829
Lachnospiraceae	<i>Eubacterium ventriosum Group</i>	0,7224	0,0032	0,0001
Lachnospiraceae	<i>Lachnoclostridium</i>	0,3400	0,7856	1
Lachnospiraceae	<i>Eubacterium eligens group</i>	0,3189	0,1217	0,1126
Lachnospiraceae	<i>Coprococcus 2</i>	0,2555	0	0,0142
Lachnospiraceae	<i>Tyzzereella 3</i>	0,2178	0	0,0142
Lachnospiraceae	<i>Anaerostipes</i>	0,1775	0,2592	0,3789
Lachnospiraceae	<i>Fusicatenibacter</i>	0,1452	0,007	0,0003
Lachnospiraceae	<i>Eubacterium xylanophilum Group</i>	0,1578	0,001	0,0003
Lachnospiraceae	<i>CAG-56</i>	0,1232	0	0

CAPÍTULO V – RESULTADOS

Lachnospiraceae	<i>Tyzzereella 4</i>	0,0977	0,4606	0,1421
Lachnospiraceae	<i>Lachnospiraceae UCG-010</i>	0,0932	0	0
Lachnospiraceae	<i>Sellimonas</i>	0,065	0,0139	0,3054
Lachnospiraceae	<i>Lachnospira</i>	0,0578	0,0109	0,0186
Lachnospiraceae	<i>Howardella</i>	0,0576	0	0,0142
Lachnospiraceae	<i>Eubacterium ruminantium Group</i>	0,0420	0	0,1498
Lachnospiraceae	<i>Lachnospiraceae UCG-001</i>	0,0408	0	0,0142
Lachnospiraceae	<i>Shuttleworthia</i>	0,0348	0,001	0,1044
Lachnospiraceae	<i>Lachnospiraceae UCG-004</i>	0,0329	0,0077	0,2010
Lachnospiraceae	<i>GCA-900066575</i>	0,0298	0,0175	0,0050
Lachnospiraceae	<i>Lachnospiraceae FCS020 Group</i>	0,0203	0	0,0004
Lachnospiraceae	<i>UC5-1-2E3</i>	0,0179	0,0059	0,0186
Lachnospiraceae	<i>Eisenbergiella</i>	0,0168	0,5182	0,8483
Lachnospiraceae	<i>Ruminococcus gauvreauii Group</i>	0,0138	0,0089	0,0043
Lachnospiraceae	<i>Coprococcus 1</i>	0,0135	0	0,0025
Lachnospiraceae	<i>Moryella</i>	0,0131	0	0,0061
Lachnospiraceae	<i>Lachnospiraceae ND3007 Group</i>	0,0095	0	0,0142
Lachnospiraceae	<i>Marvinbryantia</i>	0,0083	0	0,0061
Lachnospiraceae	<i>Eubacterium fissicatena Group</i>	0,0053	0,0485	0,6324
Lachnospiraceae	<i>Eubacterium hallii Group</i>	0,0040	0,0056	0,2222
Lachnospiraceae	<i>Tyzzereella</i>	0,0035	0,0034	0,7056
Lachnospiraceae	<i>Lachnospiraceae UCG-008</i>	0,0034	0	0,0694
Lachnospiraceae	<i>GCA-900066755</i>	0,0031	0,0151	0,2954
Lachnospiraceae	<i>Oribacterium</i>	0,0031	0,0174	0,5916
Lachnospiraceae	<i>Hungatella</i>	0,0028	0,0865	0,3092
Lachnospiraceae	<i>Lachnospiraceae NK4B4 group</i>	0,0023	0	0,3340
Lachnospiraceae	<i>Butyrivibrio</i>	0,0021	0	0,1498
Lachnospiraceae	<i>Acetitomaculum</i>	0,0019	0	0,3340
Lachnospiraceae	<i>Lactonifactor</i>	0,0014	0	0,3340
Lachnospiraceae	<i>Johnsonella</i>	0,0010	0	0,1498
Lachnospiraceae	<i>Lachnoanaerobaculum</i>	0,0006	0,0031	1
Lachnospiraceae	<i>Eubacterium oxidoreducens Group</i>	0,0001	0	0,3340
Lachnospiraceae	<i>Stomatobaculum</i>	0	0,0009	0,3697
Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i>	0,0111	0,2256	0,2624
Lactobacillaceae	<i>Pediococcus</i>	0	0,0013	0,3697
Leuconostocaceae	<i>Leuconostoc</i>	0,0057	0,0260	0,3905
Leuconostocaceae	<i>Weissella</i>	0,0049	0	0,1498
Peptococcaceae	<i>Peptococcus</i>	0,0093	0	0,0694

CAPÍTULO V – RESULTADOS

Peptostreptococcaceae	<i>Romboutsia</i>	0,0592	0,0988	0,1655
Peptostreptococcaceae	<i>Intestinibacter</i>	0,0004	0,0035	1
Peptostreptococcaceae	<i>Peptostreptococcus</i>	0,0003	0,0008	0,5634
Peptostreptococcaceae	<i>Clostridioides</i>	0	0,3638	0,0001
Peptostreptococcaceae	<i>Terrisporobacter</i>	0	0,0013	0,3697
Ruminococcaceae	<i>Faecalibacterium</i>	11,2857	0,9126	0
Ruminococcaceae	<i>Ruminococcus 2</i>	4,5458	0,0560	0,0002
Ruminococcaceae	<i>Subdoligranulum</i>	4,0918	0,2808	0
Ruminococcaceae	<i>Ruminococcaceae UCG-002</i>	1,8603	0,9575	0,0001
Ruminococcaceae	<i>Ruminococcaceae UCG-014</i>	1,6804	0,0100	0,0005
Ruminococcaceae	<i>Ruminococcaceae UCG-013</i>	0,9993	0,0864	0
Ruminococcaceae	<i>Eubacterium coprostanoligenes Group</i>	1,3705	0,1774	0,0001
Ruminococcaceae	<i>Ruminococcus 1</i>	0,9807	0,0188	0,0006
Ruminococcaceae	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>	0,7718	0,5485	0,0025
Ruminococcaceae	<i>Butyricoccus</i>	0,7215	0,1597	0,0009
Ruminococcaceae	<i>Ruminococcaceae NK4A214 Group</i>	0,4698	0,1533	0,0005
Ruminococcaceae	<i>Negativibacillus</i>	0,3450	0,2899	0,0024
Ruminococcaceae	<i>Ruminiclostridium 5</i>	0,3234	0,3936	0,2298
Ruminococcaceae	<i>Ruminococcaceae UCG-010</i>	0,2095	0,0383	0,0379
Ruminococcaceae	<i>Oscillibacter</i>	0,1614	0,1314	0,1741
Ruminococcaceae	<i>Ruminiclostridium 6</i>	0,1550	0,3424	0,0747
Ruminococcaceae	<i>Fournierella</i>	0,1326	0,0320	0,0810
Ruminococcaceae	<i>Flavonifractor</i>	0,1061	0,1892	0,8427
Ruminococcaceae	<i>Ruminococcaceae UCG-003</i>	0,0956	0,1800	0,0058
Ruminococcaceae	<i>Ruminiclostridium 9</i>	0,0849	0,0437	0,0047
Ruminococcaceae	<i>Ruminococcaceae UCG-004</i>	0,0825	0,0045	0,0044
Ruminococcaceae	<i>CAG-352</i>	0,0804	0	0,0694
Ruminococcaceae	<i>UBA1819</i>	0,0769	0,6436	1
Ruminococcaceae	<i>GCA-900066225</i>	0,0352	0,0103	0,0022
Ruminococcaceae	<i>Anaerotruncus</i>	0,0234	0,2045	0,9818
Ruminococcaceae	<i>Oscillospira</i>	0,0195	0	0,0694
Ruminococcaceae	<i>Intestinimonas</i>	0,0174	0,0379	0,4403
Ruminococcaceae	<i>DTU089</i>	0,0166	0,0020	0,0006
Ruminococcaceae	<i>Ruminiclostridium 1</i>	0,0077	0,0005	0,3092
Ruminococcaceae	<i>Harryflintia</i>	0,0075	0,0014	0,1358
Ruminococcaceae	<i>Caproiciproducens</i>	0,0074	0,0022	0,2222
Ruminococcaceae	<i>Ruminococcaceae UCG-009</i>	0,0069	0,0008	0,1193

CAPÍTULO V – RESULTADOS

Ruminococcaceae	<i>Anaerofilum</i>	0,0066	0,0002	0,0452
Ruminococcaceae	<i>Ruminococcaceae UCG-007</i>	0,0061	0	0,0318
Ruminococcaceae	<i>Ruminiclostridium</i>	0,0046	0,0043	0,3678
Ruminococcaceae	<i>Papillibacter</i>	0,0045	0	0,0025
Ruminococcaceae	<i>Phocea</i>	0,0042	0	0,0142
Ruminococcaceae	<i>Ruminococcaceae UCG-008</i>	0,0027	0	0,1498
Ruminococcaceae	<i>Hydrogenoanaerobacterium</i>	0,0025	0,1847	0,7403
Ruminococcaceae	<i>Acetanaerobacterium</i>	0,0023	0,0048	0,6419
Ruminococcaceae	<i>Angelakisella</i>	0,0016	0,0025	0,5916
Ruminococcaceae	<i>Pygmaibacter</i>	0,0009	0,0006	0,5916
Ruminococcaceae	<i>Ruminococcaceae V9D2013 Group</i>	0,0007	0	0,3340
Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	0,0005	0,0278	0,3258
Streptococcaceae	<i>Streptococcus</i>	0,7448	3,5834	0,3481
Streptococcaceae	<i>Lactococcus</i>	0,0079	0,0026	0,7056
Syntrophomonadaceae	<i>Syntrophomonas</i>	0	0,0002	0,3697
Veillonellaceae	<i>Megasphaera</i>	5,0857	0,6327	0,9788
Veillonellaceae	<i>Dialister</i>	4,1317	5,9524	0,4107
Veillonellaceae	<i>Megamonas</i>	0,9779	0	0,1498
Veillonellaceae	<i>Veillonella</i>	0,0824	4,5646	0,3898
Veillonellaceae	<i>Allisonella</i>	0,0207	0	0,3340
Veillonellaceae	<i>Anaeroglobus</i>	0	0,9869	0,1800
Veillonellaceae	<i>Selenomonas 3</i>	0	0,0003	0,3697

TABLA 16: Diferencias en las abundancias relativas (%) a nivel de género entre los grupos P y CTRL dentro del *phylum* Firmicutes. En negrita se destacan las diferencias estadísticamente significativas (P<0.05).

Observamos que de forma estadísticamente significativa se produce una reducción en el grupo P con respecto a los controles sanos en géneros como *Faecalibacterium*, *Agathobacter*, *Subdoligranulum*, *Coprococcus 3*, *Roseburia*, *Eubacterium coprostanoligenes Group*, *Eubacterium ventriosum Group*, *Ruminococcus 2*, *Eubacterium xylanophilum Group*, *Christensenellaceae R-7 Group*, *Lachnospiraceae NK4A136 Group*, *Eubacterium brachy Group*, *Acidaminococcus* y *Phascolarctobacterium*. Por el contrario, encontramos aumentos estadísticamente significativos en los géneros *Enterococcus*, *Clostridioides*, *Clostridium innocuum Group* y *Ruminococcus gnavus Group*.

CAPÍTULO V – RESULTADOS

Al igual que observamos en el grupo de pacientes con CDI, en los individuos colonizados por *C. difficile* encontramos con respecto a controles sanos, como alteración principal en la composición a nivel de familia, una acentuada depleción de Ruminococcaceae y Lachnospiraceae. Dentro de las alteraciones principales de los géneros dentro de la familia Ruminococcaceae destacamos:

- Depleciones muy acentuadas de los géneros *Faecalibacterium* (0.9% en P frente a 11.2% en CTRL), *Ruminococcus 2* (0.6% en P frente a 5.0% en CTRL), *Subdoligranulum* (0.3% en P frente a 4.1% en CTRL), *Ruminococcaceae UGC-002* (0.5% en P frente a 2.2% en CTRL), *Ruminococcaceae UGC-004* (0.0100% en P frente a 1.6804% en CTRL) y *Eubacterium coprostalogenes Group* (0.2% en P frente a 1.4% en CTRL),

Con respecto a la familia Lachnospiraceae destacan las siguientes alteraciones:

- Disminuciones muy acentuadas de los géneros *Agathobacter* (0.1% en P frente a 6.3% en CTRL), *Roseburia* (0.1% en P frente a 2.7% en CTRL) y *Lachnospiraceae NK4A136 Group* (0.3% en P frente a 1.5% en CTRL).
- Disminuciones moderadas de los géneros *Eubacterium ventriosum Group* (0.0032% en P frente a 0.7224% en CTRL), *Eubacterium eligens Group* (0.1% en P frente a 0.3% en CTRL) y *Eubacterium xylanophilum Group* (0.0010% en P frente a 0.1578% en CTRL),
- Aumentos acentuados del género *Ruminococcus gnavus Group* (5.3% en P frente a 0.7% en CTRL) y más moderados en *Blautia* (1.5% en P frente a 0.7% en CTRL) y *Lachnoclostridium* (0.8% en P frente a 0.3% en CTRL)

Dentro de otras familias dentro del *phylum* Firmicutes destacan las siguientes alteraciones a nivel de género en el grupo de individuos colonizados por *C. difficile* con respecto a los controles sanos:

- Depleción acentuada del género *Megasphaera* (0.6% en P frente a 5.0% en CTRL), disminución moderada de *Megamonas* (0% en P frente a 0.9779% en CTRL), aumento acentuado de *Veillonella* (4.5646% en P frente a 0.824% en CTRL) dentro de la familia Veillonellaceae.
- Disminución acentuada del género *Phascolarctobacterium* (0.5% en P frente a 2.7% en CTRL) de la familia Acidaminococcaceae.
- Disminución moderada del género *Christensenellaceae R-7 Group* (0.1902% en CDI frente a 0.9856% en CTRL) de la familia Christensenellaceae.

CAPÍTULO V – RESULTADOS

- Aumento acentuado del género *Streptococcus* (3.5% en P frente a 0.7% en CTRL) dentro de la familia Streptococcaceae.
- Aumento moderado del género *Erysipelatoclostridium* (1.1% en P frente a 0.8% en CTRL) de la familia Erysipelotrichaceae.
- Aumento moderado del género *Clostridoides* (0.3638% en P frente a 0% en CTRL) de la familia Peptostreptococcaceae. A este género pertenece *C. difficile*.
- Aumento moderado del género *Enterococcus* (0.4993% en P frente a 0% en CTRL) de la familia Enterococcaceae.

Con respecto del *phylum* Bacteroidetes la siguiente tabla recoge las diferencias en la composición a nivel de género en los grupos P y CTRL:

CAPÍTULO V – RESULTADOS

PHYLUM BACTEROIDETES				
FAMILIA	GÉNERO	MEDIA GRUPO CTRL (%)	MEDIA GRUPO P (%)	TEST DE WILCOXON (P-VALUES)
Bacteroidaceae	Bacteroides	11,0028	29,1252	0,0137
Barnesiellaceae	Barnesiella	0,3836	0,1443	0,0037
Barnesiellaceae	<i>Coprobacter</i>	0,0114	0,0155	0,4531
Dysgonomonadaceae	<i>Dysgonomonas</i>	0	0,0005	0,3697
Marinifilaceae	Odoribacter	0,1674	0,0437	0,0334
Marinifilaceae	<i>Butyricimonas</i>	0,0941	0,1254	0,7458
Marinifilaceae	<i>Sanguibacteroides</i>	0,0049	0	0,1498
Porphyromonadaceae	<i>Porphyromonas</i>	0,0028	0,0114	0,1742
Prevotellaceae	<i>Prevotella 9</i>	1,8201	1,3429	0,3715
Prevotellaceae	<i>Prevotellaceae NK3B31 Group</i>	0,4546	0	0,0318
Prevotellaceae	Paraprevotella	0,1805	0,0473	0,0167
Prevotellaceae	<i>Prevotellaceae UCG-001</i>	0,0690	0	0,0694
Prevotellaceae	<i>Alloprevotella</i>	0,0026	0	0,1498
Prevotellaceae	<i>Prevotella</i>	0,001	0,0001	0,4829
Prevotellaceae	<i>Prevotella 7</i>	0,0003	0	0,3340
Prevotellaceae	<i>Prevotella 6</i>	0,0002	0,0002	1
Prevotellaceae	<i>Prevotella 2</i>	0	0,0444	0,3697
Rikenellaceae	<i>Alistipes</i>	2,5705	2,7723	0,0630
Rikenellaceae	Rikenella	0,0043	0	0,0318
Tannerellaceae	<i>Parabacteroides</i>	1,1344	2,3343	0,2849

TABLA 17: Diferencias en las abundancias relativas (%) a nivel de género entre los grupos P y CTRL dentro del *phylum* Bacteroidetes. En negrita se destacan las diferencias estadísticamente significativas (P<0.05).

Observamos que de forma estadísticamente significativa se produce un aumento en el grupo P con respecto a controles sanos en el género Bacteroidetes con un cambio en la abundancia relativa que pasa desde el 11.0% al 29.1%, y unas disminuciones moderadas en los géneros *Rikenella* (0% en P frente a 0.0043% en CTRL), *Paraprevotella* (0.0473% en P frente a 0.1805% en CTRL) y *Barnesiella* (0.1%

CAPÍTULO V – RESULTADOS

en P frente a 0.4% en CTRL). Por consiguiente, al igual que pasa en el grupo de pacientes con CDI, el aumento en el *phylum* Bacteroidetes es a expensas de los géneros Bacteroides (principalmente) y Parabacteroides (también aumenta en el grupo P hasta el 2.3% frente a 1.1% del grupo de los controles sanos) de las familias Bacteroidaceae y Tannerellaceae, respectivamente.

Con respecto del *phylum* Proteobacteria la siguiente tabla recoge las diferencias en la composición entre los grupos P y CTRL:

CAPÍTULO V – RESULTADOS

PHYLUM PROTEOBACTERIA				
FAMILIA	GÉNERO	MEDIA GRUPO CTRL (%)	MEDIA GRUPO P (%)	TEST DE WILCOXON (P-VALUES)
Burkholderiaceae	<i>Parasutterella</i>	0,2155	1,1747	1
Burkholderiaceae	<i>Sutterella</i>	0,0571	0,0257	0,1498
Burkholderiaceae	<i>Oxalobacter</i>	0,0147	0,0014	0,0100
Burkholderiaceae	<i>Curvibacter</i>	0	0,0007	0,3697
Desulfovibrionaceae	<i>Desulfovibrio</i>	0,2551	0,0449	0,1040
Desulfovibrionaceae	<i>Bilophila</i>	0,0656	0,7385	0,3876
Enterobacteriaceae	<i>Escherichia-Shigella</i>	2,5561	10,6014	0,2051
Enterobacteriaceae	<i>Klebsiella</i>	0,3090	3,5697	0,7495
Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter</i>	0,0157	0,0011	0,9604
Enterobacteriaceae	<i>Kluyvera</i>	0,0117	0	0,1498
Enterobacteriaceae	<i>Citrobacter</i>	0	0,0095	0,1800
Enterobacteriaceae	<i>Morganella</i>	0	0,0007	0,3697
Neisseriaceae	<i>Neisseria</i>	0,0009	0	0,1498
Pasteurellaceae	<i>Haemophilus</i>	0,0512	0,2238	0,7095
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	0	0,0015	0,3697
Xanthobacteraceae	<i>Bradyrhizobium</i>	0	0,0002	0,3697

TABLA 18: Diferencias en las abundancias relativas (%) a nivel de género entre los grupos P y CTRL dentro del *phylum* Proteobacteria. En negrita se destacan las diferencias estadísticamente significativas (P<0.05).

No existen diferencias estadísticamente significativas. No obstante, las alteraciones más llamativas, aunque no significativas son los aumentos acentuados en el grupo P de dos generos de la familia Enterobacteriaceae como *Escherichia-Shigella* (10.6% en P frente a 2.5% en CTRL) y *Klebsiella* (3.5% en P frente a 0.3% en CTRL). También destaca el incremento más moderado de *Parasutterella* (1.2% en P frente a 0.2% en CTRL) de las familia Burkholderiaceae.

En el *phylum* Actinobacteria la principal diferencia en la composición de los grupos P y CTRL a nivel de género es la perdida (no significativa) de

CAPÍTULO V – RESULTADOS

Bifidobacterium (2.0% en P frente a 3.6% en CTRL) en el grupo P con respecto a los controles sanos.

Del resto de *phylums* Cyanobacteria, Epsilonbacteraota, Patescibacteria, Synergistetes, Tenericutes y Verrucomicrobia, solo destaca la depleción de *Akkermansia* en en el grupo P con respecto a controles sanos (1.3% en P frente a 4.7% en CTRL) de la familia Akkermansiaceae del *phylum* Verrucomicrobia.

En la siguiente figura se muestran las principales diferencias en las abundancias relativas de los géneros de los grupos P y CTRL que nos permite un visionado rápido de la diferente composición de la microbiota intestinal de estos dos grupos:

CAPÍTULO V – RESULTADOS

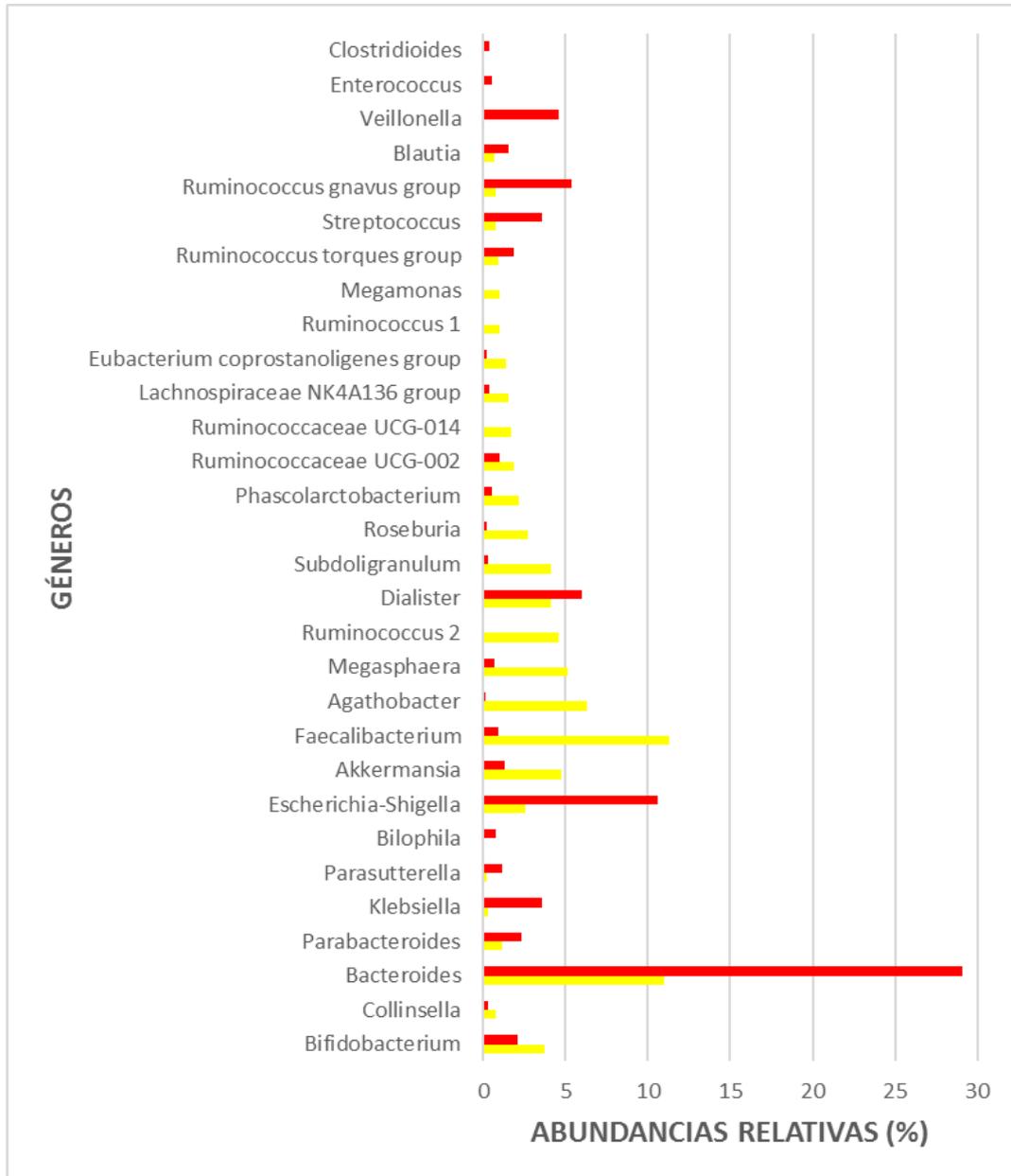


FIGURA 48: Diferencias en las abundancias relativas a nivel de los géneros mayoritarios en los grupos P y CTRL. Grupo P en rojo y Grupo CTRL en amarillo.

CAPÍTULO V – RESULTADOS

Por consiguiente, a nivel taxonómico de género podemos observar una serie de diferencias en cuanto a la composición de los grupos CDI y P con respecto a los controles sanos, que nos distinguiría al patrón de disbacteriosis de ambos grupos. A continuación, se resumen las diferencias más importantes que se encuentran en cada *phylum*:

- *phylum* Proteobacteria:
 - Enterobacteriaceae:
 - Aunque en ambos grupos el género *Escherichia-Shigella* está muy aumentando con respecto a los controles sanos llama la atención que en el grupo P sea ligeramente superior (10.6% en P y 9.1% en CDI).
 - Con respecto a otros miembros de la familia Enterobacteriaceae existen diferencias en los géneros *Kleibsiella* y *Proteus*. En *Kleibsiella* existe una ligera disminución en CDI y un aumento acentuado en P (0.0179% en CDI y 3.5697% en P). En *Proteus* se observa en CDI un aumento hasta el 0.8832%, mientras que en P no aparece, al igual que en controles sanos (0%).
 - Burkholderiaceae: Se produce un aumento más pronunciado en el grupo CDI que en el grupo P (3.0870% en CDI y 1.1747% en P) a expensas principalmente en ambos casos de *Parasutterella*.
- *phylum* Bacteroidetes:
 - Bacteroidaceae:
 - El acentuado aumento del género *Bacteroides* ambos grupos con respecto a los controles sanos es más acentuado en P que en CDI (29.1 en P % y 26.8% en CDI).
 - Prevotellaceae:
 - La pérdida de *Prevotella 9* es más acentuada en el grupo CDI que en P (0.0213% en CDI y 1.3429% en P).
 - En el género *Prevotella 7* se produce un moderado aumento en CDI (1.2242%) mientras que en controles sanos y el grupo P no se detecta.
 - En el género *Paraprevotella* se produce un ligero aumento en CDI mientras que en el grupo P se da una ligera disminución

CAPÍTULO V – RESULTADOS

- con respecto a los controles sanos (0.4986% en CDI y 0.0470% en P).
- Barnesiellaceae:
 - En *Barnesiella* se produce un ligero aumento en el grupo CDI mientras que en el grupo P se observa una ligera disminución con respecto a los controles sanos (0.7501 en CDI % y 0.1443% en P).
 - Marinifilaceae:
 - En *Odoribacter* se produce un ligero aumento en el grupo CDI mientras que en el grupo P se da una ligera disminución con respecto a los controles sanos (0.8563% en CDI y 0.0437% en P).
 - *phylum* Actinobacteria:
 - Bifidobacteriaceae:
 - En *Bifidobacterium* se produce una pérdida que es acentuada en CDI (0.0245%) mientras que en el grupo P es más moderada (2.0626%) con respecto a los controles sanos.
 - *phylum* Verucomicrobia:
 - Akkermansiaceae:
 - Mientras que en el grupo CDI se produce un moderado aumento de *Akkermansia* respecto a los controles sanos, en el grupo P se produce una acentuada bajada (5.9% en CDI frente a 1.3% en P).
 - *phylum* Firmicutes:
 - Ruminococcaceae:
 - En *Faecalibacterium* se produce una pérdida más acentuada en el grupo P que en CDI (0.9126% en P y 3.2948% en CDI).
 - Lachnospiraceae:
 - En *Ruminococcus gnavus Group* se produce un aumento más pronunciado en el grupo P que en CDI (5.3744% en P y 3.2177% en CDI).
 - En *Ruminococcus torques Group* se produce un aumento moderado en el grupo P siendo más leve en CDI (1.8731% en P y 1.1256% en CDI).

CAPÍTULO V – RESULTADOS

- En *Blautia* se produce una ligera disminución en el grupo CDI (0.5904%) y un moderado aumento en el grupo P (1.5385%).
- En *Lachnoclostridium* se produce un aumento acentuado en CDI (3.2330%), siendo más ligero en P (0.7856%).
- Veillonellaceae:
 - Se observa una pérdida de *Megasphaera* más leve en el grupo CDI que en P (0.0026% en CDI y 0.6327% en P).
 - En *Dialister* se produce una acentuada pérdida en el grupo CDI mientras que en P hay un aumento moderado (0.0765% en CDI y 5.9524% en P).
 - En *Veillonela* se produce un aumento pronunciado en ambos grupos, pero es mayor en el grupo P que en el grupo CDI (4.5646% en P y 2.9121% en CDI).
- Acidominococcaceae:
 - En *Phascolarctobacterium* se produce un ligero aumento en el grupo CDI mientras que en P se produce una disminución acentuada con respecto a los controles sano (2.7336% en CDI y 0.5025% en P).
 - En *Acidominococcus* se produce un ligero aumento en el grupo CDI (0.7410%) mientras que en el grupo P no hay cambio con respecto a controles sanos (0.0614%).
- Christensenellaceae:
 - En *Christensenellaceae R-7 Group* se produce una pérdida casi total en el grupo P (0.1902%) mientras que en el grupo CDI es más moderada (0.5333%).
- Streptococcaceae:
 - En *Streptococcus* se produce un aumento que es más pronunciado en el grupo P que en el grupo CDI (3.5834% y 2.3431%).
- Erysipelotrichaceae:
 - En *Erysipeloclostridium* se produce un aumento más pronunciado en el grupo CDI que en el grupo P (2.9142% en CDI y 1.2124% en P).

CAPÍTULO V – RESULTADOS

- En *Clostridium innocuum Group* se produce un ligero aumento, pero algo más pronunciado en el grupo CDI que en el grupo P (0.9964% en CDI y 0.2158% en P).
- Lactobacillaceae:
 - En *Lactobacillus* se produce un moderado aumento, algo más pronunciado en el grupo CDI que en el grupo P (1.0017% en CDI y 0.5182% en P).
- Eubacteriaceae:
 - En *Eubacterium* las diferencias son sutiles. En el grupo P se produce un muy ligero aumento (0.0118%) con respecto al grupo CDI y de controles sanos (0.0011% en CDI y 0.0003% en CTRL).
- Peptostreptococcaceae:
 - El género *Clostridioides* al cual pertenece *C. difficile* es prácticamente igual en los grupos CDI y P con respecto al grupo de controles sanos, observándose un aumento moderado similar (0.3668% en CDI y 0.3638% en P).
- Enterococcaceae:
 - En *Enterococcus* hay un ligero aumento al respecto de los controles sanos en ambos grupos siendo ligeramente mayor en el grupo CDI que en el grupo P (0.6853% en CDI y 0.4993% en P).

CAPÍTULO V – RESULTADOS

5.5.3.3. Diferencias a nivel de género entre los grupos CDI y P.

Al igual que en los apartados anteriores analizamos dentro de cada *phylum* las diferencias en la composición a nivel de género entre los grupos CDI y P. Como esto se describe en el apartado anterior 5.5.3.2, cuando vimos las diferencias de los grupos CDI y P con respecto a los controles sanos, únicamente vamos a disponer de las tablas de todos los *phylums* y ver cuales son las diferencias aplicando el test de Wilcoxon.

PHYLUM FIRMICUTES				
FAMILIA	GÉNERO	MEDIA GRUPO CDI (%)	MEDIA GRUPO P (%)	TEST DE WILCOXON (P-VALUES)
Acidaminococcaceae	<i>Phascolarctobacterium</i>	2,7366	0,5025	0,2610
Acidaminococcaceae	<i>Acidaminococcus</i>	0,7410	0	0,3506
Aerococcaceae	<i>Abiotrophia</i>	0,0064	0,0377	0,2401
Aerococcaceae	<i>Aerococcus</i>	0	0,0007	0,3506
Bacillales Family XI	<i>Gemella</i>	0,0034	0,1199	0,0317
Bacillales Family XI	<i>Ezakiella</i>	0	0,0053	0,0797
Bacillales Family XI	<i>Anaerococcus</i>	0,0433	0	0,3506
Bacillales Family XI	<i>Parvoimonas</i>	0,0002	0	0,3506
Bacillales Family XI	<i>Tepidimicrobium</i>	0	0,0086	0,3506
Bacillales Family XI	<i>Tissierella</i>	0	0,0013	0,3506
Bacillales Family XI	<i>Peptoniphilus</i>	0,0012	0,0007	1
Carnobacteriaceae	<i>Granulicatella</i>	0,0269	0,0870	0,0414
Christensenellaceae	<i>Catabacter</i>	0	0,0171	0,1644
Christensenellaceae	<i>Christensenellaceae R-7 group</i>	0,5330	0,1902	0,8521
Clostridiaceae 1	<i>Clostridium Sensu Stricto 2</i>	0	0,0043	0,3506
Clostridiaceae 1	<i>Clostridium Sensu Stricto 1</i>	0,2590	0,0196	0,8545
Clostridiaceae 1	<i>Clostridium Sensu Stricto 13</i>	0,0029	0,0016	1
Clostridiales Family XII	<i>Exiguobacterium</i>	0	0,0002	0,3506
Clostridiales Family XIII	<i>Eubacterium nodatum Group</i>	0,0239	0,1099	0,0040
Clostridiales Family XIII	<i>Eubacterium brachy Group</i>	0	0,0051	0,3506
Clostridiales Family XIII	<i>Family XIII UCG-001</i>	0	0,0005	0,3506

CAPÍTULO V – RESULTADOS

Clostridiales <i>Family XIII</i>	<i>S5-A14a</i>	0	0,0008	0,3506
Clostridiales <i>Family XIII</i>	<i>Family XIII AD3011 Group</i>	0,5922	0,0913	0,894
Defluviitaleaceae	<i>Defluviitaleaceae UCG-011</i>	0,0012	0,0013	0,6327
Enterococcaceae	<i>Enterococcus</i>	0,6853	0,4993	1
Erysipelotrichaceae	<i>Clostridium innocuum Group</i>	0,9964	0,2158	0,0107
Erysipelotrichaceae	<i>Solobacterium</i>	0,0108	0,0928	0,0346
Erysipelotrichaceae	<i>Merdibacter</i>	0,0505	0	0,0797
Erysipelotrichaceae	<i>Dielma</i>	0,0028	0,0098	0,3258
Erysipelotrichaceae	<i>Holdemanella</i>	0,0149	0	0,3506
Erysipelotrichaceae	<i>Erysipelatoclostridium</i>	2,9142	1,2124	0,4386
Erysipelotrichaceae	<i>Erysipelotrichaceae UCG-003</i>	0,0018	0,0431	0,5772
Erysipelotrichaceae	<i>Faecalitalea</i>	0,0014	0,0088	0,5772
Erysipelotrichaceae	<i>Holdemania</i>	0,0134	0,0148	0,7494
Erysipelotrichaceae	<i>Coprobacillus</i>	0,0452	0,0053	0,8587
Erysipelotrichaceae	<i>Turicibacter</i>	0,0106	0,0171	0,9720
Eubacteriaceae	<i>Eubacterium</i>	0,0011	0,0118	0,2401
Eubacteriaceae	<i>Anaerofustis</i>	0,0020	0,0008	0,6327
Lachnospiraceae	<i>Hungatella</i>	0,5656	0,0865	0,0964
Lachnospiraceae	<i>Lachnoclostridium</i>	3,2330	0,7856	0,1099
Lachnospiraceae	<i>Anaerostipes</i>	0,0109	0,2592	0,1160
Lachnospiraceae	<i>Lachnospiraceae UCG-010</i>	0,0961	0	0,1644
Lachnospiraceae	<i>Robinsoniella</i>	0,0207	0	0,1644
Lachnospiraceae	<i>Coprococcus 3</i>	0,0024	0	0,1644
Lachnospiraceae	<i>Fusicatenibacter</i>	0	0,0070	0,1644
Lachnospiraceae	<i>GCA-900066575</i>	0	0,0175	0,1644
Lachnospiraceae	<i>Sellimonas</i>	0,1300	0,0139	0,1672
Lachnospiraceae	<i>Eubacterium fissicatena Group</i>	0,0082	0,0485	0,2879
Lachnospiraceae	<i>Epulopiscium</i>	0,5071	0	0,3506
Lachnospiraceae	<i>Lachnoclostridium 5</i>	0,0447	0	0,3506
Lachnospiraceae	<i>Butyrivibrio</i>	0,0217	0	0,3506
Lachnospiraceae	<i>Lachnospiraceae FCS020 Group</i>	0,0062	0	0,3506
Lachnospiraceae	<i>Cellulosilyticum</i>	0,0044	0	0,3506
Lachnospiraceae	<i>Anaerosporobacter</i>	0,0024	0	0,3506
Lachnospiraceae	<i>Lactonifactor</i>	0,0024	0	0,3506
Lachnospiraceae	<i>Johnsonella</i>	0,0012	0	0,3506

CAPÍTULO V – RESULTADOS

Lachnospiraceae	<i>Moryella</i>	0,0010	0	0,3506
Lachnospiraceae	<i>Eubacterium ventriosum</i> Group	0	0,0032	0,3506
Lachnospiraceae	<i>Lachnoanaerobaculum</i>	0	0,0031	0,3506
Lachnospiraceae	<i>Lachnospira</i>	0	0,0109	0,3506
Lachnospiraceae	<i>Stomatobaculum</i>	0	0,0009	0,3506
Lachnospiraceae	UC5-1-2E3	0	0,0059	0,3506
Lachnospiraceae	<i>Dorea</i>	0,0377	0,2986	0,3939
Lachnospiraceae	<i>Ruminococcus gnavus</i> Group	3,2177	5,3744	0,4492
Lachnospiraceae	<i>Eisenbergiella</i>	0,1793	0,5182	0,4735
Lachnospiraceae	<i>Lachnospiraceae</i> UCG-004	0,0003	0,0077	0,5240
Lachnospiraceae	<i>Eubacterium eligens</i> Group	0,0063	0,1217	0,5383
Lachnospiraceae	<i>Shuttleworthia</i>	0,0033	0,0010	0,5772
Lachnospiraceae	GCA-900066755	0,0022	0,0151	0,5772
Lachnospiraceae	<i>Eubacterium hallii</i> Group	0,0011	0,0056	0,5772
Lachnospiraceae	<i>Lachnospiraceae</i> NK4A136 group	0,1112	0,3200	0,6093
Lachnospiraceae	<i>Roseburia</i>	0,1196	0,1674	0,6545
Lachnospiraceae	<i>Tyzzera</i>	0,0053	0,0034	0,6545
Lachnospiraceae	<i>Ruminococcus torques</i> Group	1,1256	1,8731	0,6706
Lachnospiraceae	<i>Blautia</i>	0,5904	1,5385	0,7395
Lachnospiraceae	<i>Tyzzera</i> 4	0,8277	0,4606	0,8545
Lachnospiraceae	<i>Agathobacter</i>	0,0374	0,1254	1
Lachnospiraceae	<i>Oribacterium</i>	0,0005	0,0174	1
Lachnospiraceae	<i>Ruminococcus gauvreauii</i> Group	0,0324	0,0089	1
Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i>	1,0017	0,2256	1
Lactobacillaceae	<i>Pediococcus</i>	0,0270	0,0013	1
Leuconostocaceae	<i>Leuconostoc</i>	0,0005	0,0260	0,2615
Peptostreptococcaceae	<i>Clostridioides</i>	0,3668	0,3638	0,1568
Peptostreptococcaceae	<i>Paeniclostridium</i>	0,0017	0	0,1644
Peptostreptococcaceae	<i>Intestinibacter</i>	0	0,0035	0,3506
Peptostreptococcaceae	<i>Romboutsia</i>	0,1560	0,0988	0,4885
Peptostreptococcaceae	<i>Peptostreptococcus</i>	0,0047	0,0008	0,5229
Peptostreptococcaceae	<i>Terrisporobacter</i>	0,0006	0,0013	1
Ruminococcaceae	<i>Butyricicoccus</i>	0,4306	0,1597	0,0600
Ruminococcaceae	<i>Ruminococcaceae</i> UCG-013	0,0017	0,0864	0,0658
Ruminococcaceae	<i>Faecalibacterium</i>	3,2948	0,9126	0,1299

CAPÍTULO V – RESULTADOS

Ruminococcaceae	<i>Ruminiclostridium 1</i>	0	0,0005	0,1644
Ruminococcaceae	<i>Ruminococcaceae UCG-004</i>	0,0387	0,0045	0,1794
Ruminococcaceae	<i>Acetanaerobacterium</i>	0,0028	0,0048	0,2014
Ruminococcaceae	<i>GCA-900066225</i>	0,0427	0,0103	0,2184
Ruminococcaceae	<i>Ruminiclostridium 5</i>	0,4855	0,3936	0,2366
Ruminococcaceae	<i>CAG-352</i>	0,0072	0	0,3506
Ruminococcaceae	<i>Oscillospira</i>	0,0048	0	0,3506
Ruminococcaceae	<i>Papillibacter</i>	0,0010	0	0,3506
Ruminococcaceae	<i>Pseudoflavonifractor</i>	0,0006	0	0,3506
Ruminococcaceae	<i>Angelakisella</i>	0	0,0025	0,3506
Ruminococcaceae	<i>Ruminococcaceae UCG-009</i>	0	0,0008	0,3506
Ruminococcaceae	<i>Ruminococcaceae UCG-002</i>	1,1564	0,9575	0,3605
Ruminococcaceae	<i>Anaerotruncus</i>	0,0501	0,2045	0,3875
Ruminococcaceae	<i>Ruminococcus 2</i>	0,1022	0,0560	0,3894
Ruminococcaceae	<i>Subdoligranulum</i>	0,3407	0,2808	0,4092
Ruminococcaceae	<i>Intestinimonas</i>	0,0816	0,0379	0,4557
Ruminococcaceae	<i>Candidatus Soleaferrea</i>	0,0114	0,0184	0,4885
Ruminococcaceae	<i>DTU089</i>	0,4988	0,002	0,5229
Ruminococcaceae	<i>Pygmaibacter</i>	0,0070	0,0006	0,5240
Ruminococcaceae	<i>Caproiciproducens</i>	0,0004	0,0022	0,5240
Ruminococcaceae	<i>Ruminococcaceae UCG-010</i>	0,0229	0,0383	0,6093
Ruminococcaceae	<i>Negativibacillus</i>	0,0228	0,2899	0,6093
Ruminococcaceae	<i>UBA1819</i>	0,8726	0,6436	0,6742
Ruminococcaceae	<i>Ruminiclostridium 6</i>	0,0184	0,3424	0,7092
Ruminococcaceae	<i>Ruminiclostridium 9</i>	0,0592	0,0437	0,7368
Ruminococcaceae	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>	0,5085	0,5485	0,7589
Ruminococcaceae	<i>Ruminiclostridium</i>	0,0041	0,0043	0,7797
Ruminococcaceae	<i>Hydrogenoanaerobacterium</i>	0,0042	0,1847	0,7983
Ruminococcaceae	<i>Flavonifractor</i>	0,4630	0,1892	0,8977
Ruminococcaceae	<i>Ruminococcaceae NK4A214 Group</i>	0,0462	0,1533	0,8229
Ruminococcaceae	<i>Ruminococcus 1</i>	0,0444	0,0188	0,9055
Ruminococcaceae	<i>Oscillibacter</i>	0,0999	0,1314	0,9293
Ruminococcaceae	<i>Eubacterium coprostanoligenes Group</i>	0,0939	0,1774	0,9617
Ruminococcaceae	<i>Ruminococcaceae UCG-014</i>	0,0794	0,0100	1
Ruminococcaceae	<i>Ruminococcaceae UCG-003</i>	0,0548	0,1800	1

CAPÍTULO V – RESULTADOS

Ruminococcaceae	<i>Harryflintia</i>	0,0122	0,0014	1
Ruminococcaceae	<i>Fournierella</i>	0,0065	0,032	1
Ruminococcaceae	<i>Anaerofilum</i>	0,0011	0,0002	1
Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	0,0020	0,0278	0,3258
Streptococcaceae	<i>Streptococcus</i>	2,3431	3,5834	0,1408
Streptococcaceae	<i>Lactococcus</i>	0,0012	0,0026	0,5653
Syntrophomonadaceae	<i>Syntrophomonas</i>	0	0,0002	0,3506
Veillonellaceae	<i>Megasphaera</i>	0,0026	0,6327	0,1794
Veillonellaceae	<i>Selenomonas 3</i>	0	0,0003	0,3506
Veillonellaceae	<i>Dialister</i>	0,0765	5,9524	0,6229
Veillonellaceae	<i>Veillonella</i>	2,9121	4,5646	0,8342
Veillonellaceae	<i>Anaeroglobus</i>	0,4780	0,9869	0,9720

TABLA 19: Diferencias en las abundancias relativas (%) a nivel de género entre los grupos CDI y P dentro del *phylum* Firmicutes. En negrita se destacan las diferencias estadísticamente significativas (P<0.05).

CAPÍTULO V – RESULTADOS

PHYLUM BACTEROIDETES				
FAMILIA	GÉNERO	MEDIA GRUPO CDI (%)	MEDIA GRUPO P (%)	TEST DE WILCOXON (P-VALUES)
Bacteroidaceae	<i>Bacteroides</i>	26,847	29,1252	0,74
Barnesiellaceae	<i>Barnesiella</i>	0,7501	0,1443	0,506
Barnesiellaceae	<i>Coprobacter</i>	0,0310	0,0155	0,894
Dysgonomonadaceae	<i>Dysgonomonas</i>	0	0,0005	0,3506
Marinifilaceae	<i>Odoribacter</i>	0,8563	0,0437	0,7293
Marinifilaceae	<i>Butyricimonas</i>	0,2069	0,1254	0,7967
Muribaculaceae	CAG-873	0,1587	0	0,3506
Porphyromonadaceae	<i>Porphyromonas</i>	0,0478	0,0114	1
Prevotellaceae	<i>Paraprevotella</i>	0,4986	0,0473	0,0460
Prevotellaceae	<i>Prevotella 7</i>	1,2242	0	0,0797
Prevotellaceae	<i>Prevotellaceae NK3B31 Group</i>	0,0131	0	0,3506
Prevotellaceae	<i>Prevotellaceae UCG-003</i>	0,0127	0	0,3506
Prevotellaceae	<i>Prevotella 2</i>	0	0,0444	0,3506
Prevotellaceae	<i>Prevotella</i>	0,1934	0,0001	0,524
Prevotellaceae	<i>Prevotella 9</i>	0,0213	1,3429	0,5772
Prevotellaceae	<i>Prevotella 6</i>	0,0008	0,0002	0,5772
Rikenellaceae	<i>Rikenellaceae RC9 gut Group</i>	0,0877	0	0,3506
Rikenellaceae	<i>Alistipes</i>	2,8709	2,7723	0,762
Tannerellaceae	<i>Parabacteroides</i>	4,7508	2,3343	0,5322

TABLA 20: Diferencias en las abundancias relativas (%) a nivel de género entre los grupos CDI y P dentro del *phylum* Bacteroidetes. En negrita se destacan las diferencias estadísticamente significativas (P<0.05).

CAPÍTULO V – RESULTADOS

PHYLUM PROTEOBACTERIA				
FAMILIA	GÉNERO	MEDIA GRUPO CDI (%)	MEDIA GRUPO P (%)	TEST DE WILCOXON (P-VALUES)
Burkholderiaceae	<i>Sutterella</i>	0,0608	0,0257	0,1402
Burkholderiaceae	<i>Curvibacter</i>	0	0,0007	0,3506
Burkholderiaceae	<i>Oxalobacter</i>	0	0,0014	0,3506
Burkholderiaceae	<i>Parasutterella</i>	3,0870	1,1747	0,5974
Desulfohalobiaceae	<i>Desulfovermiculus</i>	0,2192	0	0,3506
Desulfovibrionaceae	<i>Bilophila</i>	0,1454	0,7385	0,0815
Desulfovibrionaceae	<i>Desulfovibrio</i>	0,0999	0,0449	0,7983
Enterobacteriaceae	<i>Morganella</i>	0,0043	0,0007	0,2615
Enterobacteriaceae	<i>Proteus</i>	0,8832	0	0,3506
Enterobacteriaceae	<i>Klebsiella</i>	0,0179	3,5697	0,5383
Enterobacteriaceae	<i>Citrobacter</i>	0,0101	0,0095	0,6327
Enterobacteriaceae	<i>Escherichia-Shigella</i>	9,1685	10,6014	1
Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter</i>	0,0014	0,0011	1
Neisseriaceae	<i>Eikenella</i>	0,0003	0	0,3506
Pasteurellaceae	<i>Haemophilus</i>	0,1624	0,2238	0,9787
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	0	0,0015	0,3506
Xanthobacteraceae	<i>Bradyrhizobium</i>	0,0012	0,0002	1

TABLA 21: Diferencias en las abundancias relativas (%) a nivel de género entre los grupos CDI y P dentro del *phylum* Proteobacteria. En negrita se destacan las diferencias estadísticamente significativas (P<0.05).

Con respecto al *phylum* Actinobacteria, ya vimos que en la familia Bifidobacteriaceae el género *Bifidobacterium* presenta una pérdida acentuada en el grupo CDI (0.6245%) mientras que en el grupo P es más moderada (2.0626%) con respecto a los controles sanos. Por consiguiente, se conserva en gran medida en el grupo de los individuos colonizados por *C. difficile*. Asimismo, con respecto al *phylum* Verucomicrobia y su familia Akkermansiaceae se observa que mientras que en el grupo CDI se produce un moderado aumento de *Akkermansia* respecto a los controles sanos, en el grupo P se produce una acentuada bajada (5.9% en CDI frente a 1.3% en P).

CAPÍTULO V – RESULTADOS

Por consiguiente, a pesar de las diferencias vistas en ambos grupos a nivel de género al respecto de los controles sanos, las diferencias con significación estadística son muy escasas. Destacamos únicamente las siguientes:

- En *Eubacterium nodatum Group*, *Clostridium innocuum Group* del *phylum* Firmicutes.
- En *Paraprevotella* del *phylum* Bacteroidetes.

Por ultimo, añadimos una figura para valorar visualmente diferencias importantes en la composición a nivel de género de los 3 grupos de estudio:

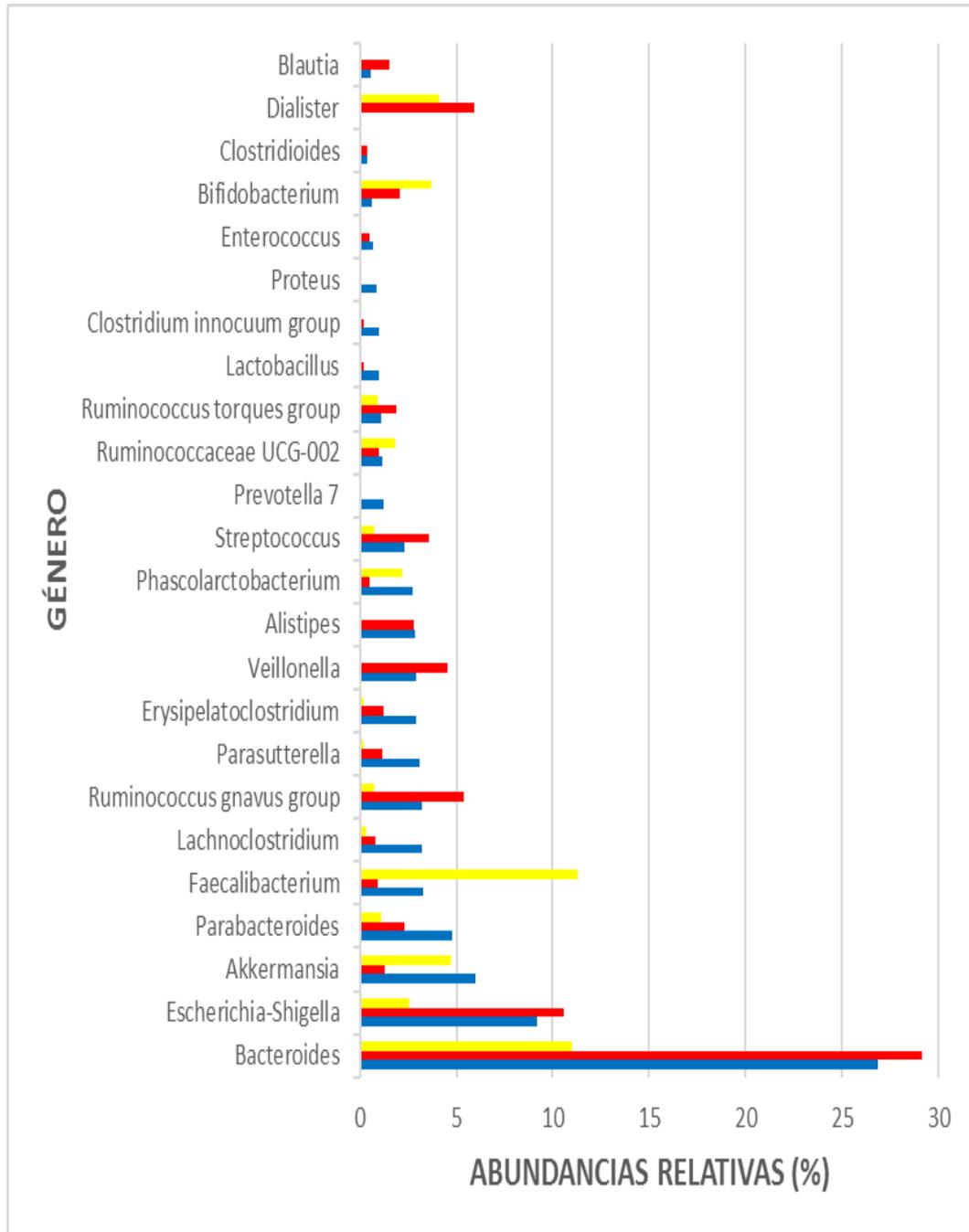


FIGURA 49: Diferencias más importantes en las abundancias relativas a nivel de género en los grupos P, CTRL Y CDI. Grupo P en rojo, Grupo CTRL en amarillo y Grupo CDI en azul.

VI-DISCUSIÓN

CAPITULO VI. DISCUSIÓN.

6.1 ALFA DIVERSIDAD Y RIQUEZA EN LOS GRUPOS CDI Y P CON RESPECTO A LOS CONTROLES SANOS.

Se evidencia una pérdida de alfa diversidad y riqueza en los grupos de pacientes infectados por *C. difficile* y en los individuos colonizados con respecto al grupo de controles sanos, a tenor de los resultados de las medias de los índices de alfa diversidad de Shannon y Simpson, de los estimadores de riqueza CHAO1 y ACE, y de las curvas de rarefacción (Figuras 26 a 33; Tablas 5 y 6), calculados todos ellos para el rango taxonómico de género. Este hecho queda muy bien reflejado en los respectivos diagramas de cajas (Figuras 26 a 29) de cada índice y estimador. No obstante, entre los grupos CDI y P no existen diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la riqueza y alfa diversidad de su respectiva microbiota intestinal. Hemos de remarcar que, en la mayor parte de trabajos anteriores similares, al respecto del mismo punto, se han utilizado los mismos índices y herramientas estadísticas usadas en el presente estudio. Además, resulta destacable que las medianas observables en los diagramas de cajas de los índices y estimadores anteriormente mencionados no difieren de las medias.

La pérdida de alfa diversidad es un hallazgo obtenido muy frecuente en los pacientes con CDI y este hecho concuerda con nuestros resultados, aunque existen matices que debemos comentar. Chang y col. observaron ya en 2008 que la alfa diversidad era muy baja y con diferencias estadísticamente significativas en 3 pacientes con CDI recurrente, con respecto a pacientes con CDI resuelta y 3 controles sanos, donde era normal. No obstante, en 4 pacientes con CDI de inicio y en los controles sanos no se observaron diferencias estadísticamente significativas, aunque los valores de alfa diversidad del grupo con CDI inicial eran más bajos (Chang, 2008).

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

Estudios sobre la restauración de la microbiota intestinal en pacientes con CDI sometidos a FMT como tratamiento, han mostrado la recuperación de la alfa diversidad de forma posterior a dicho tratamiento. Weingarden y col. presentaron que la alfa diversidad se recuperaba tras el FMT y que resultaba comparable a la de los donantes de heces (Weingarden, 2014). No obstante, en un reciente trabajo de Brown y col. también con una cohorte de pacientes con CDI sometidos a FMT, se vio que, a los 4 meses de forma posterior al trasplante, la alfa diversidad aumentaba, aunque sin llegar a los valores encontrados en los donantes de heces (Brown, 2018).

En los trabajos de Antharam, Gu y Schubert, planteados de forma similar, se estudiaron cohortes de pacientes con CDI (grupo CDI), con diarrea nosocomial no debida a *C. difficile* (grupo CDN) y controles sanos. Se observó que ambos grupos CDI y CDN presentaron una pérdida de alfa diversidad y riqueza estadísticamente significativa con respecto al grupo de controles sanos, pero sin diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (Antharam, 2013; Gu, 2016; Schubert, 2014). Por tanto, en pacientes con diarrea nosocomial no debida a *C. difficile* también se observó una pérdida de alfa diversidad y riqueza, de forma similar que en los pacientes con CDI y en individuos colonizados por *C. difficile* de nuestro estudio. En nuestro trabajo el grupo de individuos colonizados fue captado principalmente de la comunidad (87%; 13 de 15 sujetos). Aunque el 47% de estos individuos (7 de 15) presentaron diarrea en el momento de la inclusión en el estudio (adquirida en la comunidad), se incluyeron en el grupo P en base a que la diarrea se pudo atribuir a otra causa o bien porque se determinó que la cepa causal de *C. difficile* era no toxigénica, por tanto, no causante de la clínica. Usamos una definición exacta del estado de colonización (Furuya-Kanamori, 2015), hecho que resulta difícil discernir de los estudios comentados al respecto en este apartado. Es por lo cual que consideramos la cohorte de individuos colonizados por *C. difficile* de naturaleza distinta a estas cohortes de pacientes CDN. Por consiguiente, la pérdida de alfa diversidad y riqueza no es un hallazgo que caracterice únicamente a los sujetos infectados o colonizados por *C. difficile*, sino que lo hallamos en otras distintas situaciones.

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

Milani y col. mediante un enfoque similar a los trabajos anteriores comentados, estudió la microbiota intestinal de tres cohortes de 25 pacientes hospitalizados con CDI (grupo CDI), 29 pacientes hospitalizados que recibieron administración antibiótica reciente (grupo AB+) y 30 pacientes hospitalizados que no habían recibido administración antibiótica reciente (grupo AB-). En estos dos últimos grupos los sujetos no presentaron ni diarrea ni clínica compatible con enfermedad gastrointestinal. De forma similar a otros trabajos, el grupo CDI presentó una alfa diversidad estadísticamente significativa con respecto al grupo AB-, pero de forma llamativa el grupo AB+ presentó una diversidad similar al grupo AB-, es decir que los pacientes que recibieron tratamiento antibiótico presentaron similar alfa diversidad que aquellos que no lo recibieron (Milani, 2016), siendo la administración antibiótica una de las principales causas reconocidas de disrupción de la microbiota intestinal (Kriss, 2018; Khanna, 2016b). El hecho que los pacientes de los grupos AB+ y AB- no presentaran clínica resultaría un dato importante y nos podría sugerir este comportamiento más homogéneo en cuanto a la alfa diversidad, a pesar de la administración antibiótica en el grupo AB+.

Skraban y col. fueron un paso más allá cuando en un trabajo con 66 pacientes con CDI, 137 pacientes a los que se les había determinado la presencia de *C. difficile*, debido a sospecha clínica o bien debido a la presencia de factores de riesgo, con resultado negativo (Grupo CDI-) y 37 controles sanos, determinaron el ribotipo y lo valoraron junto a las diferencias en alfa diversidad de la microbiota intestinal de estos grupos. En primer lugar, observaron que muchos pacientes del grupo CDI- presentaban la alfa diversidad disminuida como los pacientes con CDI, con respecto a los controles sanos. Esto lo achacaron a que se trataba de pacientes hospitalizados, muchos con diarrea y administración antibiótica previa. En segundo lugar, observaron que la alfa diversidad era menor, y por tanto la disbiosis más profunda, en aquellos pacientes donde se evidenciaron la presencia de ribotipos considerados hipervirulentos como el 027. El ribotipo de la cepa causal de los sujetos infectados y colonizados por *C. difficile* en nuestro estudio no ha sido valorado, por tanto, desconocemos el efecto que tiene en nuestros resultados. Skraban y col. concluyeron que la pérdida de alfa diversidad era un hecho común en los grupos CDI y CDI-, ya sean las muestras de heces

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

formes o líquidas, y que no necesariamente conecta solo con CDI, por tanto, puede ser atribuible a otras causas (Skraban, 2013). En la misma línea, Lee y col. en un trabajo prospectivo con pacientes sometidos a trasplante de médula ósea que desarrollaron CDI, concluyeron que la pérdida de alfa diversidad no es un factor de desarrollo inexcusable de CDI (Lee, 2017).

Los trabajos que han incorporado una cohorte de individuos colonizados por *C. difficile*, como en nuestro estudio (donde hay 15 sujetos, 7 de ellos con diarrea) han sido muy escasos, y esto es una de las razones por las cuales lo hemos llevado a cabo. Zhang y col. evidenciaron resultados similares a los nuestros en 8 portadores asintomáticos y en 8 pacientes con CDI estaba disminuida con respecto a los controles sanos, donde observaron una pérdida de alfa diversidad y riqueza con respecto a los controles, pero sin diferencias estadísticamente significativas entre ellos (Zhang, 2015). Dong y col. determinaron la tasa de colonización asintomática de *C. difficile* en la población china. De 1709 individuos estudiados solo se detectaron 12 sujetos portadores asintomáticos. Se observaron unos índices de alfa diversidad y riqueza que indicaron una menor diversidad y riqueza en estos pacientes con presencia de *C. difficile*, pero sin diferencias estadísticamente significativas con el resto de los individuos sin evidencia de *C. difficile* en heces. Interesantemente, 9 de los 12 pacientes portadores asintomáticos tenían más de 65 años (Dong, 2018), ya que se ha considerado que con la edad aumenta la tasa de colonización (Furuya-Kanamori, 2015). Estos dos trabajos, junto al nuestro, apuntan a que los sujetos colonizados en muchos casos van a presentar una pérdida de alfa diversidad y riqueza, que podría verse agravada con la edad, por la presencia de diarrea atribuible a otra causa no *C. difficile*, por la presencia de un ribotipo hipervirulento de la cepa colonizante, administración antibiótica previa, duración de la hospitalización y la presencia de comorbilidades.

Por consiguiente, en el presente estudio la pérdida de alfa diversidad y riqueza se observa tanto en pacientes con CDI como en individuos colonizados por *C. difficile*, de forma coincidente a algunos trabajos anteriores. Esto nos indicaría, como concluyeron otros autores, que la pérdida de diversidad y riqueza

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

no supone de forma irremediable el desarrollo de CDI, ya que también se objetiva en individuos colonizados.

Se ha considerado la administración de antibióticos como uno de los principales desencadenantes de una disbacteriosis con pérdida de alfa diversidad, la cual es un factor de riesgo esencial de desarrollo de CDI (Khanna, 2016b). En nuestro grupo de pacientes con CDI el 93% (14 de 15) había recibido antibióticos en los 3 meses previos, principalmente cefalosporinas, beta-lactámicos y fluorquinolonas, que están considerados de riesgo elevado. En los individuos colonizados por *C. difficile* la tasa de administración antibiótica previa fue del 53% (8 de 15) aunque en el 27% restante este dato fue desconocido (4 de 15). Por tanto, tenemos una causa que explica en gran medida la pérdida de alfa diversidad en ambos grupos. Este dato lo desconocemos en los trabajos de Dong y Zhang, y es posible que la discrepancia existente con el trabajo de Dong, en el que no se encuentra una pérdida de alfa diversidad estadísticamente significativa en 12 individuos colonizados, sea debida a que no hayan recibido administración antibiótica reciente, ya que se trata de individuos no hospitalizados provenientes de la comunidad. Los factores de riesgo para una posible colonización en la comunidad, a diferencia de los determinantes para el desarrollo de CDI, son algo desconocidos. Los estudios epidemiológicos sobre colonización en la comunidad no son muy amplios. La transmisión persona-persona parece ser importante ya que se ha visto que individuos colonizados en la comunidad y sus familias o personas cercanas presentan los mismos ribotipos (Kato, 2001).

El impacto de los antibióticos en la microbiota intestinal en el contexto de la CDI o colonización por *C. difficile* depende de varios factores como su mecanismo de acción, espectro de actividad, dosis y número de dosis recibidas, vía de administración, farmacocinética y prevalencia local de las resistencias de *C. difficile*. En principio cualquier antibiótico puede causar una disbacteriosis de larga duración, pero existen unos antibióticos más disruptivos que otros y que se asocian a un mayor riesgo de desarrollo de CDI. Históricamente, la clindamicina ha sido el antibiótico mejor conocido como factor predisponente de CDI. Desde el inicio del siglo XXI, las fluorquinolonas fueron también consideradas un factor de riesgo de mucho peso. Asimismo, el riesgo va a aumentar en este caso a mayor

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

duración del tratamiento. Las cefalosporinas, macrólidos y beta-lactámicos también son considerados como un factor de riesgo alto o moderado (Khanna, 2016b). Sea como fuere, los antibióticos son capaces de producir cambios profundos y duraderos en la microbiota intestinal que tienen como consecuencia reducciones de alfa diversidad y de riqueza (Antonopoulos, 2009), aunque como vimos en el trabajo de Milani esto no se vea traducido en algunos casos en una reducción significativa de alfa diversidad (Milani, 2016).

Existen otros factores, diferentes a la administración de antibióticos, que pueden dar lugar a una pérdida de alfa diversidad, como son la edad avanzada, enfermedad hepática, enfermedad inflamatoria intestinal y las hemopatías malignas (Kriss, 2018). La presencia de estas situaciones se produjo en el 47% (7 de 15) de los pacientes del grupo CDI, mientras que no se observó en ninguno de los individuos colonizados.

Otro hecho que hemos de tener en cuenta a la hora de valorar nuestros resultados es que la microbiota intestinal, en el contexto de infección o colonización por *C. difficile* en un ámbito hospitalario, está sometida a una dinámica de cambios, que se refleja, entre otros aspectos, en su alfa diversidad y riqueza. Este dato se ha obtenido de los escasos trabajos prospectivos realizados al respecto, es decir, tomando muestras de los mismos individuos hospitalizados a lo largo de un periodo de estancia hospitalaria (Lee, 2017; Vincent, 2016). Este factor no ha sido constatado como significativo en individuos colonizados provenientes de la comunidad, como la mayoría de los sujetos incluidos en el grupo P del presente estudio (87%; 13 de 15), por tanto, no sabemos si este factor podría influir en este grupo. Nuestra cohorte de pacientes con CDI proviene del ámbito hospitalario en un 47% frente al restante 53% que proviene de la comunidad, por tanto, sí que podría influir de alguna manera. El hecho que la pérdida de alfa diversidad en nuestros grupos CDI y P sea estadísticamente significativa apoya que nuestros resultados sean compatibles con la realidad, a pesar de que todos estos factores se debieran tener en cuenta para la valoración de los resultados. No obstante, debemos seguir profundizando, mediante más herramientas estadísticas, con el objetivo de valorar si existen factores que

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

expliquen la naturaleza del estado de portador de *C. difficile* y que mecanismos podrían impedir su evolución a CDI.

6.2 ESTUDIO DE LA BETA DIVERSIDAD EN LOS GRUPOS CDI, P Y CONTROLES SANOS.

Para el estudio de la beta diversidad de la microbiota intestinal de los grupos de estudio hemos utilizado dos herramientas estadísticas como son el índice de Jaccard y el análisis de agrupamiento basado en el Análisis Principal de Componentes o PCoA. El rango taxonómico donde valoramos la beta diversidad, al igual que con la alfa diversidad, fue el de género. Con esta información describimos disimilitudes en la estructura de la microbiota intestinal de los grupos de una forma global.

Se evidencia que los grupos CDI y P presentan una variabilidad interindividual estadísticamente significativa mayor, por tanto, un índice de Jaccard menor, que el grupo CTRL, pero sin diferencias entre ellos, a tenor de los resultados de las medias de cada grupo del índice de Jaccard (Tabla 7). Es destacable que la mediana del índice de Jaccard para el grupo CTRL es mayor que la media, como podemos comprobar en el diagrama de cajas (Figura 34), por tanto, consideramos este valor como más significativo que la media (0.45 frente 0.31). De cualquier manera, consideramos la variabilidad interindividual del grupo de controles sanos como referencia.

Ciertamente pocos estudios han utilizado el índice de Jaccard para valorar la beta diversidad de la microbiota intestinal existente entre sus cohortes de individuos. No obstante, es una herramienta estadística sencilla que nos indica que las muestras de los grupos CDI y P presentan una elevada variabilidad interindividual. Este hecho es en parte compatible con que la estructura de la microbiota intestinal es cambiante y está sujeta a cierta dinámica en individuos infectados y colonizados por *C. difficile* en entornos hospitalarios, como apuntamos en el apartado anterior (Lee, 2017; Vincent, 2016).

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

La segunda herramienta que utilizamos para valorar la beta diversidad de la microbiota intestinal de nuestros grupos de estudio, por consiguiente, para valorar si existen diferencias en su estructura, es el PCoA. Como dijimos en el apartado 4.4.4 *Análisis Principal de Componentes (Principal Component Analysis, PCoA)*, el objetivo es valorar si existe algún factor que explique la mayor parte de la variabilidad de los datos, ya que en este caso podrían ser interpretados de forma sencilla y visual sin perder información relevante. El modelo PCoA que partió de una matriz de datos basado en las abundancias relativas a nivel de género no fue exitoso, puesto que la variabilidad explicada fue muy limitada. El PC1 explicó una pobre variabilidad del 8.6% y el PC2 del 5.6%, por ello, desechamos este modelo.

Recordemos que el PCoA basado en la distancia UniFrac o Análisis UniFrac a diferencia del anterior, se basa en diferencias filogenéticas. La distancia UniFrac entre 2 comunidades es la fracción de rama del árbol filogenético que pertenece a una o a otra, pero no a ambas, por tanto, que es única para cada comunidad. Esto es debido a que, a mayor similitud de secuencias, mayor similitud evolutiva. Comunidades o cohortes de individuos similares, presentaran una pequeña distancia UniFrac, mientras que comunidades diferentes presentaran una gran distancia UniFrac (Lozupone, 2005). Las modalidades UniFrac *Weighted* o *Unweighted* hacen referencia a si tiene o no tiene en cuenta el modelo las abundancias relativas. La mayor parte de los estudios con los que vamos a comparar nuestros resultados van a utilizar este modelo de agrupamiento para valorar diferencias estructurales en la microbiota intestinal de diferentes cohortes.

En el presente estudio el modelo que mejor expresa la mayor variabilidad es el UniFrac *Weighted*. Presenta dos Componentes Principales, PC1 y PC2, que explican una variabilidad del 42.60% y 14.95%. En el *biplot* observamos que la microbiota intestinal de los grupos de pacientes con CDI e individuos colonizados por *C. difficile* frente a los controles sanos tienen probables estructuras diferentes puesto que se ubican en regiones diferentes. Esto es debido a que presentarían composiciones diferentes a nivel de algunos de sus géneros. La variabilidad parece ser mayor en los grupos CDI y P que en el grupo CTRL. Este dato

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

concuera con el obtenido mediante el índice Jaccard. Asimismo, las muestras de los individuos de los grupos CDI y P se solapan en dos *clusters*, por tanto, no podemos diferenciarlos entre si. El grupo CTRL también presenta 3 muestras que se solapan con los dos *clusters* anteriores comentados (Figura 37).

Comenzado con la comparativa de nuestros resultados con los de otros autores, Zhang y col. en su estudio con cohortes de pacientes con CDI, individuos colonizados asintomáticos por *C. difficile* y controles sanos, evaluaron la beta diversidad usando un modelo PCoA basado en distancias UniFrac *Unweighted*. Encontraron que los 3 grupos formaban *clusters* probablemente diferentes. Aunque el autor no lo nombra yo considero, observado su *biplot*, que también hay cierto solapamiento entre sus muestras CDI y P, como ocurre en nuestro estudio (Figura 50). Además, de forma similar a la nuestra, llegaron a la conclusión que la variación interindividual es mayor en los grupos de pacientes con CDI e individuos colonizados que en el grupo de controles sanos. Por tanto, aunque estos dos grupos presentaron una microbiota intestinal con alfa diversidad disminuida con respecto a los controles sanos, pero sin diferencias significativas entre ellos, la estructura de su microbiota intestinal es diferente (Zhang, 2015). Los individuos de ambos grupos CDI y colonizados fueron incluidos desde el ámbito hospitalario, por tanto, existe una mayor probabilidad en los portadores de una mayor edad, mayor probabilidad de presencia de comorbilidades que alteren de por si la estructura de la microbiota intestinal y de mayor probabilidad de administración antibiótica.

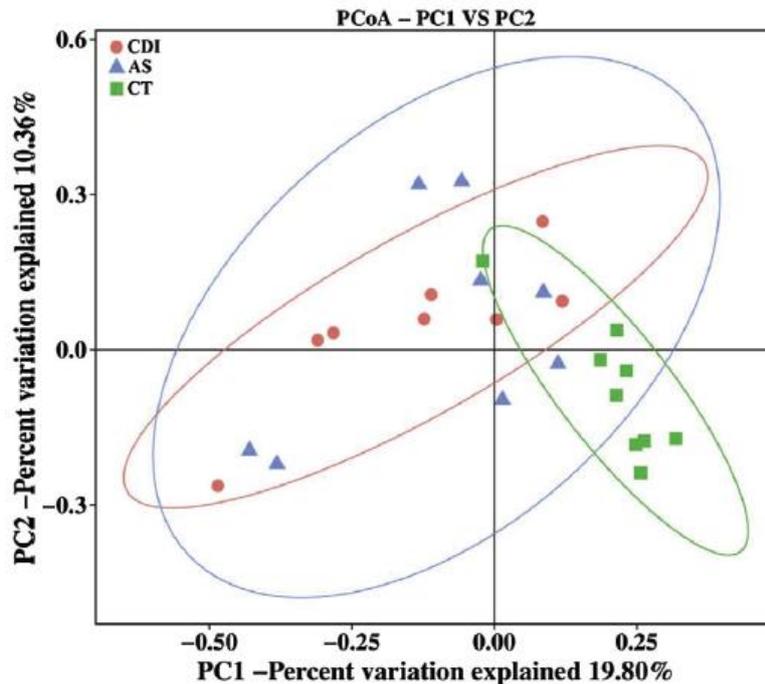


FIGURA 50: PCoA basado en distancias UniFrac *Unweighted* de pacientes con CDI (CDI), individuos colonizados asintomáticos (AS) y controles sanos (CT) en el estudio de Zhang y col. (Zhang, 2015).

En el reciente trabajo de Dong y col. en 2018 para evaluar la tasa de colonización asintomática de *C. difficile* en población china, donde solo se encontraron 12 portadores de 1709 sujetos de estudio, se realizó un PCoA basado en distancias UniFrac *Unweighted*. Se evidenció un alto grado de solapamiento entre los individuos colonizados por *C. difficile* y los controles sanos. No se pudo discriminar diferencias estructurales entre ambos grupos, a diferencia de nuestros resultados (Dong, 2018). Pensamos que estas discrepancias con nuestros resultados podrían ser debidas a que los sujetos fueron incluidos desde la comunidad, donde es probable que la colonización se haya producido persona-persona, en ausencia de factores de riesgo clásicos, aunque hay que recordar que 9 de 12 de estos individuos colonizados tenían más de 65 años. Los autores del trabajo en cierto modo coinciden con esta apreciación. Achacan que sus pacientes colonizados no presentaban una microbiota intestinal alterada, a tenor de los estudios de alfa diversidad y estructura basada en PCoA, en base a factores

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

dependientes del hospedador, como un estado inmune íntegro y la no presencia de comorbilidades que pudieran afectar la integridad de la microbiota intestinal. Esto podría explicar potencialmente las diferencias encontradas entre estos individuos colonizados provenientes de la comunidad, y otras cohortes de individuos colonizados provenientes de hospital y/o de hospital y comunidad, como los sujetos de nuestro trabajo y el de Zhang.

En los estudios donde se ha procurado comprobar la recuperación de la integridad de la microbiota intestinal en pacientes con CDI sometidos a un FMT, se ha visto mediante PCoA basado en distancias UniFrac *Unweighted*, que las muestras “post FMT” presentaron una estructura más relacionada con la de los donantes sanos que con las previas al FMT (Figura 51). Por tanto, el FMT recuperó la estructura de la microbiota intestinal de los pacientes con CDI hacia la de los donantes, que se supone que es una microbiota sana, diversa y con los mecanismos de resistencia a la colonización intacta (Brown, 2018). Los trabajos de Weingarden al respecto coinciden con el Brown y también han mostrado mediante análisis PCoA basados en distancias UniFrac que las muestras “post FMT” y de donantes, forman un *cluster* diferente al de las muestras previas al FMT (Weingarden, 2014).

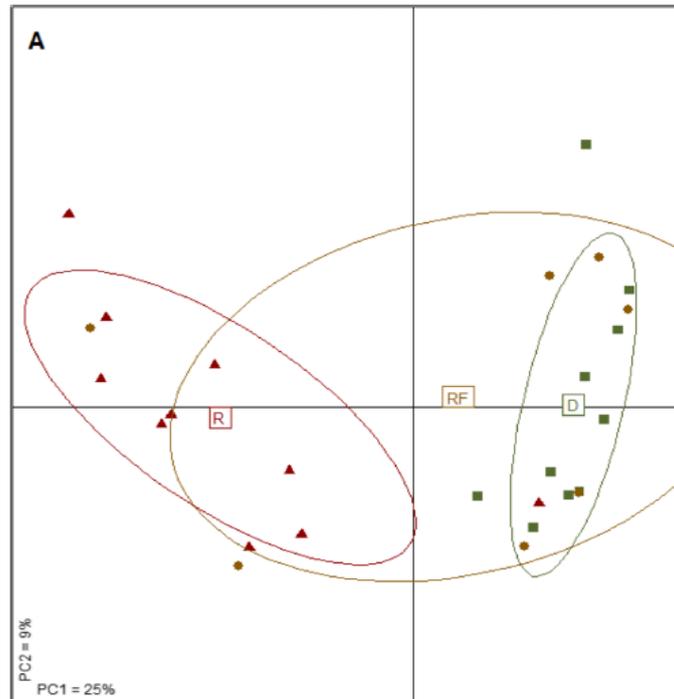


FIGURA 51: PCoA basado en distancias UniFrac *Unweighted* de pacientes con CDI (Grupo R, triangulo), pacientes con CDI sometidos a FMT (Grupo RF, círculo) y donantes sanos (Grupo D, cuadrado) en el estudio de Brown y col. (Brown, 2018).

En el estudio de Skraban y col. que, recordemos, estuvo formado por 3 cohortes de 66 pacientes con CDI, 137 pacientes con sospecha de CDI o presencia de factores de riesgo para CDI pero con prueba negativa para la determinación de *C. difficile* (Grupo CDI-) y 37 controles sanos, realizaron un PCoA basado en una matriz de abundancias relativas de grupos de bacterias dominantes, pero partiendo de 7 grupos en función del origen de la muestra (muestra de rutina/control sano), apariencia de las muestras de heces (líquida/forme) y *C. difficile* *Estatus* (Negativo/Positivo Ribotipo 027/ Positivo Ribotipo No 027). Todos los subgrupos mostraron una gran dispersión, particularmente las muestras rutinarias a las que se les había solicitado pruebas para determinar la presencia de *C. difficile* (se supone que provendrían de pacientes con diarrea o con factores de riesgo para el desarrollo de CDI), es decir, hubo solapamiento con los controles sanos, aunque se advirtieron diferencias estadísticamente significativas en los centros de gravedad de los diferentes *clusters*. Este hecho se reprodujo de forma

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

similar en los otros subgrupos (Apariencia y *C. difficile* *Estatus*), por tanto, se pudo considerar que la división fue adecuada (Skraban, 2016). Este hecho, supone que la estructura de la microbiota intestinal podría ser variable en función del ribotipo de la cepa causal y ser un factor de variabilidad interindividual que debemos tener en cuenta que podría explicar en parte ciertas diferencias encontradas, por ejemplo, entre nuestros resultados y los de Dong.

Gu y col. en su trabajo con pacientes con CDI (grupo CDI), con diarrea nosocomial no CDI (grupo CDN) y controles sanos observaron mediante análisis PCoA que las muestras del grupo CDI se diferenciaban del grupo CDN, aunque algunas muestras del primer grupo se solapaban con las del segundo. A pesar de observarse una gran variabilidad interindividual, el grupo de los controles sanos también pudo diferenciarse del grupo de pacientes con CDI (Gu, 2016). Estos datos son interesantes porque nos indicarían que los pacientes con diarrea nosocomial no debida a *C. difficile* podrían presentar una estructura diferente a la de los pacientes con CDI, es decir, diferente alteración de la integridad de la microbiota intestinal.

Milani y col. con 3 cohortes constituidas por pacientes con CDI, individuos con administración antibiótica reciente (grupo AB+) e individuos sin administración antibiótica reciente (grupo AB-), en ausencia de diarrea o enfermedad gastrointestinal en estos dos últimos grupos, observaron mediante PCoA en base a una matriz UniFrac *Unweighted*, que los grupos AB+ y AB- formaban un *cluster* diferente al grupo CDI, a pesar de la elevada variabilidad interindividual de estos dos grupos (Figura 52). Es destacable que el grupo CDI presentó incluso mayor variabilidad interindividual que el *cluster* formado por AB+ y AB- (Milani, 2016). En un trabajo similar Sangster y col. con dos grupos de 12 pacientes con CDI y 12 pacientes con diarrea nosocomial no CDI, ambos hospitalizados, también encontró mediante análisis PCoA UniFrac *Weighted* disimilitudes entre los grupos (Sangster, 2016). Todos estos datos indicarían que la estructura de la microbiota intestinal de los individuos que hubieran recibido o no administración antibiótica presentaría menos disimilitudes en ausencia de diarrea u otros síntomas gastrointestinales.

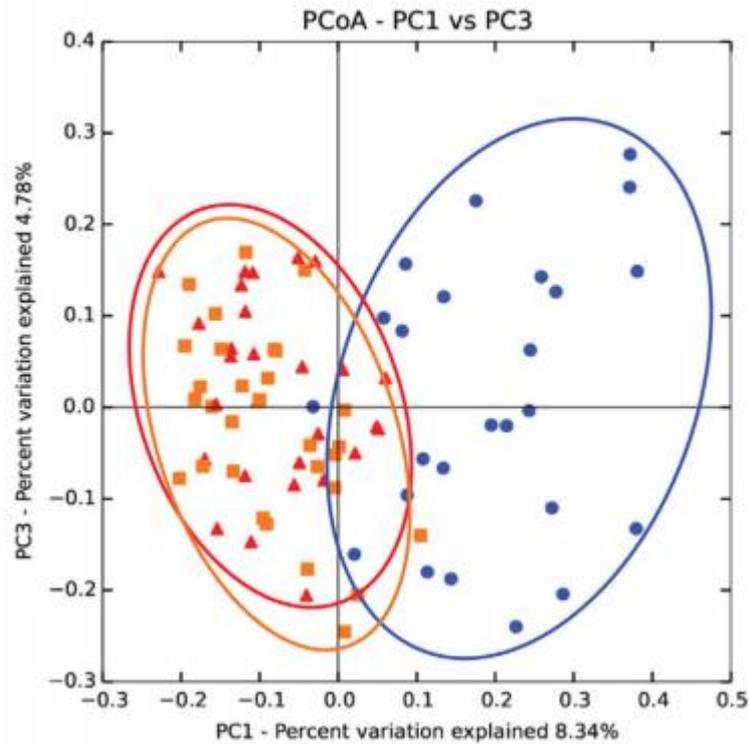


FIGURA 52: PCoA basado en distancias UniFrac *Unweighted* en pacientes con CDI (Grupo CDI, círculo azul), con administración antibiótica previa sin clínica (Grupo AB+, cuadrado verde) y sin administración antibiótica previa sin clínica (Grupo AB-, triangulo rojo) en el estudio de Milani y col. (Milani ,2016).

Por tanto, nuestros datos apuntan a que claramente la estructura de la microbiota intestinal de los pacientes con CDI y de los individuos colonizados por *C. difficile* es diferente a la de los controles sanos. Mediante herramientas estadísticas de agrupamiento como el modelo PCoA basado en distancias UniFrac, no podemos afirmar que la estructura de los grupos P y CDI sea notablemente diferente, ya que muestras de ambos grupos se solapan. Al igual que con el hallazgo de la pérdida de alfa diversidad en ambos grupos, donde no hallamos diferencias estadísticamente significativas, tampoco podríamos usar la beta diversidad como elemento diferenciador notorio del estado de colonización e infección por *C. difficile*. La clave podría estar en combinaciones de géneros que mediante interacciones metabólicas con *C. difficile* creen un ambiente intestinal propicio para la inhibición de la germinación de las esporas, producción de

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

toxinas, etc de este germen en los individuos colonizados. Estas alteraciones en la composición entre los grupos CDI y P podrían caracterizarse mediante el estudio de la composición en abundancias relativas a diferentes rangos taxonómicos. Estas posibles diferencias en la composición serán analizadas en el apartado siguiente.

6.3 DIFERENCIAS EN LA COMPOSICIÓN MEDIANTE EL ESTUDIO DE LAS ABUNDANCIAS RELATIVAS ENTRE LOS GRUPOS CDI, P Y CTRL A DIFERENTES RANGOS TAXONÓMICOS.

6.3.1. Diferencias de composición a nivel de *phylum*.

6.3.1.1 Diferencias de composición a nivel de *phylum* entre los grupos CDI y CTRL.

Si recopilamos los resultados llegados a este punto del estudio tenemos que los grupos de pacientes con CDI y los individuos colonizados por *C. difficile*, presentan una microbiota intestinal con una alfa diversidad y riqueza reducida con respecto al grupo de controles sanos. Asimismo, mediante el análisis de agrupamiento, aplicando un modelo UniFrac, podemos distinguir que la estructura de la microbiota intestinal de los grupos CDI y P es diferente a la del grupo CTRL, produciéndose un cierto solapamiento entre las muestras de los mismos grupos CDI y P. Además, mediante el índice de beta diversidad de Jaccard observamos que los grupos CDI y P presentan una mayor variabilidad interindividual que el grupo CTRL. En el presente apartado comenzamos a valorar las diferencias en cuanto a la composición de los diferentes componentes de la microbiota intestinal de los 3 grupos de estudio en el rango taxonómico de *phylum*. La comparativa de los pacientes con CDI con respecto a los controles sanos muestra diferencias notables entre ambos grupos.

Las alteraciones más destacables que encontramos en los pacientes con CDI con respecto al grupo CTRL fueron las siguientes:

- Reducción estadísticamente significativa de Firmicutes (38.5% en CDI frente a 66.9% en CTRL).

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

- Aumento estadísticamente significativo de Bacteroidetes (39.7% en CDI frente a 19.6% en CTRL).
- Aumento estadísticamente significativo de Proteobacteria (14.4% en CDI frente a 3.8% en CTRL).

Otras alteraciones de interés, pero no significativas y concernientes a grupos minoritarios fueron las siguientes:

- Aumento de Verrucomicrobia (6.0% en CDI frente a 4.7% en CTRL).
- Disminución de Actinobacteria (1.2% en CDI frente a 4.6% en CTRL).

Las diferencias detectadas en el resto de *phylum* no las consideramos debido a que presentaron abundancias relativas muy escasas (por debajo del 0.2% en cualquier caso). En la comparativa no entraron las bacterias Archae metanógenas y los hongos filamentosos que, si bien tienen su importancia en la relación entre microbiota intestinal y salud, se escapan a la secuenciación del ADNr 16S (Sangster, 2016).

En primer lugar, debemos explicar que tomamos como referencia la microbiota intestinal del grupo de los controles sanos, ya que recogemos que se trata de individuos sin factores presentes que disturben su microbiota intestinal. En este grupo la microbiota intestinal está compuesta por 2 *phylum* principales como son Firmicutes y Bacteroidetes, y por una serie de *phylum* minoritarios como son Verrucomicrobia, Fusobacteria, Actinobacteria y ocasionalmente Proteobacteria. Estos datos concuerdan con lo esperado en función de la amplia bibliografía al respecto de la composición a nivel de *phylum* de una microbiota intestinal intacta (Mariat, 2009), a pesar de las variaciones individuales existentes en cuanto a la composición de esta. Asumiendo la posibilidad de estas variaciones encontradas en la población general, se ha visto que las interrelaciones metabólicas permanecen estables, puesto que la microbiota intestinal es un ecosistema dinámico que ejerce funciones metabólicas, fisiológicas, inmunológicas y de protección frente a patógenos (Hollister, 2014). Por tanto, podemos hablar de la existencia de un *core* funcional y concluimos que tomamos como nuestra referencia la microbiota intestinal del grupo CTRL.

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

Comenzando con la comparativa de nuestros resultados con estudios anteriores similares, observamos que en trabajos donde se comparó la microbiota intestinal de pacientes con CDI, anterior y posteriormente a un FMT, se encontró que los cambios en la alfa y beta diversidad después del FMT se relacionaron con unos drásticos cambios en la composición a nivel de *phylum*, principalmente en Firmicutes, Bacteroidetes y Proteobacteria (Weingarden, 2014; Shahinas, 2012). Tanto en Bacteroidetes como en Firmicutes se observó una llamativa reducción en su composición en los pacientes con CDI con respecto a los donantes de heces. La pérdida de estos grupos se recuperó con el FMT, de forma que en los pacientes “post FMT” sus abundancias relativas fueron similares a las de los donantes (80-90% de las OTUs). Con respecto a Proteobacteria, se trató de un *phylum* minoritario en los donantes (<2%), sin embargo, fue dominante en las muestras “pre FMT”, para que después del FMT disminuyera drásticamente, pero sin llegar a las abundancias relativas tan bajas encontradas en los donantes (Weingarden, 2014). De esta forma se comprueba que el FMT restaura casi de forma total la microbiota intestinal de los pacientes con CDI que retorna a una composición similar a la de los donantes, que en este caso son considerados como controles sanos. Por tanto, podemos considerar que los datos que encontramos en estos estudios fueron similares a los nuestros. En primer lugar, también podemos concluir que las diferencias con respecto a alfa y beta diversidad y riqueza que encontramos en los pacientes con CDI con respecto al grupo CTRL se deben a las drásticas diferencias en la composición a nivel de *phylum*. Nuestros datos apuntan a una drástica disminución de Firmicutes (38.5% en CDI frente a 66.9% en CTRL) y a un aumento de Proteobacteria (14.4% en CDI frente a 3.8% en CTRL), como se obtuvo en los estudios anteriores (Weingarden, 2014; Shahinas, 2012). Por el contrario, se observa un aumento en Bacteroidetes (39.7% en CDI frente a 19.6% en CTRL). Tanto en los trabajos de Weingarden y col. como en el de Shahinas y col. las muestras “pre FMT” presentaron una disminución de Bacteroidetes con respecto a los donantes, que después se recuperó con el FMT, por tanto, este dato supone un hallazgo diferente al de nuestro estudio. Al respecto de este hecho, en primer lugar, no hay que perder perspectiva de que estamos valorando las diferencias en cuanto a composición mediante abundancias relativas, y esto supone que haya unos sesgos que hemos de tener en cuenta, y que podría dar lugar a la explicación del hecho de que en nuestro estudio se observe un aumento

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

de Bacteroidetes en los pacientes con CDI. Si supusiésemos que la pérdida de riqueza en este grupo fue debida principalmente a expensas del *phylum* Firmicutes (debido a la administración antibiótica previa), el aumento de Bacteroidetes podría ser un artefacto debido al uso de abundancias relativas y no de abundancias absolutas puesto que no determinamos la carga total bacteriana en heces. Otra explicación posible, ligada a la anterior, es que nuestra cohorte de controles sanos presenta una abundancia relativa media de Bacteroidetes del 19.6%, “más reducida de lo habitual”, y de Firmicutes del 66.9%, “más abundante de lo habitual”. Aunque ambos *phylum* sumen más del 80%, como suele ocurrir en una microbiota intestinal sana, sí que parece que está algo desnivelada, aunque esto no suponga que sea una microbiota disruptiva, ya que presenta elevada riqueza y alfa diversidad. Como ya hemos visto existe una variabilidad interindividual en cuanto a la composición, aunque se conserve el *core* funcional, y bien podría ser este caso, aunque normalmente el *phylum* Bacteroidetes suele abarcar la mitad o más de la microbiota intestinal total (Human Microbiome Project Consortium, 2012). También hay que comentar que en los estudios “pre y post FMT” anteriores los casos de CDI fueron recurrentes, y en nuestro estudio solo dos casos de CDI fueron recurrencias. La CDI recurrente se ha asociado a un grado más profundo de disbacteriosis (Chang, 2008), con una pérdida de alfa diversidad más pronunciada, por tanto, los pacientes de los estudios anteriores podrían haber perdido cantidades de Bacteroidetes y Firmicutes de forma más implícita. Con respecto al *phylum* Proteobacteria en nuestro estudio también se observa un aumento en el grupo de pacientes con CDI con respecto al grupo de controles sanos (14.4% en CDI frente a 3.8% en CTRL), mucho menor a la hallada en el estudio de Weingarden y col. donde 13 de 14 muestras de pacientes con CDI presentaron una abundancia relativa mayor al 90% (Weingarden, 2014). Este dato también apunta, enlazando con lo explicado anteriormente, a que la explicación del aumento de Bacteroidetes en el grupo CDI en nuestro estudio pudiera ser debido a una drástica disminución de Firmicutes y a un aumento no tan pronunciado de Proteobacteria. Siguiendo con otros *phylum* minoritarios, pero de funciones importantes como son Actinobacteria y Verrucomicrobia, nuestros datos concuerdan con los de este tipo de estudios. Aquí, la pérdida de Actinobacteria en pacientes con CDI “pre FMT” se restauró y se igualó a la de los donantes y el aumento de Verrucomicrobia previo al FMT no se observó de forma

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

posterior, al igual que no se observó en los donantes de heces. En nuestro estudio se observa en los pacientes con CDI los mismos resultados que en las anteriormente comentadas muestras “pre FMT” y la restauración hacia una microbiota intestinal normal similar a la de los donantes de heces, nos indica su importancia funcional. Es destacable que las diferencias de nuestras medias en el grupo CDI con respecto al CTRL para estos 2 *phylum* no fueron estadísticamente significativas. Aún así, podemos decir que apuntan a su importancia en la patogénesis de la CDI y su relación con la microbiota intestinal.

En apartados posteriores entraremos en detalle en los mecanismos que podrían subyacer bajo el FMT para que genere la curación de la CDI con esa elevada tasa de éxito (Brandt, 2012). Estos mecanismos, aunque no son objeto del presente estudio nos serán útiles para sentar las bases sobre la patogénesis de la CDI y la inhibición de ciertos procesos que podrían explicar, al menos en parte, la ausencia de clínica en sujetos colonizados por *C. difficile*.

Lee y col. estudiaron de forma prospectiva 234 casos de pacientes con trasplante reciente de médula ósea que recibieron terapia antibiótica profiláctica y de los cuales 53 desarrollaron CDI, e identificaron al comparar la microbiota intestinal de estos con los que no desarrollaron CDI, al *phylum* Bacteroidetes y las familias Lachnospiraceae y Ruminococcaceae del *phylum* Firmicutes, como protectores al desarrollo de CDI de forma conjunta (Lee, 2017). Este dato apunta hacia la importancia de forma general del *phylum* Bacteroidetes al respecto de que es un grupo que impediría o favorecería el no desarrollo de CDI desde un estado de elevado riesgo como inmunodeficiencia, comorbilidades asociadas presentes y terapia antibiótica reciente. Por tanto, resultaría lógico extrapolar este dato al respecto de la búsqueda de cambios en la microbiota intestinal de pacientes con CDI e individuos colonizados que es objetivo principal del presente estudio. Pero, nuestros resultados muestran que el grupo CDI presenta un aumento de Bacteroidetes estadísticamente significativo con respecto al grupo CTRL, y aunque anteriormente hemos mencionado posibles causas a este hallazgo resulta difícil justificar o formular hipótesis de su relación con el desarrollo de CDI con nuestros resultados. Además, aparte del trabajo de Lee y col existen variados trabajos donde también se ha evidenciado que el *phylum* Bacteroidetes y la

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

reducción en su abundancia relativa se asocia a CDI (Zhang, 2015; Gu, 2015; Manges, 2010). Aunque más adelante profundizaremos en las funciones e interrelaciones metabólicas e inmunológicas de todos los *phylum* importantes y su relación con los cambios observados en el presente estudio entre los grupos CDI y CTRL, podemos adelantar que el *phylum* Bacteroidetes es un reconocido miembro asociado con la salud y que contribuye, entre otras funciones al desarrollo del sistema inmune de la mucosa intestinal (Lee, 2013).

El *phylum* Bacteroidetes es fenotípicamente muy diverso. Engloba a bacilos o cocobacilos Gram negativos, no productores de esporas y mayoritariamente anaerobios estrictos. Está constituido en 4 clases, siendo Bacteroidia la más relevante respecto a la microbiota intestinal. Esta clase solo presenta el orden Bacteriodales, siendo el género *Bacteroides* de la familia Bacteroidaceae el género tipo. Particularmente el género *Bacteroides* engloba a bacilos Gram negativos de extremos redondeados, anaerobios estrictos, principalmente sacarolíticos, aunque muy débilmente proteolíticos, cuyos productos de fermentación principales son el succinato y el acetato (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2012). Los géneros predominantes de la microbiota intestinal humana del *phylum* Bacteroidetes son *Bacteroides*, *Prevotella* y *Porphyromonas*, aunque *Alistipes* y *Parabacteroides* también son importantes. Bacteroidetes presenta un genoma con una gran capacidad de procesar polisacáridos puesto que, en comparación con otros *phylum*, codifica a un gran número de CAZymes (*Carbohydrate-Active Enzymes*), como glicosil transferasas, glicósido hidrolasas y polisacárido liasas que actúan a nivel del catabolismo de los carbohidratos provenientes de la dieta o de los glicanos de la mucosa intestinal (El Kaoutari, 2013). Estos genes se localizan en los llamados PULs (*Polysaccharide Utilization Loci*) del cromosoma bacteriano. Los PULs codifican complejos protéicos situados en la membrana externa bacteriana llamados "*Starch Utilization Like Systems*", compuestos por diversas proteínas que atrapan, degradan e importan una variedad de glicanos (Tuson, 2018). Los miembros del *phylum* Bacteroidetes presentan una docena de PULs distintos que les permite adaptarse de forma rápida a cambios en la disponibilidad de estos nutrientes en el intestino. Además, pueden competir con otras bacterias por los polisacáridos de la dieta. Al tratarse de un *phylum* vasto y adaptable a condiciones ambientales, las abundancias que encontramos en diferentes poblaciones pueden

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

ser variables y esto ha impedido que se haya podido relacionar de forma clara con ciertas situaciones patológicas (Johnson, 2017). Por tanto, Bacteroidetes y su notoria presencia en la microbiota intestinal resultaría potencialmente beneficiosa para la salud en este aspecto, debido a que aporta enzimas específicos de la degradación de polisacáridos, y es capaz de complementar la dotación enzimática de nuestras células eucariotas para la degradación de carbohidratos no digeribles (fibra), también llamados MACs (*Microbiota Accessible Carbohydrates*). Es recalable que en ausencia de MACs los miembros de la microbiota intestinal comienzan a aumentar el consumo del *mucus* intestinal.

Revisado el *phylum* Bacteroidetes hemos de añadir que uno de los mecanismos de resistencia a la colonización esencial que se perdería en la CDI, es la competencia por los nutrientes. Una microbiota intestinal sana, rica y diversa provocaría que los patógenos oportunistas, como *C. difficile*, dispongan de limitados nutrientes y la elevada densidad microbiota jugaría un papel protector al ocupar nichos ecológicos. La disbiosis que genera la administración antibiótica junto con otros factores de riesgo, altera las fuentes de nutrientes de dos formas. Esto supone un cambio en la dinámica de la interacción microbiota-patógeno. Al reducirse la diversidad disminuye la competición por los nutrientes y permite que *C. difficile* se asiente en nichos ecológicos antes no permitidos. Además, debido a la lisis celular bacteriana se liberan nutrientes que la microbiota intestinal remanente puede consumir. La teórica pérdida de Bacteroidetes en los pacientes con CDI encontrada en varios estudios, aunque no en el nuestro donde observamos un aumento, daría lugar a una pérdida de mecanismos de resistencia a la colonización relacionados con la competición de nutrientes debido a su importante papel en la degradación de carbohidratos no digeribles. Realmente hay pocos trabajos sobre el metabolismo de *C. difficile* y su obtención de energía a partir de nutrientes, no obstante, se ha observado en un modelo murino que *C. difficile* es capaz de degradar la mucina intestinal y utilizar los ácidos siálicos, monosacáridos componente de esta, como fuente de energía (Ng, 2013). Esto le permitiría expandirse en el intestino del hospedador y ocupar el nicho ecológico que habría quedado vacante. La disponibilidad de los ácidos siálicos de la mucosa intestinal que ocurre tras una disbiosis permitiría y sería un factor importante en la expansión de *C. difficile* y debido a la gran actividad sobre los

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

carbohidratos, la pérdida del *phylum* Bacteroidetes resultaría clave. El incremento transitorio postantibiótico de estos monosacáridos liberados desde la mucosa intestinal proporciona una oportunidad de expansión para *C. difficile*.

Por otro lado, la teórica pérdida (pero recordemos, no observada en nuestro estudio) de Bacteroidetes en los pacientes de CDI también afecta al sistema inmune, puesto que miembros de este *phylum* tienen la capacidad de activar las células dendríticas intestinales que inducen a las células plasmáticas de la mucosa intestinal a secretar IgA, que es una vía de defensa innata frente a patógenos oportunistas como *C. difficile* (He, 2007).

El *phylum* Firmicutes engloba a las bacterias mayormente Gram positivas, ya que todos sus miembros presentan una pared celular amplia y rígida, aunque existen familias Gram negativas como Veillonaceae. Se compone de 26 familias y 223 géneros. Es un *phylum* fenotípicamente muy diverso. La morfología de sus miembros puede ser esférica, filamentosa, bacilar de extremos romos. Puede presentar o no flagelos y pueden presentar o no la capacidad de formar esporas. Pueden ser gérmenes aerobios, anaerobios o facultativos y la mayoría son quimiorganotrofos. Comprende a las clases Bacilli, Clostridia y Erysipelotricha, siendo las dos primeras las más importantes como miembros de la microbiota intestinal. La clase Bacilli engloba 2 órdenes, Bacillales y Lactobacillales. La clase Clostridia engloba a los Clostridiales y otros órdenes de menor relevancia en nuestro estudio. La clase Erysipelotricha solo engloba a la familia Erysipelotrichaceae, de menor relevancia en la microbiota intestinal (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2012). Firmicutes es junto a Bacteroidetes el *phylum* más abundante en una microbiota intestinal sana y saludable. Nuestros resultados nos muestran una dramática reducción en los pacientes con CDI con respecto a los controles sanos. Este hallazgo ya había sido corroborado por otros autores (Weingarden, 2014; Shahinas 2012; Zhang, 2015; Gu, 2015, Manges, 2010). Es por lo cual que al *phylum* Firmicutes se le ha otorgado un papel preponderante y clave en la patogénesis del desarrollo de la CDI, especialmente al orden Clostridiales. Como hemos visto anteriormente el *phylum* Bacteroidetes juega un papel principal en la digestión y metabolismo de componentes de la dieta indigeribles como la fibra y otros polisacáridos, pero también Firmicutes, ya que

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

participa de forma preponderante en la fermentación anaerobia. La fermentación colónica anaerobia es un proceso donde carbohidratos, proteínas, polifenoles y residuos derivados del hospedador provenientes o de la mucosa intestinal son metabolizados en una gran variedad de productos finales. Es una vía metabólica que permite a la bacteria mantener sus funciones celulares y obtener energía. Los productos obtenidos pueden ser AGCC, metabolitos proteicos (compuestos fenólicos, compuestos nitrogenados, compuestos sulfurados) y gases, que pueden interactuar con las células epiteliales e influir en sus funciones. Después de su absorción pueden producir incluso efectos sistémicos. Los Clostridiales incluyen a las principales familias productoras de AGCC. Su importante depleción en los pacientes con CDI provocaría que se hayan corrompido ciertos mecanismos de resistencia a la colonización. Dentro de los AGCC generados a partir de monosacáridos tenemos al acetato, propionato y butirato. Hemos de recalcar que su síntesis a nivel intestinal solo es producto de la fermentación anaeróbica bacteriana. Los AGCC (principalmente el butirato) son la principal fuente de energía de los colonocitos, ya que son absorbidos y oxidados. Esto provocaría de forma directa una disminución de la carga osmótica en el colon debido a carbohidratos no digeribles previniendo una diarrea osmótica. Por otra parte, los AGCC son los principales aniones en el intestino grueso y son los responsables de la caída del pH desde el íleo hasta el colon proximal. A partir del colon distal los AGCC decaen y se incrementa el pH. Esto es importante ya que el pH ácido impide la proliferación de patógenos oportunistas sensibles e inactiva ciertas enzimas microbianas. El aspecto más importante es que los AGCC, en especial el butirato, presentan efectos antiinflamatorios al regular la secreción de citocinas proinflamatorias en diferentes células inmunes intestinales, siendo este mecanismo dependiente del tipo de célula inmune en cuestión. Uno de los mecanismos principales que son capaces de realizar el butirato y el propionato, pero no el acetato, son las modificaciones epigenéticas, es decir la modulación de la expresión génica, como son la acetilación de las histonas. La acetilación de los residuos de lisina de las histonas facilita el acceso de los factores de transcripción a la región promotora, lo que supone la activación del gen. Las histona-diacetilidasas eliminan estos grupos acetilo, permitiendo que las histonas sostengan el ADN más firmemente. Los AGCC mencionados son inhibidores de las histona-diacetilidasas, lo que supone una hiperacetilación de las histonas que afecta a la

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

expresión de los genes. Dependiendo del tipo de célula, la inhibición de las histonas diacetilasas provoca supresión de la proliferación celular, inducción de la diferenciación celular y bloqueo del ciclo celular (Wu, 2012). Por otra parte, los AGCC son considerados unas importantes señales químicas que genera la microbiota intestinal capaces de interactuar con receptores de las células epiteliales intestinales como el FFA2 y FFA3 (*Free Fatty Acid Receptor*). El receptor FFA2 está ampliamente distribuido en los diferentes tipos de células inmunes intestinales y este dato ya nos indica el papel de los AGCC en la regulación de la respuesta inmune. Su activación en este caso conduce a una rápida producción de citocinas protectoras (Masui, 2013). Asimismo, el butirato disminuye la actividad del factor de transcripción NF- κ B (*Nuclear Factor Kappa B*) que participa en la regulación de la expresión de los genes de algunas citocinas como el TNF- α , mediante un mecanismo no dependiente de las histona-diacetilatas. También se ha visto que en macrófagos estimulados con lipopolisacárido el butirato reduce significativamente las concentraciones de las citocinas proinflamatorias TNF- α , TNF- β , IL-1 β y IL-6 (Segain, 2000). Otro estudio más reciente ha confirmado la disminución de mediadores proinflamatorios como la IL-6, IL-12 y NO en macrófagos intestinales de la lámina propia intestinal (Chang, 2014). Al respecto de la inmunidad humoral, los Clostridiales promueven el desarrollo de las células plasmáticas secretoras de IgA (Umesaki, 1999). Con respecto a la respuesta inmune adaptativa, algunos estudios han evidenciado el papel importante de la influencia de los AGCC en los linfocitos T reguladores. Para entender este dato hay que explicar que los linfocitos T son activados por antígenos procesados unidos a receptores del complejo mayor de histocompatibilidad de las células presentadoras de antígenos. Los linfocitos T que se ubican en la lámina propia de la mucosa intestinal puede presentar un efecto citotóxico (Linfocitos T CD8) o bien secretar citocinas y actuar en el control de la respuesta inmune adaptativa (Linfocitos CD4). La microbiota intestinal está constantemente produciendo antígenos que podrían promover una fuerte respuesta inmune en los linfocitos T. Por tanto, se requiere un control muy fino que debe determinar cuándo se debe producir una fuerte respuesta para contrarrestar patógenos oportunistas, y cuando esta se debe inhibir si el antígeno proviene de miembros de la microbiota intestinal comensales o beneficiosos. Esto se consigue mediante la regulación de las subpoblaciones de los linfocitos T. El mantenimiento de un equilibrio entre

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

linfocitos Th1, Th2 y Th17 es esencial y está controlado de forma estricta por la subpoblación de linfocitos T reguladores mediante contacto directo, o bien mediante la secreción de citocinas como el TGF- β , IL-10 y IL-35. Los AGCC inducen la expansión y función a los linfocitos T reguladores (Smith, 2013). Todos estos datos nos conducen a que la drástica pérdida de Firmicutes en los pacientes con CDI, provoca una depleción de las principales familias butirógenicas, que a su vez conlleva una disbacteriosis disfuncional, un riesgo de infecciones oportunistas, un aumento del stress oxidativo y la formación de un ambiente proinflamatorio (Moreno-Indias, 2014). Todos estos aspectos son influyentes en la patogénesis de la CDI.

Enlazando con el párrafo anterior, como ya introdujimos en el marco teórico, la respuesta inmune que se produce durante la CDI puede adoptar un rol protector, pero también un rol patógeno. El reclutamiento de neutrófilos es esencial para combatir la infección, pero también puede exacerbar la severidad de la enfermedad ya que puede conducir a un daño tisular y a la formación de colitis pseudomembranosa. Algunas de las acciones que generan las toxinas de *C. difficile* son la secreción de fluidos a la luz intestinal, la secreción de citocinas proinflamatorias provenientes de diversas células inmunes intestinales y la activación de la degranulación de mastocitos, generando una respuesta inmune exacerbada. Es por lo que se considera que una respuesta inflamatoria intacta es beneficiosa para combatir y resolver la infección sin generar clínica. En este aspecto, como hemos visto, la depleción del *phylum* Firmicutes influye en la respuesta de las células inmunes en el intestino y podría contribuir a la severidad de la CDI. La influencia de los AGCC sobre los linfocitos T reguladores es el mecanismo clave, ya que produce una disminución de linfocitos Th17, cuya activación genera granulopoyesis y reclutamiento de los neutrófilos en el lugar de la infección (Buonomo, 2016).

El *phylum* Proteobacteria está compuesto por bacterias Gram negativas y se constituye en 5 clases, siendo Gammaproteobacteria la más importante en relación con la microbiota intestinal, ya que engloba, entre otros órdenes, el de los Enterobacteriales. Dentro de este orden se engloba la familia Enterobacteriaceae, que es la principal familia de la microbiota intestinal que tiene relevancia en los

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

pacientes de los grupos CDI y P, como veremos en el apartado siguiente. Los miembros de la familia Enterobacteriaceae son bacilos o cocobacilos Gram negativos, móviles o inmóviles y no formadores de esporas. Pueden crecer en presencia y ausencia de oxígeno, por tanto, son aerobios-anaerobios facultativos en su mayoría. Son quimiorganotrofos, pudiendo presentar capacidad metabólica fermentativa o respiratoria. Durante la fermentación de la glucosa, otros carbohidratos y polialcoholes, generan ácidos y gases. La mayoría tienen la capacidad de reducir el nitrato en nitrito. La familia Enterobacteriaceae engloba a muchos géneros con heterogeneidad en cuanto a su genética y metabolismo, lo que le concede heterogeneidad en su ecología y capacidad patógena en el ser humano. Además, presenta una gran capacidad y frecuencia de intercambio genético entre miembros del mismo género o similares, aspecto que le podría suponer ventajas selectivas en ciertos casos (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2012).

La expansión del *phylum* Proteobacteria es hallazgo común en los pacientes con CDI. La ausencia o baja presencia en los controles sanos es también un hallazgo común. Esto ha sido corroborado por múltiples trabajos anteriores (Manges, 2010; Gu, 2015; Zhang, 2015; Weingarden, 2014; Shahinas, 2012). Aunque bien es cierto que, en estos trabajos, las cifras de abundancia relativa del *phylum* Proteobacteria son bastante mayores que a las obtenidas a partir de nuestros resultados para el grupo CDI (14.4%). Por ejemplo, en el trabajo de Weingarden y col. 13 de 14 muestras “pre FMT” presentaron una abundancia relativa mayor al 90%, muy alejado de nuestras cifras.

La expansión del *phylum* Proteobacteria es el más robusto patrón ecológico de disbiosis intestinal. De forma contraria, la ausencia de Proteobacteria como componente de la microbiota intestinal sugiere una microbiota sana. Esta se observa en pacientes con inflamación intestinal severa como la enfermedad inflamatoria intestinal, cáncer colorrectal y enterocolitis necrotizante, y también con inflamación intestinal leve como síndrome metabólico y síndrome de colon irritable (Shin, 2015). En todos estos ejemplos, el aumento de Proteobacteria es efecto y no causa de la disbiosis, como en el caso de la CDI (Litvak, 2017). A continuación, explicaremos los mecanismos que explican esta afirmación.

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

La dominancia de anaerobios estrictos en el intestino grueso, debido a la limitación de oxígeno en este ambiente, tiene importantes consecuencias en el metabolismo y consumo de nutrientes por los componentes de la microbiota intestinal. Por otra parte, el aumento de la disponibilidad de oxígeno en el intestino grueso supone una disrupción de la anaerobiosis que permitiría una ventaja selectiva para los anaerobios facultativos, como los componentes del *phylum* Proteobacteria (Rivera-Chávez, 2016). Esto puede ocurrir por varias causas. En primer lugar, hemos de exponer que los colonocitos son la principal fuente de oxígeno en el intestino grueso, por tanto, en la superficie del colon se emite una cantidad muy limitada. Esto supone que la escasa cantidad de Proteobacteria que se encuentra en una microbiota intestinal sana crezca cerca de la superficie epitelial. En los colonocitos la principal vía de obtención de energía es la beta-oxidación del butirato aportado mediante procesos fermentativos por los grupos productores de butirato, en especial pertenecientes al *phylum* Firmicutes (Velazquez, 1997). En este proceso el butirato se transforma en dióxido de carbono, mediante el consumo de oxígeno. Por tanto, la depleción de Firmicutes y Bacteroidetes que se observa tras la administración antibiótica, conlleva una reorientación metabólica en el colonocito hacia la glucólisis anaerobia, lo que supone un menor consumo de oxígeno, un aumento de la oxigenación en la superficie del colon, y se facilitaría la expansión del *phylum* Proteobacteria (Donohoe, 2012). Asimismo, el ambiente proinflamatorio debido a la disminución de butirato en el intestino grueso conlleva a una hiperplasia en las criptas intestinales, y esto supone un reemplazo de colonocitos hipóxicos a colonocitos indiferenciados normóxicos (López, 2016). Además, la inflamación intestinal (también la provocada por las toxinas TcdA y TcdB) provoca un aumento de las especies reactivas de oxígeno capaces de oxidar compuestos de sulfuro endógenos a tetracionato, un compuesto que actúa como aceptor de electrones y que permite la expansión de anaerobios facultativos como Proteobacteria (Winter, 2013). Por tanto, mediante este doble mecanismo de aumento de la disponibilidad de oxígeno y de compuestos aceptores de electrones, secundario a una depleción de butirato o la existencia de un ambiente proinflamatorio intestinal, se produce la expansión de Proteobacteria en los pacientes con CDI. Como dijimos anteriormente, este hecho es “efecto” y no “causa” de la disbacteriosis que se observa en estos pacientes (Litvak, 2017).

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

La expansión del *phylum* Proteobacteria tiene efectos inflamatorios, puesto que sus miembros presentan como factor de virulencia la liberación de la endotoxina, cuya actividad depende del lípido A del lipopolisacárido bacteriano. La endotoxina se libera durante la lisis celular y provocaría un aumento del reclutamiento de los neutrófilos en el intestino grueso, colaborando en la patogénesis de la CDI.

Entrando ya en los *phylum* minoritarios de la microbiota intestinal de los pacientes con CDI del presente estudio, Actinobacteria engloba a bacterias Gram positivas aerobias, aerobias o anaerobias facultativas y no formadoras de esporas. La mayor parte son gérmenes quimiorganótrofos. Este *phylum* es fenotípicamente muy diverso e incluye a cocos y bacilos. Incluye a las clases Acidimicrobiia, Actinobacteria, Coriobacteriia, Rubrobacteria y Thermoleophilia. Dentro de la clase Actinobacteria se encuentra el orden Bifidobacteriales que engloba a la familia Bifidobacteriaceae. La familia Bifidobacteriaceae es la más importante y representativa del *phylum* Actinobacteria a nivel de la microbiota intestinal, con potenciales efectos beneficiosos para la salud (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2012).

La familia Bifidobacteriaceae incluye a géneros de bacterias Gram positivas, en forma de bacilos simples o en agregados, sin cápsula, no formadoras de esporas y sin movilidad. Son anaerobias, quimiorganótrofas, de metabolismo fermentativo que genera ácidos, pero no gases, a partir de múltiples carbohidratos (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2012).

En el presente estudio observamos una reducción en la abundancia relativa de Actinobacteria en el grupo de los pacientes con CDI frente a los controles sanos. Esta reducción es cuantitativamente poco importante (4.6% en CTRL frente a 1.2% en CDI), pero puede tener consecuencias debido a los efectos beneficiosos que producen los miembros de este *phylum*. Históricamente y debido a que es un *phylum* minoritario, en muchos trabajos donde se ha querido dilucidar los mecanismos patogénicos subyacentes a la CDI se ha obviado su papel. No obstante, algunos trabajos anteriores sí que destacan sus abundancias relativas diferentes en los pacientes con CDI con respecto a grupos control. Milani y col. al

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

comparar una cohorte de pacientes con CDI frente a pacientes que no habían recibido antibioticoterapia previa como grupo control, observaron que se producía una reducción del género *Bifidobacterium* en el grupo CDI (Milani, 2016). Estos resultados han sido corroborados en otros trabajos como el de Zhang y col. (Zhang, 2015). También, Skraban y col. en un trabajo similar evidenciaron que *Bifidobacterium Longum* era el mejor predictor de un estatus *C. difficile* negativo (Skraban, 2013). Weingarden y col., estudiando la microbiota intestinal en la CDI en pacientes sometidos a FMT con éxito, observaron que en las muestras “post FMT” se producía un aumento en Actinobacteria, lo que supone que son parte importante en la restauración de la microbiota intestinal de estos pacientes (Weingarden, 2014). No obstante, otros pocos trabajos han encontrado que el *phylum* Actinobacteria tuvo una abundancia relativa similar, o sin diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con CDI y los controles sanos (Manges, 2010; Gu, 2016). Un hecho importante a recalcar es que la abundancia relativa de Bifidobacteriacea disminuye con la edad, permitiendo que la microbiota intestinal sea más permisiva a infecciones oportunistas en la edad avanzada (Claesson, 2012).

Los efectos beneficiosos que presentan la familia Bifidobacteriacea y la relación de su depleción con la patogénesis de la CDI, serán discutidos en apartados siguientes, cuando pasemos a valorar las diferencias en la composición a nivel de familias y géneros.

El *phylum* Verrococomicrobia, también minoritario, engloba a la importante y relevante familia Akkermansiaceae, que a su vez contiene al género *Akkermansia*. Dicho género está constituido por bacterias Gram negativas, en forma de cocobacilos aislados, en pareja y raramente en cadena. No presentan movilidad y son anaeróbios estrictos. Son quimiorganótrofos y su metabolismo es fermentativo obligado. Acetato, propionato y etanol son sus principales productos provenientes de la fermentación (Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology, 2012). La particular característica que presentan es que son capaces de degradar la mucina de la capa mucosa. Esto le confiere unas propiedades especiales que serán discutidas en apartados siguientes, cuando pasemos a valorar las diferencias a nivel de familias y géneros.

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

En el presente estudio se produce un ligero aumento en la abundancia relativa de Verrucomicrobia (más adelante veremos que se trata en su totalidad del género *Akkermansia*) en el grupo de los pacientes con CDI, con respecto a los controles sanos (6.0% en CDI frente a 4.7%), siendo la diferencia no estadísticamente significativa ($P=0.17$). No obstante, pensamos que este dato es importante dadas las peculiares propiedades de este género al respecto de la degradación de la propia mucina de la capa mucosa intestinal del hospedador. Estas propiedades y la relación en la patogénesis de la CDI serán discutidas en apartados siguientes, cuando pasemos a valorar las diferencias en la composición a nivel de familias y géneros.

En pocos trabajos se ha mencionado el *phylum* Verrucomicrobia en cuanto a su relación con la patogénesis de la CDI y si se trata de un grupo protector o predisponente a la misma. Weingarden y col. en un trabajo donde valora las diferencias en la microbiota intestinal en pacientes que se van a someter a FMT y tomando como controles sanos a los donantes de heces, destacó la disminución de del *phylum* Verrocomicrobia en las muestras “post FMT”, situándolo como un factor predisponente al desarrollo de CDI (Weingarden, 2014). La primera observación de incrementos de *Akkermansia muciniphila* en una cohorte de pacientes con CDI, la proporcionó Sangster y col. en 2016 (Sangster, 2016). La explicación de este dato se basó en que *Akkermansia muciniphila* es una bacteria con capacidad para degradar la mucina, componente de la capa mucosa, y este hecho podría suponer una ventaja selectiva para *C. difficile* para su colonización y expansión. Ya profundizaremos en este aspecto en los próximos apartados, como dijimos anteriormente. Por otra parte, en el trabajo de Milani y col con 3 cohortes; pacientes con CDI, pacientes sin CDI pero que habían recibido terapia antibiótica (AB+) y pacientes sin CDI sin recibir administración antibiótica (AB-), observó al comparar la composición de la microbiota intestinal en los grupos CDI y AB- que se producía una disminución de *Akkermansia* en el grupo CDI, y que se trataba de un grupo protector debido a potenciales efectos beneficiosos (Milani, 2016). Esta dualidad de efectos será discutida próximamente. Asimismo, Milani y col. destacan que en varias muestras de la cohorte de pacientes con CDI se observaron incrementos de *Akkermansia*, achacándolo a un epifenómeno debido a modificaciones del microambiente intestinal.

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

6.3.1.2 Diferencias de composición a nivel de *phylum* entre los grupos P y CTRL y entre los grupos CDI y P.

En este apartado procedemos a analizar las diferencias en la composición a nivel de *phylum* entre los grupos de individuos colonizados por *C. difficile* frente al grupo de controles sanos, y también discutiremos al mismo tiempo las diferencias entre los grupos de individuos colonizados y pacientes con CDI.

En líneas generales, las diferencias en la composición de la microbiota intestinal a nivel de *phylum* en el grupo P con respecto al grupo CTRL son similares a las encontradas en el grupo CDI, aunque con sendas diferencias importantes en los grupos minoritarios y con ligeros matices en los grupos mayoritarios. Estas diferencias en los grupos minoritarios ya aportan luz al objetivo del presente estudio, el cual es discernir diferencias en la microbiota intestinal entre los individuos colonizados e infectados por *C. difficile*, e que nos permita explicar los mecanismos patogénicos de la CDI y los subyacentes al estado de colonización.

En el grupo P con respecto a los controles sanos, se observa en los *phylum* mayoritarios una fuerte depleción de Firmicutes (66.9% en CTRL frente a 39.1% en P), un aumento en Bacteroidetes (19.6% en CTRL frente a 36.0% en P) y un aumento en Proteobacteria (3.8% en CTRL frente a 20.5% en P). Las diferencias con Firmicutes y Bacteroidetes son estadísticamente significativas ($P < 0.05$) y con Proteobacteria no lo es, aunque la P es de 0.0636 (a efectos prácticos podemos considerar que lo es). El patrón de disbacteriosis que nos aporta el análisis de los grupos mayoritarios en el grupo P es similar al encontrado en el grupo CDI, con escasas variaciones. El aumento de Bacteroidetes es ligeramente inferior en P que en CDI y la expansión de Proteobacteria es algo superior en P que en CDI (ambas diferencias no son estadísticamente significativas). La depleción en Firmicutes es similar en ambos grupos CDI y P. Estos resultados enlazan con los análisis de alfa y beta diversidad. Ya observamos una pérdida de riqueza y alfa diversidad en ambos grupos CDI y P con respecto a los controles sanos, pero sin diferencias estadísticamente significativas entre ambos. También, mediante el análisis de agrupamiento UniFrac *unweighted* observamos que las muestras de los grupos

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

CDI y P presentaban disimilitudes con respecto al grupo CTRL al formar este un *cluster* bien diferenciado, pero también que las muestras de los grupos CDI y P presentaban cierto grado de solapamiento y no podían diferenciarse como *clusters* diferentes. Por tanto, era de esperar que las diferencias entre ambos grupos con respecto a los *phylum* mayoritarios fueran mínimas.

La importante depleción de Firmicutes en el grupo de individuos colonizados conlleva a una pérdida de mecanismos de resistencia a la colonización, al igual que lo apuntado en el apartado anterior con respecto al mismo hallazgo que encontramos en los pacientes con CDI. La expansión de Proteobacteria, curiosamente algo más pronunciado en el grupo P, también implicaría, al igual que en el grupo CDI, la presencia de disbacteriosis, debido a un aumento de la disponibilidad del oxígeno y de compuestos aceptores de electrones, de forma secundaria a una depleción de butirato o la existencia de un ambiente proinflamatorio intestinal, considerando este hecho como “efecto” y no como “causa” (Litvak, 2017). El aumento de Bacteroidetes, aunque ligeramente inferior en el grupo P respecto al grupo CDI, es difícil de explicar, al igual que en el grupo CDI. Ya hemos visto que se trata de un *phylum* que cuenta con grupos protectores de bacterias con importantes funciones en cuanto al metabolismo de carbohidratos y en cuanto al modelaje de la respuesta inmune. Cuando comparemos más adelante estos resultados con los escasos estudios realizados al respecto, discutiremos este hallazgo.

Por tanto, por los resultados antes mencionados, los individuos colonizados por *C. difficile* presentan un grado de disbacteriosis cercano al de los pacientes con CDI, en base a las similitudes que encontramos al respecto de sus *phylum* mayoritarios. No obstante, los antecedentes de esta cohorte de individuos son diferentes a los del grupo CDI. La edad media es inferior (51 ± 26 en el grupo P frente a 69 ± 19 en el grupo CDI), la tasa de administración antibiótica previa es inferior (53% en el grupo P frente a 93% en el grupo CDI), la presencia de comorbilidades es inferior (40% en el grupo P frente a 87% en el grupo CDI) y la mayor parte de los casos provienen de la comunidad (87% a diferencia del 13% de los pacientes con CDI, donde la mayor parte eran pacientes hospitalizados). Además, el 47% de los individuos estuvieron colonizados por cepas no

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

toxigénicas de *C. difficile*, hecho que obviamente no ocurre en los pacientes con CDI, puesto que la cepa en estos casos es siempre toxigénica.

Las diferencias más destacables, como hemos adelantado anteriormente, se producen en los *phylum* minoritarios Actinobacteria y Verrucomicrobia. De forma llamativa, el *phylum* Actinobacteria va descendiendo desde los grupos CTRL (4.6%), P (2.8%) hasta CDI (1.7%). Aunque las diferencias no son estadísticamente significativas, consideráramos que existe una tendencia, y que en el grupo P existe una pérdida de Actinobacteria no tan pronunciada como en el grupo CDI. Este hallazgo lo consideriríamos importante. El *phylum* Actinobacteria engloba a la familia Bifidobacteriaceae, de efectos beneficiosos comentados brevemente en el apartado anterior y que serán más ampliamente desarrollados cuando veamos las diferencias a nivel de familia y género. El hecho de mantener una cantidad todavía adecuada de esta familia podría ser un dato importante a la hora de clarificar la microbiota intestinal de los individuos colonizados por *C. difficile* que permanecen en este estado sin desarrollar CDI. Asimismo, de forma muy llamativa encontramos diferencias con respecto al *phylum* Verrucomicrobia. Observamos una disminución en el grupo P con respecto a los controles sanos (1.3% en P frente a 4.7% en CTRL), de forma a diferente al grupo CDI donde se evidencia un aumento (6.0% en CDI frente a 4.7% en CTRL). Además, la diferencia entre el grupo CDI y P (6.0% en CDI frente a 1.3% en P) es estadísticamente significativa. Este hallazgo es novedoso. Si bien se había publicado que el género *Akkermansia* de la familia Akkermansiaceae, principales miembros de la microbiota intestinal del *phylum* Verrucomicrobia, podría tener un papel predisponente en la CDI (Sangster, 2016; Weingarden, 2014) debido a una serie de particularidades, nunca se había evidenciado que hubiera una disminución en los individuos colonizados por *C. difficile* con respecto a los controles sanos. Este hecho, que será discutido más profundamente cuando veamos las diferencias en la composición a nivel de género y familia, realza el papel de este grupo de bacterias minoritario, aunque importante, en la patogénesis de la CDI (Hryckowian, 2017).

Llegados a este punto vamos a comparar nuestros resultados de las diferencias de composición de la microbiota intestinal a nivel de *phylum* con la

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

cohorte de individuos colonizados con los escasos estudios al respecto realizados hasta la fecha. La comunidad científica coincide en que hacen falta más datos sobre la composición de la microbiota intestinal y su relación con la patogénesis de la CDI, y en que la comparativa entre cohortes de pacientes con CDI en individuos colonizados por *C. difficile* resulta una excelente aproximación para arrojar luz a estos hechos.

Rea y col. en una cohorte de 22 individuos colonizados por *C. difficile* provenientes de instituciones para la tercera edad, no encontraron diferencias en la composición a nivel de *phylum* a excepción de un ligero aumento de Proteobacteria (4.3% frente a en 2.3% en 252 controles sanos). Por tanto, sus autores sugieren que la microbiota intestinal de estos individuos podría prevenirles de la germinación, multiplicación y expansión, y toxicidad de *C. difficile*. También se destacó una elevada variabilidad en la composición en estos pacientes colonizados (Rea, 2011). Estos resultados son diferentes a los nuestros, donde si que encontramos diferencias a nivel de *phylum* entre los individuos colonizados con respecto a los controles, que nos permite afirmar que existe un grado de disbacteriosis importante, pero que también debe existir algún factor que inhiba la expansión y toxicidad de *C. difficile* en esta cohorte, coincidiendo con los autores de este trabajo en este punto.

Zhang y col. en una aproximación similar a la nuestra, utilizaron 3 cohortes de 8 pacientes con CDI, 8 individuos portadores asintomáticos de *C. difficile* y 9 controles sanos, todos ellos hospitalizados, donde el 100% de los pacientes con CDI y el 75% de los portadores asintomáticos habían recibido tratamiento antibiótico previo. Observaron que en el grupo de portadores asintomáticos las diferencias en la composición a nivel de *phylum* eran fehacientes con respecto al grupo de controles sanos. Para los 3 *phylum* mayoritarios el estado de portador se colocaba como un estado intermedio entre el estado de enfermo y el estado sano. Se produjo una depleción en Firmicutes y Bacteroidetes menos pronunciada y un aumento de Proteobacteria también menos pronunciado que los observados en los pacientes con CDI. Con respecto a Actinobacteria se observó en portadores un aumento con respecto a los controles sanos pero una erradicación absoluta en los pacientes con CDI (Figura 53). Los autores

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

concluyeron en base a las similitudes en la composición a nivel de *phylum* entre los grupos de portadores asintomáticos y los pacientes con CDI, que en los portadores asintomáticos de *C. difficile* se observa una disbacteriosis con depleción de grupos butirogénicos, pero especularon que estos no desarrollan CDI debido a factores dependientes del hospedador como el estado inmune. (Zhang, 2015). Nuestros resultados en el grupo de individuos colonizados son similares a los obtenidos por Zhang y col., evidenciándose una depleción en Firmicutes y una expansión de Proteobacteria, aunque en nuestro estudio se observa un aumento en Bacteroidetes a diferencia del anterior donde se observó una disminución. Los resultados de nuestro estudio en cuanto al aumento en Bacteroidetes en los individuos colonizados de *C. difficile* (al igual que en los pacientes con CDI) podría tener varias explicaciones. Como hemos comentado anteriormente para valorar diferencias en la composición utilizamos abundancias relativas y esto podría estar sujeto a sesgos en la interpretación. Si asumieramos que la antibioticoterapia previa provocaría la intensa depleción de Firmicutes, el aumento en Bacteroidetes podría ser un artefacto, como argumentamos en relación con el grupo CDI. La diferencia con el grupo P es que en esta cohorte la administración antibiótica previa solo se documentó en el 53% de los sujetos, a diferencia del grupo CDI donde se documentó en el 93%. Asimismo, la mayor parte de los sujetos provienen de la comunidad y la presencia de comorbilidades es mucho menor que en el grupo CDI. Por tanto, consideramos que esta explicación tiene menos peso para esta cohorte de individuos. Otro posible argumento es que, a nuestra impresión, la cantidad de Bacteroidetes en los controles sanos podría ser menor de lo esperada y la de Firmicutes mayor de lo esperada, en base a la bibliografía (Human Microbiome Project Consortium, 2012), aunque esto no suponga la presencia de disbacteriosis en esta cohorte. Por tanto, el aumento de Bacteroidetes en individuos colonizados supondría un artefacto como en el caso anterior. La tercera explicación es asumir que el aumento de Bacteroidetes en individuos colonizados conlleva un efecto protector que actuaría impidiendo la transición desde un estado de colonización a infección por *C. difficile*. Como hemos visto se trata de un *phylum* constituido por miembros con potenciales efectos beneficiosos en cuanto a la digestión de carbohidratos, desplazamiento de patógenos oportunistas por competencia por el nicho ecológico y activación del sistema inmune (Johnson, 2016).

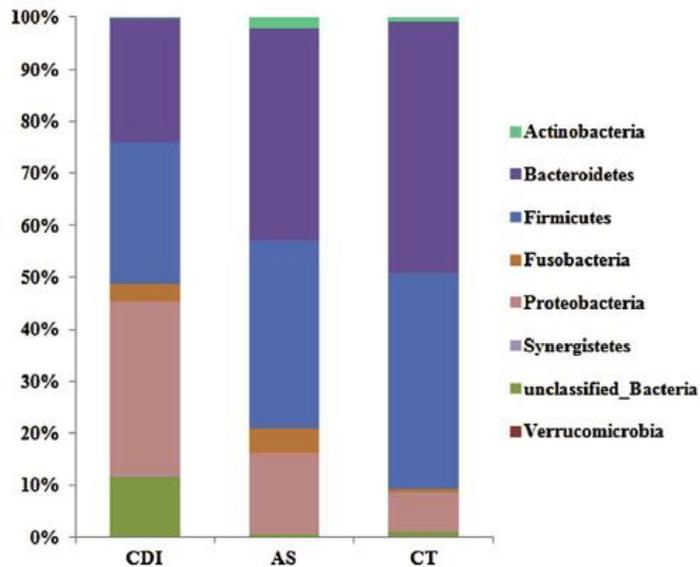


FIGURA 53: Diferencias en las abundancias relativas (%) de los *phylum* en los grupos CDI, AS y CT en el estudio Zhang y col. CDI: *C. difficile* infection patients, AS: *Asymptomatic C. difficile* carriers, CT: *Healthy controls*. (Zhang, 2015).

Dong y col. estudiaron la microbiota intestinal en 12 sujetos de nacionalidad china provenientes de la comunidad al realizar un extenso cribado poblacional de colonización de *C. difficile*. En estos 12 individuos colonizados, entre las diferencias en la composición a nivel de *phylum* destacaron la disminución en Bacteroidetes (22% en colonizados frente a 44% en controles), el aumento en Proteobacteria (21% en colonizados frente a 12% en controles) y un ligero aumento en Actinobacteria (resultados no aportados por el autor). Al respecto del *phylum* Firmicutes no hubo diferencias. Los autores concluyeron que la microbiota de los individuos colonizados era susceptible de desarrollar CDI puesto que había evidencia de disbacteriosis (Dong, 2018). Es destacable el dato de Actinobacteria y su importancia como grupo protector y su relación en la susceptibilidad al desarrollo de CDI en individuos colonizados por *C. difficile*, en concordancia con nuestros resultados.

En el último estudio realizado similar al nuestro se ha comparado la microbiota intestinal de 21 sujetos colonizados por *C. difficile* y 58 pacientes con

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

CDI con la de una cohorte de controles sanos. Las diferencias en la composición no fueron tan dramáticas como las que obtuvimos en nuestro estudio. Se evidenció en el grupo de colonizados una ligera disminución en Firmicutes, Bacteroidetes y Actinobacteria, y un aumento en Proteobacteria. En el grupo de pacientes con CDI los resultados fueron similares (Han, 2019).

Para sintetizar los hallazgos encontrados en la microbiota intestinal a nivel de *phylum* en los individuos colonizados por *C. difficile*, previamente habría que exponer que la colonización puede explicarse por factores dependientes de la virulencia de la cepa causal, o por el grado de compromiso de la microbiota intestinal que es insuficiente para que se establezca una completa virulencia, es decir, una completa germinación y toxicidad suficiente para que se establezca la clínica. En nuestra cohorte de individuos colonizados por *C. difficile* las diferencias en la composición de la microbiota intestinal con respecto a los controles sanos, es bastante similar a la encontrada en nuestra cohorte de pacientes con CDI. Esto ocurre en los tres *phylum* mayoritarios; Firmicutes, Bacteroidetes y Proteobacteria. Es en los *phylum* minoritarios donde empezamos a encontrar diferencias que nos permiten caracterizar el estado de colonización. El mantenimiento de la abundancia relativa de Actinobacteria por encima de la del grupo de pacientes con CDI es un hallazgo que permitiría explicar este hecho en parte. La disminución de Verrucomicrobia con respecto a los controles, y el aumento que se produce en el grupo CDI supone un hallazgo nuevo que pone en boga la importancia de la familia Akkermansiaceae en la patogénesis de la CDI que supone una ventaja selectiva para la expansión de *C. difficile*. Los pocos trabajos realizados al respecto de forma similar arrojan datos variables, pero podemos observar varias tendencias. Salvo en el trabajo de Rea y col. se suele evidenciar el estado de colonización como también un estado disruptivo de la microbiota intestinal en mayor o menor grado de forma similar a la disbacteriosis franca observada en los pacientes con CDI, con disminuciones en Firmicutes, Bacteroidetes y aumento en Proteobacteria, pero con Actinobacteria mayormente conservado. En algunos de estos trabajos los autores concluyen que el estado de portador implica una microbiota intestinal susceptible de infección. Pensamos que esto en parte es cierto. En un sujeto colonizado se ha debido producir una disbacteriosis previa en mayor o menor grado para que sea posible la

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

colonización de *C. difficile*, pero a su vez, en el contexto de esa disbacteriosis deben existir grupos de bacterias que minimizan la replicación, germinación y toxicidad necesarias para que se establezca la virulencia completa. El estudio de las diferencias en la composición a nivel de *phylum* entre las cohortes de pacientes con CDI, individuos colonizados y controles sanos ya empieza a arrojar luz. El siguiente paso es discutir las diferencias en la composición a nivel de género y familia, dentro de los mismos *phylum* comentados.

6.3.2 Diferencias de composición a nivel de familia y género pertenecientes al *phylum* Firmicutes entre los grupos CDI y P con respecto al grupo CTRL.

En este apartado y en los siguientes la forma de proceder va a ser discutir las similitudes y diferencias en la composición de familias y géneros pertenecientes al *phylum* Firmicutes, en este caso, entre los grupos CDI y P con respecto a los controles sanos. Esto nos permitirá encontrar grupos de bacterias que impidan que los individuos colonizados por *C. difficile* presenten clínica asociada a la presencia de esta bacteria.

En el apartado “6.3.1. Diferencias de composición a nivel de *phylum*” discutimos la depleción acentuada que se observa en el *phylum* Firmicutes en ambas cohortes de pacientes con CDI e individuos colonizados por *C. difficile* con respecto a los controles sanos. Ahora vamos a discutir a costa de que familias y géneros es debida esta dramática disminución.

Las diferencias a nivel de familia que consideramos más significativas en el grupo CDI con respecto a controles sanos son las siguientes:

- Disminuciones estadísticamente significativas en la familia Ruminococcaceae (9.3% en CDI frente a 31.4% en CTRL).
- Disminuciones no estadísticamente significativas en las familias Lachnospiraceae (11.8% en CDI frente a 18.7% en CTRL) y Veillonelaceae (3.5% en CDI frente a 11.0% en CTRL), aunque al respecto de Lachnospiraceae la *p* es 0.07.
- Aumentos no estadísticamente significativos en las familias Acidaminococcaceae (3.5% en CDI frente a 2.2% en CTRL),

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

Erysipelotrichaceae (4.3% en CDI frente a 1.8% en CTRL), Streptococcaceae (2.3% en CDI frente a 0.7% en CTRL), Lactobacillaceae (3.5% en CDI frente a 11.0% en CTRL), Enterococcaceae (0.6853% en CDI frente a 0% en CTRL) y Peptostreptococcaceae (0.5298% en CDI frente a 0.0600% en CTRL).

Por otra parte, las diferencias a nivel de familia que consideramos más significativas en el grupo P con respecto a los controles sanos son las siguientes:

- Disminuciones estadísticamente significativas en las familias Ruminococcaceae (6.4% en P frente a 31.4% en CTRL) y Acidaminococcaceae (0.5% en P frente a 2.2% en CTRL).
- Disminuciones no estadísticamente significativas en las familia Lachnospiraceae (12.8% en P frente a 18.7% en CTRL).
- Aumentos estadísticamente significativos en las familias Enterococcaceae (0.4993% en P frente a 0% en CTRL) y Peptostreptococcaceae (0.4781% en P frente a 0.0600% en CTRL).
- Aumentos no estadísticamente significativos en las familias Veillonellaceae (12.1% en P frente a 10.3% en CTRL) y Streptococcaceae (3.6% en CDI frente a 0.7% en CTRL).

En consecuencia, podemos considerar que las diferencias a nivel de familia con respecto al grupo de controles sanos que encontramos de forma común en los grupos CDI y P, son la reducción acentuada en Lachnospiraceae y Ruminococcaceae, y los ligeros aumentos en Enterococcaceae y Peptostreptococcaceae.

Por el contrario, las diferencias más llamativas en el patrón de disbacteriosis a nivel de familia, entre los grupos CDI y P con respecto a controles sanos, son la disminución en Veillonellaceae en CDI y el aumento en P, la disminución en Acidaminococcaceae en P y el aumento en CDI, el aumento más pronunciado en Streptococcaceae en P que en CDI, el aumento en Erysipelotrichaceae en CDI que no encontramos en P y el aumento en Lactobacillaceae en CDI que no encontramos en P.

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

6.3.2.1 Diferencias de composición en los géneros de las familias *Lachnospiraceae* y *Ruminococcaceae* entre los grupos CDI y P con respecto al grupo CTRL.

La acentuada reducción observada en la familia *Ruminococcaceae* en el grupo de pacientes infectados por *C. difficile* es a expensas de los géneros *Faecalibacterium* (3.9% en CDI frente a 11.2% en CTRL), *Ruminococcus 2* (0.1% en CDI frente a 4.5% en CTRL), *Subdoligranulum* (0.3% en CDI frente a 4.1% en CTRL) y *Eubacterium Coprostanoligenes Group* (0.0939% en CDI frente a 1.3705% en CTRL) y *Ruminococcaceae UCG-014* (0.0794% en CDI frente a 1.7% en CTRL), que supondrían más del 70% de la reducción que se observa en esta familia. Respecto a la acentuada reducción en el grupo de sujetos colonizados por *C. difficile* resulta a expensas de los géneros *Faecalibacterium* (0.9% en P frente a 11.2% en CTRL), *Ruminococcus 2* (0.6% en P frente a 4.5% en CTRL), *Subdoligranulum* (0.3% en P frente a 4.1% en CTRL), *Eubacterium Coprostanoligenes Group* (0.2% en P frente a 1.4% en CTRL), *Ruminococcaceae UCG-002* (0.5% en P frente a 1.9% en CTRL) y *Ruminococcaceae UCG-014* (0.0100% en P frente a 1.7% en CTRL), que supondrían casi toda la reducción que se observa en esta familia. Por tanto, la diferencia más llamativa que encontramos en ambos grupos CDI y P es la disminución más pronunciada en P que en CDI en el género *Faecalibacterium*, mientras que en el resto de los géneros consideramos similitudes.

Con respecto a la pronunciada reducción que se observa en la familia *Lachnospiraceae* en el grupo CDI resulta a expensas de los géneros *Agathobacter* (0.0374% en CDI frente a 6.3% en CTRL), *Roseburia* (0.1% en CDI frente a 2.7% en CTRL) y *Lachnospiraceae NK4A136* (0.1% en CDI frente a 1.5% en CTRL), que supondrían la práctica totalidad de la reducción que se observa en esta familia. No obstante, también se observan aumentos en los géneros *Ruminococcus Gnavus Group* (3.2% en CDI frente a 0.7% en CTRL) y *Lachnoclostridium* (3.2% en CDI frente a 0.3% en CTRL). En el grupo de individuos colonizados también se observan disminuciones en los géneros *Agathobacter* (0.1% en P frente a 6.3% en CTRL), *Roseburia* (0.1% en CDI frente a 2.7% en CTRL) y *Lachnospiraceae NK4A136* (0.3% en CDI frente a 1.5% en CTRL), y los aumentos en *Ruminococcus Gnavus Group* (5.3% en P frente a 0.7% en CTRL) y *Lachnoclostridium* (0.8% en P frente a 0.3% en CTRL) y a parte se observa un aumento en *Blautia* (1.5% en P frente a

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

0.7% en CTRL) que no se observa en CDI (0.5904% en CDI frente a 0.6994% en CTRL). Por consiguiente, las diferencias más notables en el patrón de disbacteriosis que encontramos entre los grupos CDI y P con respecto a los controles sanos dentro de los géneros de la familia Lachnospiraceae resultarían el aumento más pronunciado de *Ruminococcus Gnavus Group* en P que en CDI, el aumento más pronunciado de *Lachnoclostridium* en CDI que en P y la ligera dismunción de *Blautia* en CDI con respecto al moderado aumento en P. Además, destacamos que el aumento observado en *Ruminococcus Torques Group* en ambos grupos con respecto a CTRL es ligeramente más pronunciado en P (1.8731% y 1.1256% en P y CDI frente a 0.915% en CTRL).

La depleción de las familias Lachnospiraceae y Ruminococcaceae es un hallazgo común en pacientes con CDI (Antharam, 2013; Milani, 2016; Gu, 2016). En estudios de cohortes de comparación de la microbiota intestinal de pacientes con CDI (Grupo CDI), pacientes con diarrea nosocomial no debida a *C. difficile* (Grupo CDN) y controles sanos se ha observado la reducción en ambas familias en los grupos CDN y CDI respecto a los controles sanos. Los géneros característicos asociados a estas reducciones fueron *Blautia*, *Roseburia*, *Subdoligranulum*, *Ruminococcus*, *Dorea* y *Coproccoccus* (Antharam, 2013). En el trabajo de Milani y col. donde se compararon cohortes de pacientes con CDI, con administración antibiótica previa sin CDI (Grupo AB+) y sin administración antibiótica ni CDI (Grupo AB-), también se observó una franca reducción de la familia Lachnospiraceae y el género *Faecalibacterium* en los pacientes con CDI con respecto al grupo AB-. Al aplicar un modelo estadístico ajustado a sexo y edad, y a variables clínicas, se sumaron como predictores de CDI la disminución de Ruminococcaceae y *Subdoligranulum* (Milani, 2016). Lee y col. mediante un estudio prospectivo en pacientes receptores de trasplante de médula ósea que desarrollaron CDI encontraron que el *phylum* Bacteroidetes y las familias Lachnospiraceae y Ruminococcaceae, de forma conjunta y no independiente, estuvieron significativamente correlacionados con protección frente a CDI (Lee, 2017). Gu y col. en un trabajo similar al de Antharam en 2013 pero realizado en población china, también observaron reducciones en Lachnospiraceae a expensas de los géneros *Blautia*, *Lachnospira incertae sedis*, *Roseburia* y *Dorea*, y en

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

Ruminococcaceae a expensas de los géneros *Faecalibacterium*, *Ruminococcus* y *Oscillospira* (Gu, 2016).

Los estudios donde se ha pretendido evaluar diferencias de composición en la microbiota intestinal en pacientes con CDI sometidos a FMT, también nos han aportado evidencias acerca de que la pérdida de géneros de las familias Lachnospiraceae y Ruminococcaceae es un hallazgo que caracteriza a la microbiota intestinal de estos individuos (Weingarden, 2014; Shahinas, 2012; Brown, 2018). La expansión de estas familias que se ha evidenciado en las muestras “post FMT” ha puesto de manifiesto su importancia en la elevada tasa de éxito del FMT como terapia no convencional a la infección por *C. difficile*. En el trabajo de Shahinas y col. se observó que de forma fehaciente se produce una expansión posterior al FMT de géneros como *Faecalibacterium* y *Roseburia* (Shahinas, 2012). Brown y col. hallaron que *Faecalibacterium* era un género que significativamente estaba disminuido en los pacientes con CDI al comparar la composición de la microbiota intestinal con la de los donantes de heces (Brown, 2018).

Aunque más adelante entraremos en detalle en la importancia del metabolismo intestinal de los ácidos biliares y la producción de AGCC en la patogénesis de la CDI, los mecanismos intrínsecos al éxito del FMT nos han demostrado la importancia de la depleción de las familias Lachnospiraceae y Ruminococcaceae en los pacientes con CDI. Esto genera que los pacientes con CDI tengan una composición intestinal alterada de los ácidos biliares. Esto se traduce en un descenso en el metabolismo de los ácidos biliares primarios germinantes de las esporas de *C. difficile*, y en una rápida absorción de los ácidos biliares secundarios inhibidores, produciendo un desequilibrio entre los procesos de inhibición y germinación (Sorg, 2010). Las muestras “pre FMT” presentan niveles más elevados de ácidos biliares primarios, mientras que las muestras “post FMT” contienen predominantemente ácidos biliares secundarios, de forma similar a los donantes, y esto se acompaña de la depleción de las familias Lachnospiraceae y Ruminococcaceae en el primer caso y su expansión y recuperación en el segundo. (Weingarden, 2014). La microbiota intestinal aporta los enzimas BSH y BaiCD que metabolizan los ácidos biliares primarios germinantes. BSH hidroliza los ácidos

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

biliares conjugados en ácidos biliares libres. BaiCD es capaz de transformar los ácidos biliares primarios en secundarios. Las bacterias cuyo genoma codifique estos enzimas producirían un efecto inhibitorio sobre la germinación de las esporas de *C. difficile*. Perder estos grupos supone, por consiguiente, una pérdida de la resistencia a la colonización y germinación. Buffie y col. en un estudio donde compararon la microbiota intestinal de 12 individuos portadores asintomáticos y 12 pacientes con CDI, mediante posteriores análisis metabolómicos y aplicando modelos matemáticos, hallaron 11 grupos de bacterias que correlacionaron potentemente con una resistencia a la infección. Estos géneros y especies estaban incluidos mayoritariamente en el cluster *Clostridium XIVa*, es decir en la familia Ruminococcaceae, incluyendo *Clostridium scidens*, donde se encontró la correlación más potente. *Clostridium scidens* sintetiza el enzima BaiCD, muy poco común. Se formuló por primera vez la hipótesis por la cual esta vía metabólica tan rara era la que conferiría esta capacidad de resistencia a la infección (Buffie, 2015). Por consiguiente, la pérdida de estas familias supone una franca pérdida de este mecanismo clave de resistencia a la colonización, y es por lo que uno de los mecanismos de éxito del FMT es la recuperación de estas pérdidas, alcanzando unos niveles similares a los de los donantes. No obstante, y como veremos más adelante en detalle, los géneros que aportan el enzima BaiCD son muy escasos, siendo este hecho un potencial marcador que nos distinga, al menos en parte, la microbiota intestinal de los pacientes con infección por CDI y de los individuos colonizados por *C. difficile* que no desarrollan clínica. Por otra parte, otro mecanismo clave, relacionado con la depleción de las familias Lachnospiraceae y Ruminococcaceae en las muestras de pacientes con CDI, que se pone de manifiesto al producirse la recuperación de estas familias mediante FMT, es el de la síntesis de AGCC a partir de carbohidratos no digeribles de la dieta principalmente. Como ya hemos introducidos en el apartado “6.3.1.1. Diferencias a nivel de phylum entre los grupos CDI y CTRL”, los clostridiales incluyen a las principales familias productoras de AGCC, en especial de butirato. Estas familias son principalmente Lachnospiraceae y Ruminococcaceae (Antharam, 2013). Como ya hemos dicho son la principal fuente de energía de los colonocitos, provocando de forma directa una disminución de la carga osmótica en la luz intestinal al reducir los carbohidratos no digeribles. Al ser los principales aniones en el intestino grueso y provocar la caída del pH desde el íleo hasta el colon proximal, actúan impidiendo

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

la proliferación de patógenos oportunistas e inactivando enzimas microbianos. Sus consecuencias más importantes son las relativas a su capacidad de regular la secreción de citocinas proinflamatorias en diferentes células inmunes intestinales mediante diferentes mecanismos, generando efectos antiinflamatorios. Incluso presentan influencia sobre los linfocitos T reguladores, que a su vez disminuyen los linfocitos Th17, cuya activación estimula la granulopoyesis y el reclutamiento de neutrófilos en el lugar de la infección (Buonomo, 2016). Por tanto, la depleción de las familias Lachnospiraceae y Ruminococcaceae en las muestras “pre FMT” con CDI tiene influencia sobre la reactividad de las células inmunes intestinales, contribuyendo a la severidad de la CDI. Asimismo, la recuperación de estas familias con el FMT pone en liza la importancia de este mecanismo patogénico en la CDI.

Nuestros resultados al respecto de la disminución de las familias Lachnospiraceae y Ruminococcaceae en los pacientes con CDI concuerdan con lo hallado en los estudios anteriores mencionados. Al respecto de los géneros a expensas de los cuales se produce las disminuciones de estas familias aparece mayor variabilidad. Ya entraremos más en detalle en los géneros destacables, pero esto puede ser debido a que la microbiota intestinal conforma un ecosistema dinámico con funciones fisiológicas, metabólicas, inmunológicas y de protección frente a patógenos, que es estable en base a que existe un grado de redundancia funcional de sus miembros, es decir, hablamos de la existencia de un *core* funcional. Por tanto, la disminución relativa en los géneros de estas familias mayoritarias comparada con cohortes de individuos de referencia puede ser variable, ya que unos cuantos géneros ejercerían las mismas funciones. No obstante, en los estudios anteriores aparecen disminuciones en géneros que aparecen en el nuestro como *Faecalibacterium*, *Subdoligranulum*, *Roseburia* y *Blautia*.

En los escasos estudios anteriores que han comparado la microbiota intestinal en pacientes con CDI frente a portadores asintomáticos o individuos colonizados por *C. difficile* nos encontramos que las depleciones en las familias Lachnospiraceae y Ruminococcaceae se produce en ambos grupos de sujetos (Zhang, 2015; Han, 2019). En el trabajo de Zhang y col. destacó la depleción de géneros productores de butirato de ambas familias como *Faecalibacterium* y

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

Ruminococcus (Ruminococcaceae) y *Roseburia* y *Coprococcus* (Lachnospiraceae) en los grupos de pacientes con CDI y portadores asintomáticos de origen hospitalario, sin diferencias significativas entre ambos grupos (Zhang, 2015). Han y col observaron que disminuciones en ambas familias Lachnospiraceae y Ruminococcaceae en pacientes con CDI y portadores asintomáticos, algo más pronunciada en CDI, pero sin diferencias significativas entre ambos grupos. Esto se traduce en disminuciones de géneros butirogénicos como *Lachnospira*, *Odirobacter*, *Coprococcus* y *Anaerostipes* (Han, 2019). En el trabajo de Dong y col. donde realizaron un cribado poblacional de colonización asintomática de *C. difficile* en población china y encontraron 12 portadores asintomáticos, se observó en este grupo una disminución estadísticamente significativa de los géneros butirogénicos *Roseburia* y *Faecalibacterium* (Dong, 2018)

Nuestros resultados, al respecto de las familias Lachnospiraceae y Ruminococcaceae, coinciden de forma general con todos estos estudios. Nuestros resultados muestran que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos CDI y P, tanto a nivel de las familias Lachnospiraceae y Ruminococcaceae como de los géneros que los componen, aunque se producen variaciones no significativas que nos va a permitir describir una tendencia, que suponemos con un mayor tamaño muestral se confirmaría. Encontramos disminuciones en los géneros *Faecalibacterium*, *Ruminococcus 2*, *Subdoligranulum*, *Agathobacter*, *Roseburia* en ambos grupos CDI y P. Todos estos géneros son grandes productores de butirato. Las bacterias butirogénicas conforman un grupo funcional y se agrupan principalmente, como dijimos, en la clase Clostridia del *phylum* Firmicutes, *clusters* IV y XIVa, aunque realmente es una característica ampliamente distribuida en las bacterias gram positivas anaerobias estrictas componentes de la microbiota intestinal (Louis, 2009). La primera conclusión que podemos extraer es que tanto en pacientes con CDI como en individuos colonizados por *C. difficile* se ha establecido una microbiota intestinal con la capacidad para sintetizar butirato muy disminuida. Las consecuencias debido a esto es que también debe existir un ambiente intestinal proinflamatorio en los individuos colonizados, aunque este hecho no debe ser suficiente por si solo para distinguir infección y colonización. De hecho, los estudios al respecto de la relación entre los AGCC y la patogénesis de la CDI arrojan resultados confusos,

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

aunque la depleción de los grupos butirogénicos componentes de la microbiota intestinal ha sido confirmado por múltiples estudios (Antharam, 2013), incluido el nuestro. Asimismo, los AGCC parecen correlacionar con la resistencia a la colonización frente a *C. difficile* en ciertos casos en modelos murinos (Theriot, 2014). No obstante, en el estudio de Reeves y col. se observó una recuperación parcial de la resistencia a la colonización en ratones *germ free* colonizados con Lachnospiraceae, pero no así con *Escherichia coli*, y no se encontró en el primer caso asociación entre la producción de los AGCC y el nivel de colonización de *C. difficile* (Reeves, 2012). Por tanto, la relación causal entre la patogénesis de la CDI y la producción intestinal de AGCC no está esclarecida del todo, y nuestros resultados apuntan a que este mecanismo por sí solo no es esencial ni discriminatorio de infección y colonización. De hecho, la depleción de las familias Lachnospiraceae y Ruminococcaceae también se ha encontrado en cohortes de pacientes con diarrea nosocomial no debida a *C. difficile* (Antharam, 2013; Schubert, 2014).

Otro de los mecanismos de resistencia a la colonización que se ve transgredido en la disbacteriosis que encontramos en los pacientes con CDI es el relacionado con el metabolismo de los ácidos biliares. Los ácidos biliares primarios son los compuestos que promueven la germinación de las esporas de *C. difficile* y su transformación en la forma vegetativa que es capaz de producir las toxinas TcdA y TcdB causantes de la clínica. Por consiguiente, su presencia en el tracto intestinal juega un papel clave en su colonización y patogénesis de *C. difficile*. Los ácidos biliares derivan del colesterol y son sintetizados en el hígado. Los ácidos biliares primarios son el ácido cólico y quenodesoxicólico, que después son conjugados con los aminoácidos taurina o glicina. Son secretados en el duodeno en respuesta a la ingesta y la mayor parte (95%) son reabsorbidos en el íleo terminal y devueltos al hígado mediante la circulación enterohepática. Los ácidos biliares primarios que llegan al intestino grueso (5%), son biotransformados en ácidos biliares secundarios mediante enzimas secretados por la microbiota intestinal de forma específica, interviniendo dos tipos de reacciones, desconjugación y deshidroxilación. Los ácidos biliares secundarios más abundantes son el ácido desoxicólico, litocólico y ursodesoxicólico. En individuos sanos con una microbiota intestinal rica y diversa, los ácidos biliares primarios

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

germinantes, son rápidamente desconjugados por ciertos grupos de bacterias, reduciendo su abundancia relativa y la probabilidad de germinación de las esporas de *C. difficile* (Sarker, 2012). Los ácidos biliares secundarios inhiben también el crecimiento, actividad y cantidad de las toxinas causantes de la clínica (Thanissery, 2017). Como en los procesos de germinación y esporulación, el proceso inhibitorio es variable en función de la cepa causal.

En el trabajo de Weingarden y col. donde se estudió la restauración de la microbiota intestinal en pacientes con CDI sometidos a FMT, se evidenció que la composición y cantidad de ácidos biliares es totalmente diferente en ambas situaciones. La presencia de una carga elevada de ácidos biliares primarios en pacientes con CDI de forma previa al FMT sugirió su hidrólisis incompleta (Weingarden, 2014). Por otro lado, los ácidos biliares secundarios estuvieron muy disminuidos de forma posterior al FMT, enlazando la recuperación de la microbiota intestinal con el equilibrio del metabolismo de los ácidos biliares. Asimismo, en modelos murinos la administración de antibióticos y la posterior colonización de *C. difficile* ha estado asociado a alteraciones en el perfil normal de los ácidos biliares intestinales, concretamente con una disminución de ácidos biliares secundarios y un aumento de ácidos biliares primarios (Theriot, 2014).

La microbiota intestinal aporta el enzima BaiCD (*Bile-acid 7 α -dehydroxylase*) que transforma los ácidos biliares primarios en secundarios, no obstante, esta capacidad está limitada a un grupo muy reducido de bacterias. Las bacterias cuyo genoma codifique estos enzimas producirían un efecto inhibitorio sobre la germinación de las esporas de *C. difficile*. Perder estos grupos supondría una pérdida de este mecanismo de resistencia a la colonización.

Buffie y col. en un trabajo donde pretendían diferenciar los miembros de la microbiota intestinal más influyentes en la resistencia a la colonización, encontraron varios grupos de bacterias que correlacionaron de forma negativa con la CDI, tanto en un modelo animal como humano. Los grupos encontrados constituyeron el 6% de la microbiota intestinal normal y principalmente estuvieron comprendidos en el *cluster Clostridium XIVa* de los clostridiales, por tanto, en la familia Lachnospiraceae, incluyendo *C. Scindens*, donde se encontró la

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

correlación negativa más potente. *C. Scindens* presenta una actividad BaiCD 10 veces más potente que otros clostridiales, de ahí su particular importancia. Se formuló por primera vez la hipótesis de si esta vía metabólica tan rara era la que confería esta capacidad de resistencia a la infección o por lo menos de si su importancia era preponderante (Buffie, 2015). También aparecieron bacterias del género *Blautia*, *Eubacterium* o *Pseudoflavonifractor*, siendo relevantes a este respecto. En otro trabajo reciente, Solbach y col. cuantificaron el *BaiCD gen cluster*, como medida de los niveles de bacterias intestinales con actividad BaiCD y encontraron una potente correlación negativa con la CDI (Solbach, 2018). Kang y col. mediante un estudio *in vitro*, añadieron a este hecho que las bacterias con actividad BaiCD, además son capaces de secretar antibióticos derivados del triptófano con actividad frente a *C. difficile*, en respuesta a los ácidos biliares secundarios (Kang, 2019). Daquigan y col reexaminaron secuencias del gen ADNr 16S mediante un método de alta resolución y corroboraron la importancia de *C. Scindens* en la resistencia a la colonización de *C. difficile* y de muchos miembros del género *Blautia* (Daquigan, 2017).

El género *Clostridium* es filogenéticamente muy complejo y continuamente se van reasignando especies a géneros de nueva creación (Yutin, 2013). Muchas de las especies con actividad BaiCD se incluyen en el *cluster Clostridium XIVa*, muy relacionadas unas con otras (Ridlon, 2016) que comprende principalmente a la familia Lachnospiraceae (Collins, 1994). *C. Scindens* se engloba dentro del género *Lachnoclostridium* y aunque observamos un aumento en el grupo CDI con respecto a los grupos P y CTRL (3.2% en CDI frente a 0.8% en P y 0.3% en CTRL), mediante la secuenciación del gen ADNr 16S se logra diferenciar que *C. Scindens* es ligeramente mayor en el grupo de individuos colonizados que en pacientes con CDI (0.0204% en CDI frente a 0.0744% en P, $p=0.3375$), remarcando la importancia de este minoritario grupo en la inhibición de un microambiente intestinal propicio para la germinación de las esporas de *C. difficile* que se amortigua en los individuos colonizados. Respecto al género *Blautia*, que también ha sido destacado en trabajos anteriores como un grupo de bacterias con actividad BaiCD (Buffie, 2015; Daquigan, 2017) se conserva de igual forma en el grupo P en mayor abundancia que en el grupo CDI (1.5385% en P frente a 0.5904% en CDI), llegando a la misma conclusión. El género *Eubacterium* se sitúa en en difentes familias, por

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

las razones antes esgrimidas sobre la continua reorganización de los clostridiales. En la familia Lachnospiraceae se han situado varios grupos como *Eubacterium ventriosum* Group, *Eubacterium eligens* Group, *Eubacterium xylanophilum* Group, *Eubacterium ruminantium* Group, *Eubacterium fissicatena* Group, *Eubacterium hallii* Group y *Eubacterium oxidoreducens* Group. Todos estos grupos se encuentran en muy escasa abundancia en el grupo de controles sanos y se observa una práctica erradicación en los pacientes con CDI y una mínima conservación en los sujetos colonizados. En *Eubacterium coprostanoligenes* Group de la familia Ruminococcaceae se observa la misma tendencia. Todos estos resultados nos confirman que la relación entre el metabolismo de los ácidos biliares por parte miembros de la microbiota intestinal y su relación con la patogénesis de la CDI es un mecanismo esencial, y el abordaje del presente estudio mediante un grupo de pacientes con CDI y un grupo de individuos colonizados de *C. difficile* así lo muestra. No obstante, es sugerible que en un futuro recurramos a una combinación de estudios metabolómicos, de genómica funcional y de metagenómica, junto al estudio del gen ADNr 16S para consolidar esta evidencia, ya que este por si solo es insuficiente. Es posible que desconozcamos el total de miembros de la microbiota intestinal con actividad BaiCD, además ya hemos visto que existen grupos con alta y con baja actividad BaiCD (Doerner, 1997).

El género *Ruminococcus Gnavus* Group está aumentado tanto en el grupo de pacientes con CDI como en los individuos colonizados (3.2% en CDI y 5.3% en P frente a 0.7% en CTRL). Con respecto al aumento observado en *Ruminococcus Torques* Group en ambos grupos con respecto a CTRL, resulta ligeramente más pronunciado en P (1.8731% y 1.1256% en CDI y P frente a 0.915% en CTRL). Ambos géneros, a diferencia de otros miembros del *cluster Clostridium XIVa* no son productores de butirato (Dethlefsen, 2006), y son considerados especialistas degradadores de mucina (Sicard, 2017). La capa mucosa intestinal se compone principalmente de esta mucina, la cual está compuesta por complejos aglomerados de glicoproteínas con glicanos O-ligados y es producida por las células intestinales (*goblet cells*). Además, se ha visto que *Ruminococcus Gnavus* presenta *in vitro* actividad β -glucuronidasa, con lo que puede inducir la formación de componentes tóxicos en el colon y causar o perpetuar la inflamación local (Beaud, 2005). De hecho, se ha evidenciado incrementos de su abundancia en la

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

microbiota intestinal de pacientes con enfermedad de Crohn (Joossens, 2011) y este hallazgo se ha asociado a los mecanismos mencionados y a las propiedades descritas. Por consiguiente, estos géneros dotarían de una ventaja selectiva para la colonización de patógenos oportunistas como *C. difficile*. En el presente estudio se observa el aumento tanto en pacientes con CDI como en individuos colonizados por *C. difficile*, aunque podemos decir la tendencia es mayor en los individuos colonizados, aunque no de forma significativa. Por tanto, este mecanismo es común a ambos grupos de estudio y no es discriminador de ninguno de ellos, pero coadyuva a la disbacteriosis generada en ambas cohortes de sujetos. Este hallazgo no ha sido documentado en la bibliografía revisada al respecto de la disbacteriosis asociada a la presencia de *C. difficile*, pero si en otras situaciones como la enfermedad de Crohn (Joossens, 2011).

6.3.2.2 Diferencias de composición en los géneros de la familia Veillonellaceae entre los grupos CDI y P con respecto al grupo CTRL.

En los pacientes con CDI se produce una disminución en la familia Veillonellaceae que en el grupo de controles sanos se compone mayoritariamente de los géneros *Megasphaera* y *Dialister* y en menor medida de *Megamonas*. En el grupo CDI se observa una práctica erradicación de estos géneros y una expansión de *Veillonella* (2.9121% en CDI frente a 0.0824% en CTRL), que aparece de forma muy minoritaria en el grupo CTRL. En los individuos colonizados por *C. difficile* se produce un ligero aumento en esta familia con respecto a los controles. No obstante, se observa una pérdida de *Megasphaera* muy pronunciada, aunque sin llegar a la erradicación que observamos en el grupo CDI, y un aumento de *Veillonella* ligeramente superior al producido en el grupo CDI (4.5646% en CDI frente a 0.0824% en CTRL). *Dialister* se conserva en el grupo P, llegando incluso a aumentar levemente respecto a CTRL (6.0% en P frente a 5.1% en CTRL). *Megamonas*, al igual que en grupo CDI, padece una total erradicación en el grupo P. Por consiguiente, la principal diferencia en ambos grupos CDI y P, es la conservación del género *Dialister* y una mayor expansión de *Veillonella* en P respecto a CDI. Ambas cohortes presentan en común la práctica erradicación de *Megasphaera* y *Megamonas*.

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

La familia Veillonellaceae se compone de bacterias Gram negativas, anaerobias estrictas, no formadoras de esporas y de morfología diversa. El género tipo de la familia es *Veillonella*. *Veillonella* cumple estas características. Muchas cepas de este género no fermentan los carbohidratos y sus mayores productos metabólicos son el acetato y el propionato, por tanto, no se trata de un grupo butirogénico. Forman parte de la microbiota oral, genitourinaria, respiratoria e intestinal y pueden producir infecciones severas como bacteriemia, meningitis, osteomielitis y endocarditis. El principal factor de virulencia asociado a su potencial patogenicidad es que su lipopolisacárido bacteriano es muy endotóxico. Asimismo, se ha observado que también tiene capacidad para reducir la actividad microbiana de los neutrófilos. *Dialister* es otro género no butirogénico. Es un miembro importante de la microbiota oral puesto que ha sido identificado en variadas infecciones orales. También ha sido identificado en hemocultivos y abscesos. *Megasphaera* presenta como metabolitos finales acetato, propionato, valerato y butirato. También, como los géneros anteriores, se ha aislado en muestras clínicas (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2012).

En el reciente trabajo de Han donde se estudió la microbiota intestinal de 58 pacientes con CDI, 21 portadores asintomáticos y 20 controles, se observó una disminución de la familia Veillonellaceae en ambos grupos donde se detectó presencia de *C. difficile* en heces, aunque sin diferencias significativas. Asimismo, ambos grupos presentaron de forma significativa niveles más elevados de *Veillonella* y más disminuidos de *Dialister*, con respecto a los controles sanos (Han, 2019). En el estudio de Weingarden, en pacientes con CDI sometidos con éxito a FMT para su curación, se observó que Veillonellaceae presentó mayores niveles en las muestras "pre FMT" para después disminuir en las "post FMT", sugiriendo este hallazgo que no se trata de una familia beneficiosa, o por lo menos sus géneros mayoritarios (Weingarden, 2014). Antharam y col. observaron que en cohortes de pacientes con CDI y en pacientes con diarrea nosocomial no debida a *C. difficile* se producían aumentos del género *Veillonella* con respecto a los controles sanos (Antharam, 2013). Milani y col. también observaron que en cohortes de pacientes con CDI se producían aumentos de los niveles de *Veillonella* con respecto a un grupo de individuos que no habían recibido administración antibiótica previa. Los autores consideran a *Veillonella* como un patógeno

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

oportunistas que se expanden debido a la simplificación de la microbiota intestinal, y la aparición de nuevos nichos ecológicos disponibles en pacientes con CDI. En *Megasphaera* y *Dialister* no se observan diferencias en ambos grupos, siendo prácticamente indetectables (Milani, 2016).

En nuestro estudio, la expansión de un género potencialmente patógeno oportunista como *Veillonella* observada en ambos grupos CDI y P es un hallazgo que explicamos de forma similar a la de Milani y col., entendiendo que se produce debido a la pérdida de mecanismo de competitividad de nutrientes y de ocupación de nuevos nichos ecológicos. Además, sus potenciales efectos debido a la presencia de un lipopolisacárido bacteriano muy tóxico, podría añadir severidad a la clínica de la CDI. No obstante, el hecho que este hallazgo también se produzca en el grupo de individuos colonizados, incluso a mayores niveles, nos indica que no se trata de un grupo demasiado importante ni discriminatorio. Por otra parte, la erradicación de *Dialister* en el grupo de pacientes con CDI y el ligero aumento en los individuos colonizados, lo colocaría como potencial biomarcador que intervendría en la no transición desde un estado de colonización a un estado de infección. No obstante, este hallazgo no concuerda con trabajos anteriores. Excepto en el trabajo de Han y col., donde se observa una disminución de los niveles de *Dialister* en individuos portadores y enfermos, ningún trabajo acerca de la microbiota intestinal y su relación con la patogénesis de la CDI destaca su importancia, por consiguiente, resulta difícil establecer un mecanismo. Se trata de un género no butirógeno y ha sido aislado en cultivos microbiológicos patológicos, además no se le reconocen efectos beneficiosos. Recientemente, en un estudio que ha tenido gran repercusión y de gran potencia estadística, se ha relacionado su disminución, junto a *Coprococcus*, con la depresión y la ansiedad, y ha sido propuesto como psicobiótico (Valles-Colomer, 2019). El mecanismo de este potencial efecto beneficioso en este trastorno es desconocido.

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

6.3.2.3 Diferencias de composición en los géneros de la familia Acidaminococcaceae entre los grupos CDI y P con respecto al grupo CTRL.

En el grupo de pacientes con CDI se observa un aumento de la familia Acidaminococcaceae con respecto a los controles sanos (3.5% en CDI frente a 2.2% en CTRL). Este incremento es debido al aumento en los géneros *Phascolarctobacterium* (2.7% en CDI frente a 2.2% en CTRL) y *Acidaminococcus* (0.7410% en CDI frente a 0.0614% en CTRL). Por otro lado, en el grupo de individuos colonizados por *C. difficile* se observa una reducción de la familia Acidaminococcaceae con respecto a los controles sanos (0.5% en P frente a 2.2% en CTRL). La reducción es debida a la disminución del género *Phascolarctobacterium* (0.5% en P frente a 2.2% en CTRL) y a la erradicación completa de *Acidaminococcus* (0% en P frente a 0.0614% en CTRL).

Zhang y col. observaron tanto en 8 pacientes con CDI como en 8 portadores asintomáticos de *C. difficile* que el género *Phascolarctobacterium* estaba reducido en ambos grupos con respecto a los controles sanos (Zhang, 2015). Asimismo, Han y col. observaron el mismo hallazgo en 21 individuos colonizados y 58 pacientes con CDI (Han, 2019).

El género *Phascolarctobacterium* de la familia Acidaminococcaceae está compuesto por bacterias Gram negativas, anaerobias estrictas y no formadoras de esporas. El propionato y el acetato son los principales metabolitos producidos mediante la fermentación del succinato. Se ha visto que *Phascolarctobacterium* incrementa su abundancia como miembro de la microbiota intestinal tras la administración de berberina y metformina, fármacos para reducir los niveles de glucosa en sangre. Esto retralmenta los efectos beneficiosos de estos fármacos (Zhang X, 2015). Otros estudios también han propuesto al género *Phascolarctobacterium* como un grupo beneficioso de mecanismo desconocido (Wu, 2017). Se ha evidenciado que puede ser un componente bastante usual de la microbiota normal en edad adulta, produciéndose una erradicación o disminución en niños menores de un año y en mayores de 60 años, que son los periodos donde se produce la mayor tasa de enfermedad digestiva o metabólica y estos sendos hallazgos han sido interconectados (Wu, 2017).

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

Por lo tanto, se considera al género *Phascolarctobacterium* como beneficioso para la salud por mecanismos no esclarecidos. Su papel en la microbiota intestinal en el contexto de una CDI, según los trabajos anteriores comentados (Han, 2019; Zhang, 2015), también nos sugeriría que es un potencial grupo beneficioso cuyos niveles suelen disminuir y este hecho facilitaría la infección por *C. difficile*. No obstante, este hallazgo también se produce en los portadores asintomáticos de *C. difficile*, por tanto, a priori, no parece ser un género que nos discrimine y caracterize ambas cohortes. Nuestros datos muestran que el género *Phascolarctobacterium* esta reducido en el grupo de individuos colonizados por *C. difficile* con respecto a los controles sanos, pero aumentado en el grupo de pacientes con CDI, no concordando del todo con los datos observados en otros trabajos. Podemos suponer que no se trata de un género clave en la patogénesis de la CDI, aunque presente efectos beneficiosos y que no permite discriminar la microbiota de ambos grupos CDI y P. Simplemente podemos afirmar que la perdida de este género agrava la disbacteriosis de los individuos colonizados por *C. difficile*.

El género *Acidaminococcus* esta formado por cocos Gram negativos, anaerobios estrictos y no formadores de esporas. Un aspecto importante es que presenta lipopolisacárido bacteriano, por tanto, posee poder patógeno. Puede utilizar el aminoácido glutamato como única fuente de energía, mediante una vía metabólica minoritaria dentro de los clostridiales, la vía (R)-2-hidroxi-glutarato en la cual intervienen enzimas poco usuales como la 2-hidroxi-glutarato deshidrogenasa, glutaconato CoA-transferasa, 2-hidroxi-glutaril CoA-deshidratasa y glutaconil CoA- descarboxilasa. Todos estos enzimas son sintetizados por el género *Acidaminococcus*. Gough y col. evidenciaron que la perdida de diversidad junto a un aumento de los niveles de *Acidaminococcus* se relacionaba con un futuro menor crecimiento en niños de bajos recursos. La explicación que los autores dieron al respecto se relacionaba con el hecho por el cual el género *Acidaminococcus* fermenta el aminoácido glutamato, ya que este dato provoca un efecto deletéreo en el crecimiento de estos niños, debido a la importancia del glutamato en el metabolismo de los aminoácidos, balance de nitrógeno y en funciones de barrera intestinal. Este hallazgo podría reflejar el estado de

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

malnutrición de estos niños, puesto que su microbiota intestinal se focaliza en utilizar como fuente de energía las proteínas (Gough, 2015).

6.3.2.4 Diferencias de composición en los géneros de la familia *Streptococcaceae* entre los grupos CDI y P con respecto al grupo CTRL.

En el grupo de pacientes con CDI se observa un aumento de la familia *Streptococcaceae* con respecto a los controles sanos (2.3% en CDI frente a 0.7% en CTRL). Este incremento es debido en exclusiva a expensas del género *Streptococcus*. Por otro lado, en el grupo de individuos colonizados por *C. difficile* se observa un aumento más pronunciado (3.5% en P frente a 0.7% en CTRL), también a expensas de dicho género. La diferencia entre los grupos CDI y P no es estadísticamente significativa.

Los trabajos de comparación de microbiota intestinal de pacientes con CDI frente a controles sanos, frente a individuos colonizados por *C. difficile* o en estudios donde se ha comparado esta en pacientes con CDI antes y después a un FMT, han arrojado resultados discrepantes y apenas se han puesto en valor en la discusión de estos. Gu y col. observaron en un grupo de pacientes con CDI con respecto a controles sanos un aumento estadísticamente significativo de las bacterias productoras de ácido láctico, a las cuales pertenece el género *Streptococcus* (Gu, 2016). Estos autores consideran a este género como patógeno oportunista común que se expande cuando la microbiota intestinal es alterada por antibióticos. Además, considera que la disminución de grupos butirógenicos, el aumento de grupos productores de ácido láctico y la expansión de patógenos oportunistas constituye un patrón de disbiosis que podría incrementar la susceptibilidad al desarrollo de CDI. Por otra parte, en el trabajo de Antharam y col. se objetivó que el género *Streptococcus* estaba característica y significativamente disminuido en grupos de pacientes con CDI y con diarrea nosocomial no debida a *C. difficile* (Antharam, 2013). Schubert y col. encontraron que en pacientes con diarrea nosocomial no debida a *C. difficile* había mayor probabilidad de que el género *Streptococcus* presentara una mayor abundancia, no así en pacientes con CDI (Schubert, 2014). En trabajos como los de Shahinas y col. y Brown y col. donde se ha estudiado la microbiota intestinal en pacientes con

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

CDI antes y después de un FMT se evidenció que *Streptococcus* estaba presente en las muestras “pre FMT”, por tanto, de pacientes con CDI franca, pero que caía drásticamente en las muestras “post FMT” para aproximarse a los niveles que se encuentran en los donantes de heces (Shahinas, 2012; Brown, 2018). En trabajos de comparación de microbiota en pacientes con CDI y portadores asintomáticos de *C. difficile* se ha encontrado que *Streptococcus* estuvo ligeramente en mayores cantidades en los portadores asintomáticos que en el grupo de pacientes con CDI y el de controles sanos (Zhang, 2015). También en el similar trabajo de Han y col. se encontró que existían ligeras disminuciones en ambos grupos de infectados y colonizados por *C. difficile* sin diferencias estadísticamente significativas. Por consiguiente, la bibliografía al respecto de este género nos lanza resultados dispares, sugiriendo este hecho que la importancia en cuanto a su relación con la patogénesis de la CDI podría ser menor.

El género *Streptococcus*, junto a otros géneros como *Lactobacillus* o *Enterococcus*, pertenece a las llamadas *Lactic Acid Bacteria* (LAB). *Streptococcus* está compuesto por cocos Gram positivos, no formadores de esporas, anaerobios facultativos, aunque algunas especies requieren CO₂ para su crecimiento. No poseen enzimas como la peroxidasa o catalasa, de manera que para tolerar el oxígeno recurre a metales como el selenio, manganeso o zinc. Durante su evolución natural este género no adquirió la capacidad de sintetizar el grupo hemo que es un componente esencial de los citocromos respiratorios, por tanto, solo puede realizar un metabolismo respiratorio mediante la suplementación exógena de hemo que obtiene de la hemoglobina del hospedador por medio de la hemolisina. Debido a esto, recurre a una fermentación homoláctica para obtener energía, de manera que produce ácido láctico a través de la ruta glucolítica anaeróbica de Embden-Mayeroff a partir de diferentes monosacáridos hexosas. Por otra parte, los disacáridos son hidrolizados en monosacáridos en el exterior celular o bien son internalizados e hidrolizados en el interior celular (Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology, 2012).

Se ha evidenciado en estudios *in vitro* que el ácido láctico reduce los niveles de las toxinas TcdA y TcdB de *C. difficile* de forma dosis dependiente y de forma independiente a la carga bacteriana (Kolling, 2012). En el mismo estudio

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

también se objetivó que los niveles de lactato luminal presentaban una correlación inversa con los niveles de *C. difficile* en un modelo murino (Kolling, 2012). Por consiguiente, el género *Streptococcus* y el resto de LAB resultarían beneficiosos en este aspecto. Este hecho iría en contra de los estudios de comparación de microbiota en cohortes de pacientes con CDI y controles sanos, como el de Gu y col, donde se considera que la disminución de grupos butirogénicos, el aumento de grupos productores de ácido láctico y la expansión de patógenos oportunistas constituye un patrón de disbacteriosis que podría incrementar la susceptibilidad al desarrollo de CDI.

Al igual que ocurre con la expansión del *phylum* Proteobacteria, pensamos que la expansión que se produce en el género *Streptococcus* es debida a la pérdida en la riqueza de anaerobios estrictos que supone una ventaja selectiva para los anaerobios facultativos (Rivera-Chávez, 2016), como es el caso. La depleción de grupos butirogénicos que hemos observado tanto en pacientes con CDI como en individuos colonizados por *C. difficile* tras la administración antibiótica principalmente, conlleva una reorientación metabólica en el colonocito hacia la glucólisis anaerobia desde la beta-oxidación del butirato, lo que supone un menor consumo de oxígeno y un aumento de la oxigenación en la superficie del colon (Donohoe, 2012).

En base a nuestros resultados pensamos que la aparición del género *Streptococcus* surge como efecto y no como causa en la disbacteriosis presente en pacientes con CDI e individuos colonizados por *C. difficile*. Asimismo, si bien es un género con potencial poder patógeno, pensamos que en el contexto de la CDI se trata de un grupo protector, debido principalmente a la producción metabólica de ácido láctico. El hecho de que en nuestro estudio se sitúen sus niveles de forma superior en individuos colonizados que en infectados por *C. difficile* lo sitúa como posible candidato a factor protector de moderada importancia, que explicaría en parte, la no transición de un estado de colonización sin clínica a un estado de infección.

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

6.3.2.5 Diferencias de composición en los géneros de la familia *Enterococcaceae* entre los grupos CDI y P con respecto al grupo CTRL.

En el grupo de pacientes con CDI se observa un aumento estadísticamente significativo de la familia *Enterococcaceae* con respecto a los controles sanos (0.6853% en CDI frente a 0% en CTRL). Este incremento es debido en exclusiva a expensas del género *Enterococcus*. Por otro lado, en el grupo de individuos colonizados por *C. difficile* se observa un aumento estadísticamente significativo, aunque menos pronunciado (0.4993% en P frente a 0% en CTRL), también a expensas de dicho género. La diferencia entre los grupos CDI y P no es estadísticamente significativa.

Varios y diversos trabajos han evidenciado que los pacientes con CDI presentan incrementos del género *Enterococcus* como miembro de la microbiota intestinal. Sangster y col. al poner de manifiesto que la familia *Peptostreptococcaceae*, donde se incluye actualmente *C. difficile*, se relacionaba significativamente con el género *Enterococcus* en pacientes con CDI, concluyeron que el incremento en dicho género patógeno oportunista era característico de estos pacientes (Sangster, 2012). Milani y col. observaron un aumento en la abundancia relativa de *Enterococcus* desde el 0.27% en sujetos que no habían recibido tratamiento antibiótico, hasta el 16.86% en pacientes con CDI. Además, también se aumentó en pacientes sin CDI pero que recibieron tratamiento antibiótico hasta el 1.95%. Es por ello que los autores concluyeron que *Enterococcus* debe ser considerado como un marcador de riesgo de desarrollo a CDI y, por tanto, un suceso temprano en la cascada fisiopatológica que concluye con la colonización de *C. difficile* (Milani, 2016). Otros trabajos han recalcado la importancia de que el género *Enterococcus* forma parte de las LAB. Gu y col. encontraron niveles aumentados en pacientes con CDI respecto a los controles sanos y, además, mediante metagenómica evidenciaron que la familia *Enterococcaceae* aumentaba en pacientes con CDI y en pacientes con diarrea nosocomial no debida a *C. difficile*. Por tanto, los resultados mediante secuenciación del gen ADNr 16S y mediante estudios metagenómicos fueron concordantes y concluyeron que *Enterococcus* es un patógeno oportunista que se convierte en dominante cuando la microbiota intestinal equilibrada está alterada debido a los

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

antibióticos (Gu, 2015). Antharam y col. también situaron a *Enterococcus* en este contexto y recalcaron la importancia de que se trate de un género productor de ácido láctico. Encontraron que en los pacientes con CDI la abundancia relativa de *Enterococcus* aumentó al 7.1% desde el 0.05% que presentaron los controles sanos. *Enterococcus* fue detectable en el 85% de los pacientes con CDI y solo en el 22% de los controles sanos. Además, *Enterococcus* también estuvo aumentado en pacientes con diarrea nosocomial no debida a *C. difficile* (Antharam, 2013).

En trabajos donde se ha comparado la microbiota intestinal en pacientes sometidos a un FMT también se ha evidenciado que *Enterococcus* está presente en las muestras “pre FMT” para desaparecer en las “post FMT” (Shahinas, 2012). Brown y col. combinaron los estudios de secuenciación del gen ADNr 16S con la cuantificación de los ácidos biliares. Encontraron que el género *Enterococcus* estaba positivamente relacionado con los ácidos biliares primarios germinantes, y negativamente con los ácidos biliares secundarios inhibidores. Los autores concluyeron que *Enterococcus* debía actuar favoreciendo la germinación de las esporas de *C. difficile*, aunque por mecanismos no definidos al completo (Brown, 2018).

En individuos colonizados por *C. difficile* también se ha evidenciado la presencia de *Enterococcus*. Ya en 2004 Ozaki y col. observaron en 7 individuos portadores de *C. difficile*, utilizando técnicas de cultivo, que estaban densamente colonizados por *Enterococcus* y, por tanto, concluyeron que este género podría estar asociado a la colonización por *C. difficile*. Zhang y col. encontraron que las abundancias relativas de *Enterococcus* eran mayores en pacientes con CDI e individuos colonizados por *C. difficile* frente a controles sanos de forma estadísticamente significativa. De forma llamativa, aunque no significativa, los niveles eran mayores en los individuos colonizados (5%) que en los infectados (3%). Los autores expusieron que se desconoce el efecto y el rol de *Enterococcus* al respecto de la CDI, aunque suponen que existe relación en el estado de la enfermedad (Zhang, 2015). Han y col. también evidenciaron que los niveles de *Enterococcus* eran mayores en pacientes con CDI e individuos colonizados por *C. difficile* que en controles sanos (8.65% y 8.86% respectivamente frente a 0.56%) de forma estadísticamente significativa. De manera interesante, también mostraron

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

que los sujetos de ambos grupos con baja carga del gen *tcdB* presentaron abundancias relativas de *Enterococcus* muy superiores, de forma significativa, a los sujetos con alta carga del gen *tcdB* (12.8% frente a 0.89%). Por tanto, sería un género influenciado por la cantidad de toxina producida de *C. difficile* (Han, 2019).

Asimismo, en el trabajo prospectivo de Vincent y col. con 4 pacientes con CDI y 4 sujetos colonizados por *C. difficile*, donde analizaron la microbiota intestinal en diferentes días, observaron que en un individuo se producían picos del género *Enterococcus*, pudiendo llegar a un 98% de abundancia relativa. Estos picos se producían al recibir administración intravenosa de vancomicina. Los autores concluyeron que este hecho podría representar un sobrecimiento de *Vancomycin Resistant Enterococci* (VRE) (Vicent, 2016). Fujitani y col. unos años antes ya habían mostrado la relación entre los VRE y la CDI, encontrando un 50% de colonización por VRE en individuos colonizados por *C. difficile* (Fujitani, 2011).

El género *Enterococcus* está compuesto por cocos Gram positivos dispuestos en pareja o en cadena, no formadoras de esporas y anaerobias facultativas. Ciertas especies requieren CO₂ para su crecimiento. La actividad hemolítica es variable entre las especies y dentro de la misma especie. Se trata de un grupo catalasa negativo que no expresa de forma completa los citocromos, al igual que ocurre con el resto de LAB, ya que no puede sintetizar el grupo hemo. No obstante, puede tolerar cierta toxicidad del O₂ y son consideradas bacterias microaerófilas. Al igual que el género *Streptococcus* presenta una fermentación homoláctica produciendo ácido láctico como producto final a partir de la glucosa, sin generación de gas (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2012).

Enterococcus es un género miembro usual, aunque como componente muy minoritario, de la microbiota intestinal normal. Las dos especies más comunes encontradas en heces son *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*. Ambas especies también son responsables de producir ciertas infecciones oportunistas como endocarditis, peritonitis, sepsis, infecciones del tracto gastrointestinal y colitis, infecciones del tracto urinario asociadas o no a catéter, endoftalmítis, absesos, infecciones de herida quirúrgica e infección endodóncica (Goh, 2017). *E. faecalis* es responsable del 80-90% de las infecciones enterocócicas nosocomiales y

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

E. faecium del 10-15%. La razón de ello puede ser que *E. faecalis* es 100 veces más abundante en el tracto gastrointestinal que *E. faecium*. Las infecciones raramente se producen en pacientes inmunocompetentes ya que son típicas de pacientes inmunocomprometidos o con presencia de comorbilidades (Goh, 2017).

Característicamente, la infección por estos patógenos oportunistas se inicia con un sobrecrecimiento intestinal, traslocación a través de la barrera intestinal y salida al torrente sanguíneo, hasta afectar algún órgano en pacientes inmunocomprometidos. Siguiendo con esto, Brandl y col. mostraron en modelos murinos que la reducción de bacterias Gram negativas de la microbiota intestinal debido a la administración antibiótica producía una reducción de la lectina RegIII por las *Paneth Cells*. Esto generaba un aumento de VRE puesto que RegIII es una lectina que selectivamente inactiva bacterias Gram positiva incluyendo VRE (Brandl, 2008).

La patogénesis de *Enterococcus* viene dada por la presencia de factores de virulencia y su resistencia a antibióticos. Estos factores de virulencia están involucrados en la adhesión celular o a las proteínas de la matriz extracelular y también están relacionados con la evasión al sistema inmune del hospedador. La ausencia de estos factores de virulencia limita en gran medida el poder patógeno, por consiguiente, su presencia es dependiente de la cepa. Los factores de virulencia de *Enterococcus faecalis* han sido descritos mientras que en el caso de *Enterococcus faecium* no ha sido posible debido a la difícil manipulación de los cultivos aislados.

La citolisina es el factor de virulencia más importante y es expresado por muchas cepas de *E. faecalis*. Es activa frente a células eucariotas y frente a otras bacterias. Dicha actividad citolítica podría darle acceso a nutrientes que no serían accesibles para cepas no citolíticas. Además, al actuar sobre los hematíes pone a su disposición la hemina, con lo que es capaz de obtener energía mediante respiración aeróbica. Las proteasas como la gelatinasa están implicadas en el daño tisular que se produce durante la infección ya que degradan el tejido conectivo. Además, degradan componentes clave del sistema inmune del hospedador e interfieren en las vías de señalización celular del mismo, con lo que se facilita su

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

propia supervivencia. Las adhesinas conceden a *Enterococcus* la capacidad de producir biofilms y la adhesión a proteínas de la matriz extracelular, que son pasos muy importantes en la infección temprana (Garsin, 2014).

Algunas cepas de *Enterococcus* también son capaces de producir bacteriocinas con propiedades antimicrobianas. Es por ello por lo que algunos miembros de dicho género tienen utilidad como probióticos y en la industria alimentaria. Sus características para ello son la tolerancia al ambiente ácido gástrico y las sales biliares intestinales, la adherencia a superficies epiteliales intestinales, la persistencia en el tracto gastrointestinal, la modulación del sistema inmune y su actividad bactericida frente a patógenos intestinales incluido *C. difficile*. Las bacteriocinas de *Enterococcus*, también llamadas enterocinas, presentan un amplio espectro de actuación, incluso algunas tienen actividad frente a esporas y frente a bacterias productoras de esporas. Algunas cepas son capaces de producir varias de estas bacteriocinas, lo que les supone una ventaja selectiva frente a otras especies del tracto intestinal (Hanchi, 2018).

Más concretamente en el tema que nos concierne, Mansour y col. en un estudio donde pretendieron aislar y caracterizar nuevos probióticos capaces de inhibir *in vivo* e *in vitro* *C. difficile* como estrategia efectiva y segura para controlar la CDI, encontraron que uno de ellos se trataba de una mezcla de dos cepas de *E. faecalis* y otra cepa de *E. faecium*. Ninguna de estas tres cepas presentaba el gen *cylA* que codifica la citolisina, que es el mayor factor de virulencia que presenta este género. Esto se comprobó también mediante la nula actividad hemolítica en agar sangre. Las tres cepas fueron consideradas seguras en base a estos datos y a que presentaron susceptibilidad antibiótica. La inhibición constatada tanto *in vitro* como *in vivo*, se atribuyó a sustancias bactericidas (Mansour, 2018).

En resumen, nuestros datos muestran que tanto en pacientes con CDI como en los individuos colonizados por *C. difficile* se observa una ligera expansión del género *Enterococcus*. Este ligero aumento es inferior, en líneas generales, al que encontramos en muchos otros trabajos (Milani, 2016; Antharam, 2013; Zhang, 2015; Han, 2019) donde se alcanzan cifras superiores en cuanto a las abundancias relativas de este género, tanto en pacientes con CDI como en

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

individuos colonizados por *C. difficile*. Incluso en el trabajo prospectivo de Vicent y col. se han evidenciado picos de *Enterococcus* atribuidos a la presencia de VRE al administrar vancomicina (Vincent, 2016). *Enterococcus* es un género anaerobio facultativo que es capaz de adaptarse a la presencia de O₂ en su nicho ecológico. Como explicamos para el *phylum* Proteobacteria o el género *Streptococcus*, grupos que también toleran O₂ y pueden adaptarse a un metabolismo oxidativo en ciertas situaciones, la disbacteriosis que presentan ambos grupos de pacientes CDI y P con pérdida en la riqueza de anaerobios estrictos, supone una ventaja selectiva para los anaerobios facultativos (Rivera-Chávez, 2016). La depleción de grupos butirogénicos que hemos observado tanto en pacientes con CDI como en individuos colonizados por *C. difficile* tras la administración antibiótica principalmente, conlleva una reorientación metabólica en el colonocito hacia la glucólisis anaerobia desde la beta-oxidación del butirato, lo que supone un menor consumo de oxígeno y un aumento de la oxigenación en la superficie del colon (Donohoe, 2012). Por tanto, la aparición de *Enterococcus* parece ser efecto y no causa de la disrupción de la microbiota intestinal hallada en estos individuos. Tampoco, nuestros resultados muestran que sea un hallazgo diferenciador de la microbiota intestinal de los pacientes con infección y los sujetos con colonización por *C. difficile*, así como que los escasos trabajos anteriores similares al nuestro tampoco lo muestran (Zhang, 2015; Han, 2019). Lo que si que coinciden muchos trabajos es que tratan a *Enterococcus* como un género patógeno oportunista y que, por tanto, podría colaborar de alguna manera en la disbacteriosis encontrada en la infección y colonización por *C. difficile*, incluso exarcebando los síntomas de la CDI. No obstante, pensamos que el tema no es tan sencillo. Ya hemos discutido con el género *Streptococcus* que el ácido láctico generado como producto de fermentación final reduce los niveles de las toxinas TcdA y TcdB de *C. difficile* de forma dosis dependiente y de forma independiente a la carga bacteriana (Kolling, 2012). Por consiguiente, el género *Enterococcus*, al presentar el mismo producto principal de fermentación resultaría beneficioso en este aspecto. Por otra parte, se ha evidenciado en cepas carentes de producción de citolisina, su principal factor de virulencia, que es capaz de inhibir *C. difficile*, tanto en modelos *in vivo* como *in vitro* (Mansour, 2018). Por tanto, *Enterococcus* presenta una dualidad de efectos positivos o negativos en función de la cepa de *E. faecalis* o *E. faecium* que formen parte de la microbiota intestinal de los pacientes con CDI o individuos

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

colonizados por *C. difficile*. Para concluir, estamos de acuerdo que se trata de un género característico de ambos grupos CDI y P, pero que para poder sacar conclusiones sobre el poder que ejerce en la patogenicidad de la CDI se debería recurrir a estudios metagenómicos para conocer la especie y el grado de virulencia de esta.

6.3.2.6 Diferencias de composición en los géneros de la familia Lactobacillaceae entre los grupos CDI y P con respecto al grupo CTRL.

En el grupo de pacientes con CDI se observa un aumento no estadísticamente significativo de la familia Lactobacillaceae con respecto a los controles sanos (1.0287% en CDI frente a 0.0111% en CTRL). Este incremento es debido casi en exclusiva a expensas del género *Lactobacillus*. Por otro lado, en el grupo de individuos colonizados por *C. difficile* se observa un aumento menor que tampoco es estadísticamente significativo (0.2269% en P frente a 0.0111% en CTRL), también a expensas prácticamente de dicho género. La diferencia entre los grupos CDI y P no es estadísticamente significativa.

Los trabajos que han estudiado la composición de la microbiota intestinal en los pacientes con CDI en diversas situaciones tales como para valorar su restauración tras un FMT, o comparándola con la de diferentes cohortes de pacientes (sujetos colonizados, pacientes con diarrea nosocomial no debida a *C. difficile*), no suelen incidir en la importancia del género *Lactobacillus* en este contexto. No obstante, algunos estudios recogen este hallazgo como significativo. Gu y col. encontraron en pacientes con CDI con respecto a los controles sanos un aumento estadísticamente significativo de la familia Lactobacillaceae. Además, mediante análisis metagenómico se comprobó que el género *Lactobacillus* tenía incrementado sus niveles en pacientes con CDI y en pacientes con diarrea nosocomial no debida a *C. difficile* con respecto a los controles sanos. Los autores concluyeron que la reducción de bacterias productoras de ácido butírico y el aumento de bacterias productoras de ácido láctico sugieren susceptibilidad al desarrollo de CDI (Gu, 2016). Por otra parte, en estudios que han incorporado cohortes de individuos colonizados por *C. difficile* también se hallado en estos incrementos en la familia Lactobacillaceae y el género *Lactobacillus*. Zhang y col.

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

evidenciaron tanto en pacientes con CDI como en individuos colonizados un incremento significativo de *Lactobacillus* con respecto a los controles sanos, aunque no llegó a superar el 1% en ninguno de los dos casos (Zhang, 2015). Los autores concluyeron que si bien podía tener alguna influencia sobre el estado de la enfermedad (infección o colonización), su rol específico es desconocido. Han y col. en un trabajo similar, pero de mayor tamaño muestral, encontraron que la familia Lactobacillaceae presentó incrementos en pacientes con CDI e individuos colonizados por *C. difficile* con respecto a controles sanos (3.31% y 4.35 frente a 1.07%). De manera interesante, también mostraron que los sujetos de ambos grupos con baja carga de gen *tcdB* presentaron abundancias relativas de *Lactobacillus* muy superiores de forma estadísticamente significativa a los sujetos con alta carga de *tcdB* (6.50% frente a 0.09%). Por tanto, es un género influenciado por la cantidad de toxina de *C. difficile*, pero que no diferencia entre infección y colonización (Han, 2019). Por último, en estudios que han evaluado la microbiota intestinal en pacientes con CDI sometidos a FMT se ha evidenciado que en muestras “post FMT” hay un incremento de *Lactobacillus* (Shahinas, 2012), por lo que pudiera parecer que interviene en la restauración de forma positiva. A este respecto Brown y col. encontraron que *Lactobacillus* presentaba una correlación positiva con los ácidos biliares primarios y correlación negativa con los ácidos biliares secundarios y por consiguiente, se asoció a susceptibilidad a desarrollar CDI (Brown, 2018).

El género *Lactobacillus* está compuesto por bacilos Gram positivos, anaerobios facultativos, microaerófilos y no formadores de esporas. Pertenece al orden de los Lactobacillales como los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus*. El ácido láctico es su principal producto proveniente del metabolismo de los carbohidratos (al menos el 50%), por consiguiente, pertenece al grupo LAB. De acuerdo con el tipo de fermentación de los carbohidratos pueden subdividirse en homofermentadores obligados, heterofermentadores facultativos y heterofermentadores obligados. Los homofermentadores obligados pueden convertir las hexosas en ácido láctico por la vía Embden-Meyerhof, pero no pueden metabolizar las pentosas. Los heterofermentadores facultativos además pueden convertir las pentosas en ácido láctico y ácido acético, y etanol. En los heterofermentadores obligados las hexosas son transformadas en ácido láctico,

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

CO₂, etanol y ácido fórmicom, y ácido succínico. Las pentosas son convertidas en ácido láctico y ácido acético (Mikelsaar, 2016).

	Group I	Group II	Group III
Indices	Obligately homo-fermentative (OHOL)	Facultatively hetero-fermentative (FHEL)	Obligately hetero-fermentative (OHEL)
Growth at 45 °C	+	+	+/-
Growth at 15 °C	-(+) ^a	+(-) ^b	+(-) ^b
Hexose fermentation	+	+	+
Pentose fermentation	-	+	+
Fructose-diphosphate (FDP) aldolase	+	+	-
Phosphoketolase (PK)	-	+ ^c	+
Gas from glucose	-	-	+
Gas from gluconate	-	+	+
NH ₃ from arginine	-(+) ^a	-	+(-) ^b
Metabolites	(D-, L-, DL)	(D-, L-, DL)	(DL)
	Lactic acid	Lactic acid	Lactic acid
		Acetic acid	Acetic acid
		Ethanol	Succinic acid
			Formic acid
			Ethanol
Species of <i>Lactobacillus</i>	<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. brevis</i>
	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. curvatus</i>	<i>L. buchneri</i>
	<i>L. helveticus</i>	<i>L. paracasei</i>	<i>L. fermentum</i>
	<i>L. salivarius</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. reuteri</i>
	<i>L. gasseri</i>	<i>L. sakei</i>	<i>L. oris</i>
	<i>L. johnsonii</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. mucosae</i>
	<i>L. ruminis</i>		
	<i>L. crispatus</i>		

TABLA 22: Propiedades metabólicas de *Lactobacillus* característicos de humanos. ^amayormente negativo, ^bmayormente positivo, ^cinducible por pentosa. (Mikelsaar, 2016).

El genero *Lactobacillus* se compone de más de 170 especies y varias subespecies con una gran variabilidad fenotípica y genotípica que hace muy complicado generalizar acerca de sus miembros. Son miembros minoritarios de la microbiota intestinal. Algunos de ellos son *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus rhamnosus*. Aunque los consideramos parte de la microbiota intestinal comensal, también pueden comportarse como patógenos oportunistas. Se han asociado a bacteriemias, colecistitis, endocarditis, empiema, meningitis, peritonitis, pielonefritis, infecciones de prótesis y abscesos dentales (Goldstein, 2012), poniendo de manifiesto que tienen capacidad infecciosa en ciertas situaciones, normalmente en casos de pacientes

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

inmunodeprimidos o con enfermedades concomitantes. Su poder patógeno puede venir de la capacidad de algunas cepas para adherirse a la mucosa intestinal lo cual podría tener relación con la traslocación a la sangre, su capacidad para adherirse al colágeno de la matriz extracelular, su capacidad para agregar plaquetas y la producción de algunas enzimas como glicosidasas y proteasas que pueden actuar en la citólisis de tejidos afectados (Sherid, 2016). No obstante, son casos esporádicos y por lo que se conoce y se ha estudiado tanto a este género es por sus propiedades beneficiosas respecto a la microbiota intestinal. Básicamente, sus tres funciones son mantener y promover la resistencia a la colonización de patógenos oportunistas, mantener funciones metabólicas en el hospedador debido a sus metabolitos y modular la respuesta inmune innata atenuando la inflamación crónica de bajo grado (Mikelsaar, 2016). Se ha evidenciado que el incremento de *Lactobacillus* en el intestino ha correlacionado con numerosos efectos beneficiosos como la reducción del riesgo a desarrollar infecciones intestinales, disbacteriosis, enfermedades metabólicas y enfermedades autoinmunes (Floch, 2019).

Los efectos beneficiosos de *Lactobacillus* se han atribuido a la síntesis de diferentes moléculas de interés. *Lactobacillus* sintetiza AGCC debido a su metabolismo fermentativo, principalmente ácido láctico, acético y succínico. El ácido acético puede contribuir a la acidificación del microambiente intestinal y este hecho es importante puesto que, junto al resto de LAB, puede competir con otras bacterias menos acidófilas, que son la mayoría de las bacterias patógenas (Pessione, 2012). El ácido láctico modula la respuesta inmune innata al actuar sobre neutrófilos y células epiteliales (Blad, 2012). Por otra parte, *Lactobacillus* puede sintetizar ácidos linoleicos conjugados que presentan efectos beneficiosos en el cáncer, inflamación, enfermedades metabólicas y enfermedades cardiovasculares. Asimismo, *Lactobacillus* participa en la detoxificación de componentes fenólicos derivados del metabolismo proteínico por la microbiota intestinal. Dichos compuestos fenólicos se formarían a partir de la degradación bacteriana de aminoácidos aromáticos (Mikelsaar, 2016).

Centrándonos en los posibles efectos beneficiosos del género *Lactobacillus* en la CDI y su papel como probiótico, en primer lugar, hay que decir que no todas

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

las especies de *Lactobacillus* tienen propiedades probióticas ya que la eficacia de una bacteria probiótica es cepa dependiente (Goldstein, 2017). Las actuales guías clínicas de diagnóstico, tratamiento y prevención de *C. difficile* (*European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Infectious Diseases Society of America, Society for Healthcare Epidemiology of America*) no recomiendan la administración de probióticos como medida para prevenir o tratar la CDI (McDonald, 2018; Debast, 2014). Esta recomendación se ha establecido en base a que existe una enorme variedad de probióticos disponibles y los ensayos clínicos que se hacen al respecto son normalmente de poca calidad, con tamaños muestrales pequeños, incontrolados y frecuentemente financiados por la casa comercial del mismo probiótico. Por tanto, es difícil sacar conclusiones de peso y confirmar las hipótesis acerca de sus mecanismos de acción (McFarland, 2009). No obstante, se incide en que su utilidad podría situarse en mayor medida en la prevención primaria donde la alteración de la microbiota intestinal no sería tan profunda que en la prevención secundaria, donde ya observamos cambios profundos con pérdida de riqueza, diversidad y grupos de bacterias importantes. A esta confusión al respecto del valor de *Lactobacillus* como probiótico en CDI hemos de añadir que el proceso de manufacturado y control de calidad también influyen en las propiedades del producto finalizado. Por otra parte, una revisión en Cochrane del año 2017 de 31 ensayos clínicos con 8672 pacientes concluyó que existía una evidencia moderada para afirmar que los probióticos eran seguros y eficaces para prevenir la CDI, sobre todo en pacientes no inmunocomprometidos o no severamente debilitados (Goldenberg, 2017).

Puesto que como hemos dicho que existe una enorme variación en cuanto la eficacia de las especies de *Lactobacillus* como tratamiento de la CDI, incluso en diferentes preparaciones de la misma especie (Grześkowiak, 2011), vamos a centrarnos en una formulación que funciona para revisar los posibles mecanismos de acción. El probiótico Bio-K+ es una fórmula de *Lactobacillus acidophilus* CL 1285, *Lactobacillus casei* LBC80R y *Lactobacillus rhamnosus* CLR2. Es un ejemplo de probiótico bien caracterizado y eficaz en la reducción de la CDI cuando se administra en nivel hospitalario (McFarland, 2018). Los efectos potenciales que puede presentar un probiótico en la CDI son la restauración de la microbiota intestinal, inhibición directa del crecimiento de *C. difficile*, neutralización de las

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

toxinas y modulación de la respuesta inflamatoria. Se ha evidenciado que Bio-K+ es capaz de modificar temporalmente la microbiota intestinal, presenta una fuerte capacidad para competir frente a patógenos oportunistas como *C. difficile* debido a la producción de ácidos orgánicos como el ácido láctico y la síntesis de bacteriocinas y presenta la capacidad de neutralizar las toxinas debido al ácido láctico y en general al ambiente ácido generado por los ácidos orgánicos generados (McFarland, 2018). Asimismo, las bacteriocinas producidas por *Lactobacillus* y en general por todas las LAB han cobrado reciente importancia. Son moléculas peptídicas que interfieren con el crecimiento de otras bacterias. Esta acción bactericida es selectiva y su espectro de acción varía en función de la especie productora. Un ejemplo de bacteriocinas son los lantibióticos que pueden actuar formando poros en la membrana celular de las bacterias e interfiriendo en la síntesis de la pared celular (Pessione, 2012). Como hemos dicho, no todas las especies de *Lactobacillus* presentan estas propiedades e incluso dentro de las mismas especies hay grandes variaciones dependientes de la cepa.

Por consiguiente, *Lactobacillus* es un género complejo de interpretar en el contexto de la CDI. Pensamos que su expansión en los pacientes con CDI y en individuos colonizados por *C. difficile*, corroborada en nuestro estudio y en otros (Zhang, 2015; Han, 2019), es debido a la misma razón por la que se produce la expansión del *phylum* Proteobacteria y la expansión de otras LAB como *Streptococcus* y *Enterococcus*. *Lactobacillus* es un género anaerobio facultativo, incluso microaerófilo, que es capaz de adaptarse a la presencia de O₂ en su nicho ecológico. La disbacteriosis que presentan ambos grupos de pacientes CDI y P con pérdida en la riqueza de anaerobios estrictos, supone una ventaja selectiva para los anaerobios facultativos (Rivera-Chávez, 2016). La depleción de grupos butirogénicos que hemos observado tanto en pacientes con CDI como en individuos colonizados por *C. difficile* tras la administración antibiótica principalmente, conlleva una reorientación metabólica en el colonocito hacia la glucólisis anaerobia desde la beta-oxidación del butirato, lo que supone un menor consumo de oxígeno y un aumento de la oxigenación en la superficie del colon (Donohoe, 2012). Por tanto, la expansión de *Lactobacillus* es “efecto” y no “causa” de la disrupción de la microbiota intestinal hallada en estos individuos. Por otra parte, no encontramos diferencias significativas entre las abundancias relativas de

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

Lactobacillus entre los grupos CDI y P, pero sí con respecto a los controles sanos. Este hecho también se ha constado en la bibliografía revisada (Zhang, 2015; Han 2019). Lo que sí diferencia nuestros resultados con los de estos otros trabajos es que la expansión de *Lactobacillus* es menor en nuestro estudio. Esto puede ser debido a que la susceptibilidad antibiótica es muy variable según la especie y el efecto es difícil de prever (Goldstein, 2012). También es difícil de prever lo que supone a la patogénesis de la CDI este género. Hemos visto que algunas especies y cepas de estas especies, no todas, presentan efectos beneficiosos sobre la CDI. No obstante, también se han documentado casos de infecciones por *Lactobacillus*, por tanto, puede presentar poder patógeno y comportarse como un patógeno oportunista. Se deberían recurrir a estudios metagenómicos para caracterizar las especies de *Lactobacillus* a expensas de las que se produce su aumento en los pacientes con CDI y en los individuos colonizados por *C. difficile*, e incluso el tipo de cepa para poder sacar conclusiones acerca de si suponen protección o susceptibilidad al desarrollo de la CDI. Lo que sí que concluimos es que tanto *Lactobacillus* como el resto de LAB son marcadores de disbiosis en ambos grupos de individuos.

6.3.2.7 Diferencias de composición en los géneros de la familia Peptostreptococcaceae entre los grupos CDI y P con respecto al grupo CTRL.

En el grupo de pacientes con CDI se observa un aumento estadísticamente significativo de la familia Peptostreptococcaceae con respecto a los controles sanos (0.5298% en CDI frente a 0.0600% en CTRL). Dentro de esta familia el género más importante es *Clostridioides* que tiene como única especie a *Clostridioides difficile*, que es el nombre propuesto recientemente en base a estudios filogenéticos (Lawson, 2016). Para evitar la confusión y debido a la convencionalidad del nombre clásico, nos seguiremos refiriendo a esta bacteria como *Clostridium difficile*, aunque nos referiremos en este punto al género como *Clostridioides*. *Clostridioides* está incrementado en el grupo CDI con respecto al de los controles sanos de forma estadísticamente significativa (0.3668% en CDI frente a 0% en CTRL). Por otro lado, en el grupo de individuos colonizados por *C. difficile* también se observa un aumento estadísticamente significativo en la familia Peptostreptococcaceae (0.4781% en P frente a 0.0600% en CTRL) y un aumento del

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

género *Clostridioides* (0.3638% en P frente a 0% en CTRL). La diferencia entre los grupos CDI y P no es estadísticamente significativa tanto para la familia Peptostreptococcaceae como para el género *Clostridioides*. Por tanto, *C. difficile* aparece en casi idéntica abundancia relativa tanto en los pacientes con CDI como en los individuos colonizados, estando totalmente suprimido en los controles sanos como era de esperar.

En nuestro estudio, la positividad del gen *tcdB* por PCR no distingue entre colonización e infección, ya que en nuestra cohorte de individuos colonizados por *C. difficile* el 53% presenta cepas toxigénicas. Esto está en línea con otros trabajos al respecto (Planche, 2013). Asimismo, algunos estudios han sugerido que la carga del gen de *tcdB* es un predictor de positividad de toxina libre (Kim, 2018), aunque existen resultados contradictorios entre la carga del gen de *tcdB* y el desarrollo de la infección (Davies, 2018). En el trabajo de Han y col., donde estudiaron la microbiota intestinal de pacientes con CDI, individuos portadores asintomáticos de *C. difficile* y controles sanos, subclasificaron los sujetos en base a la carga del gen de *tcdB*, como sujetos *high load tcdB* y *low high tcdB*. La carga de toxina de *tcdB* tampoco distinguió entre colonización e infección. Tampoco diferenció diversidad, agrupamiento ni cambios importantes en géneros productores de butirato beneficiosos (Han, 2019). Este hecho enlaza con nuestros resultados donde la abundancia relativa de *C. difficile* es casi igual en ambos grupos, sugiriendo que la mayor presencia de esta bacteria no distingue infección ni colonización, así como la mayor carga de gen de la toxina tampoco, es decir, la mayor presencia de producción de toxina. En el trabajo de Zhang y col. se puso hincapié en que el *cluster Clostridium XI*, donde se ubica *C. difficile*, disminuye su abundancia relativa desde el grupo de pacientes con CDI, portadores asintomáticos de *C. difficile* y controles sanos (6.5%, 1.6% y 0%), sugiriendo que la infección implica mayor presencia de *C. difficile* (Zhang, 2015). Nosotros no estamos de acuerdo con esta conclusión. Pensamos que nuestro estudio, estimando la abundancia relativa del género *Clostridioides* mediante secuenciación del gen ADNr 16S, aporta resultados más fiables y concluimos de forma diferente.

Como ya hemos comentado en apartados introductorios, las toxinas TcdA y TcdB, sobre todo esta última, son las responsables de la clínica producida por *C.*

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

difficile. La expresión de las toxinas se produce al entrar el microorganismo en la fase estacionaria de crecimiento, supuestamente debido a la limitación de nutrientes. Los genes *tcdA* y *tcdB* se localizan en PaLoc o locus de patogenicidad. De manera interesante, pueden producirse cambios en la región codificante de las toxinas de PaLoc como inserciones, deleciones y mutaciones puntuales que conforman una heterogeneidad genética, dando lugar a una serie de diferentes toxinotipos. Esto supone que podrían existir cepas con diferente actividad y especificidad de sus toxinas con respecto a la cepa de referencia de *C. difficile* VPI 10463 (Rupnik, 2016). Las cepas sin diferencias con respecto a la cepa de referencia VPI 10463 pertenecerían al toxinotipo 0. Las que presentan diferencias en los genes *tcdA* y *tcdB* se distribuyen en 34 toxinotipos restantes. Se categorizan en toxinotipos mayores o menores con respecto a sus diferencias con respecto al toxinotipo 0. La mayor parte de los toxinotipos producen ambas toxinas TcdA y TcdB. También en su mayoría son capaces de producir la toxina CDT. Los toxinotipos menores no producen CDT. Siete toxinotipos tienen fenotipo A-B+ y CDT puede ser positiva o negativa. Los toxinotipos XIa al XIId conforman el único grupo con parte del PaLoc presente pero que no producen toxinas TcdA y TCdB, pero producen CDT, por tanto, su fenotipo es A-B-CDT+. El fenotipo A+B- no se detecta con las técnicas descritas de toxinotipado y no se engloba en ningún toxinotipo específico (Monot, 2015). Los toxinotipos también pueden mostrar correlación con los diferentes ribotipos, así que el ribotipado de las cepas puede sugerir la variante génica de las toxinas (Rupnik, 2008). Por consiguiente, los toxinotipos son importantes porque muestran propiedades funcionales de las variantes de las toxinas de *C. difficile*, es decir mayor o menor actividad y mayor o menor producción. Pero, la correlación entre los diferentes toxinotipos que nos permita discriminar infección de colonización, así como severidad de la CDI, no se ha clarificado. No obstante, una pista de que esto puede ser así nos la da el ribotipo hipervirulento 027. En este ribotipo se produce una variación en el gen *tcdB* (Lanis, 2010). La TcdB del ribotipo 027 tiene más poder citotóxico que las cepas clásicas (Stabler, 2009). Esta variante de TcdB es capaz de traslocarse al citosol de las células infectadas más rápidamente y el mecanismo de autoprosesado es más eficiente, ya que presenta una estructura más favorable para ello.

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

En uno de los pocos trabajos que han combinado el estudio de la microbiota intestinal mediante secuenciación del gen ADNr 16S y el ribotipado de las cepas toxigénicas causales en 105 pacientes con CDI, 66 pacientes con diarrea nosocomial no debida a *C. difficile* y 37 controles sanos, los autores concluyeron que existía una asociación entre el ribotipo 027 y su mayor capacidad de colonización y la presencia de mayor cambio en la estructura de la microbiota intestinal (Skraban, 2013)

Las manifestaciones clínicas que produce la CDI abarcan desde manifestaciones clínicas leves hasta complicaciones muy graves como colitis pseudomembranosa, megacolon tóxico, íleo paralítico e incluso la muerte. Incluso se puede producir una colonización asintomática de *C. difficile*. Este espectro de situaciones es debido a que depende de factores que competen al individuo, como el estado inmune, la presencia de comorbilidades, la edad y el grado de compromiso de la microbiota intestinal, y también a *C. difficile* en cuanto a la virulencia de la cepa causal. Nuestros resultados muestran que la abundancia relativa de *C. difficile* es similar en individuos con infección y colonización. Es por lo cual que factores concernientes a *C. difficile* deberían ser tenidos en cuenta en la diferenciación entre la infección y la colonización. Pensamos que las variantes toxinotípicas son un ejemplo al respecto. No olvidemos que los individuos colonizados de nuestra cohorte, presentan un grado de compromiso de la microbiota intestinal importante con escasas diferencias con los pacientes con CDI de momento, aún algunos colonizados por cepas no toxigénicas. Por tanto, nuestros datos apuntan a la importancia de evaluar factores de virulencia de *C. difficile* en un futuro, junto a estudios de secuenciación masiva del gen ADNr 16S y estudios metagenómicos.

6.3.2.8 Diferencias de composición en los géneros de la familia Erysipelatrichaceae entre los grupos CDI y P con respecto al grupo CTRL.

En el grupo de pacientes con CDI se observa un aumento no estadísticamente significativo de la familia Erysipelatrichaceae con respecto a los controles sanos (4.3% en CDI frente a 1.8% en CTRL). Este incremento es debido casi en exclusiva a expensas de los géneros *Erysipeloclostridium* (2.9% en CDI

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

frente a 0.2% en CTRL) y de *Clostridium innocuum Group* (1.0% en CDI frente a 0.0115% en CTRL), produciéndose en el segundo género una diferencia estadísticamente significativa. Por otro lado, en el grupo de individuos colonizados por *C. difficile* se observa una ligera disminución de Erysipelatrichaceae no estadísticamente significativa ($p=0.0521$) (1.6% en P frente a 1.8% en CTRL). No obstante, también se produce una expansión, aunque menos pronunciada de *Erysipeloclostridium* (1.2% en P frente a 0.2% en CTRL) y de *C. innocuum Group* (0.2% en P frente a 0.0115% en CTRL), produciéndose únicamente en el segundo género una diferencia estadísticamente significativa. Además, se producen pérdidas en el grupo P de géneros minoritarios como *Catenibacterium*, *Holdmanella*, *Faecalitalea* y *Erysipelotrichaceae UCG-003*, no tan pronunciado en el grupo CDI. La diferencia a nivel de la familia Erysipelatrichaceae entre los grupos CDI y P es estadísticamente significativa (4.3% en CDI frente a 1.6% en CTRL). Los géneros *Erysipeloclostridium* (2.9% en CDI frente a 1.2% en P) y *C. innocuum Group* (1.0% en CDI frente a 0.2% en P) presentan mayores abundancias relativas en el grupo de pacientes infectados que en los sujetos colonizados, produciéndose únicamente en el segundo género una diferencia estadísticamente significativa.

En pocos trabajos se ha puesto en valor la importancia de la familia Erysipelatrichaceae en el contexto de la CDI. Han y col. observaron un ligero aumento en el grupo de pacientes con CDI (1.25%) y una disminución en el grupo de individuos colonizados (0.67%) con respecto a los controles sanos (1.13%). Ninguna diferencia fue estadísticamente significativa. Asimismo, se produce una total erradicación del género *Catenibacterium* en los grupos de infectados y colonizados con respecto a los controles sanos (0.53%). Estos resultados estarían en la misma línea de los nuestros. Los autores consideran que la erradicación de *Catenibacterium* en ambos grupos de infectados y colonizados por *C. difficile* podría ser un marcador específico de disbacteriosis (Han, 2019). En el trabajo de Rea y col. donde estudiaron la microbiota intestinal en individuos de elevada edad portadores de *C. difficile*, también se observó una reducción de Erysipelatrichaceae estadísticamente significativa (Rea, 2012).

La familia Erysipelatrichaceae pertenece a la tercera clase Erysipelatrichia del *phylum* Firmicutes. Está comprendida por bacilos Gram positivos, inmóviles,

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

no formadores de esporas, aeróbicos o anaeróbicos facultativos, quimiorganótrofos y de metabolismo respiratorio y débilmente fermentativo (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2012).

Esta familia es un miembro constituyente muy minoritario de la microbiota intestinal y se ha considerado que tiene efectos fisiológicos y patológicos (Kaakoush, 2015). No obstante, en los trabajos donde se ha mencionado no se le ha dado demasiada importancia. Los miembros de esta familia presentan dos características importantes. Por un lado, parecen ser altamente inmunogénicos y por otro se expanden, en mayor o menor medida, después de administración antibiótica. La abundancia relativa de Erysipelatrichaceae se ha correlacionado con los niveles de TNF α en pacientes con infección crónica de VIH respecto a controles sanos (Dinh, 2015). Igualmente, el hecho de que su abundancia relativa esté incrementada en el cáncer colorrectal pone de manifiesto su potencial importancia en procesos inflamatorios intestinales (Chen, 2012). Además, en un modelo murino se ha evidenciado que Erysipelatrichaceae se expandió tras la administración de gentamicina (Zhao, 2013). No obstante, los trabajos al respecto de la relación entre la familia Erysipelatrichaceae y la enfermedad inflamatoria intestinal han arrojado evidencia inconsistente (Kaakoush, 2015).

Erysipelatoclostridium es un género de nueva creación comprendido por bacilos Gram positivos, inmóviles, anaerobios obligados, no formadores de esporas y de metabolismo fermentativo (Yutin, 2013). La especie tipo es *Erysipelatoclostridium ramosum* aunque comprende también a *Erysipelatoclostridium cocleatum*, *Erysipelatoclostridium saccharogumia* y *Erysipelatoclostridium spiriforme*. Este nuevo género se sitúa en el *cluster Clostridium XVIII* y recientemente ha sido confirmado como un grupo de bacterias monofilogenético (Parks, 2018). *Erysipelatoclostridium* es un género potencialmente patógeno escasamente prevalente que suele afectar a pacientes inmunocomprometidos, menores de 5 años y ancianos. No obstante, debido a su dificultad de cultivo es posible su infradiagnóstico. Se han documentado casos de gangrena gaseosa, otitis media, anemia hemolítica no autoinmune, pielonefritis, osteomielitis, artritis, bacteriemia, etc (Zakham, 2019). De forma interesante, también se ha asociado a

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

casos de peritonitis, absceso intestinal y colitis pseudomembranosa (Alcalde-Vargas, 2012), aunque es un grupo muy minoritario de la microbiota intestinal. Los hallazgos de nuestro estudio al respecto de este género nos indican una mayor expansión en los pacientes con CDI (2.9%) que en individuos colonizados por *C. difficile* (1.2%) con respecto a los controles sanos (0.2%). Esta expansión es presumiblemente debida a la aparición de nuevos nichos ecológicos debido a la pérdida de diversidad y riqueza en ambos grupos CDI y P. Debido al carácter patógeno de este género y al efecto proinflamatorio intestinal de la familia Erysipelatrichaceae (Dinh, 2015), consideramos un hallazgo relevante este hecho y que podría tener repercusión en la transición del estado colonización sin clínica a un estado de infección. Este hecho no ha sido valorado en ningún trabajo acerca de la patogénesis de la CDI.

Clostridium innocuum es un microorganismo ubicado en el *cluster Clostridium* XVIa aunque actualmente pertenece a la familia Erysipelatrichaceae. Es una especie de bacilos Gram positivos, inmóviles, anaerobios estrictos, formadores de esporas y de metabolismo fermentativo complejo (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2012). Pertenece junto a *Erysipelatoclostridium ramosum* y a *Clostridium clostridioforme* al grupo RIC. Se trata de un miembro minoritario de la microbiota intestinal con poder patógeno capaz de producir infecciones extraintestinales infrecuentes (aunque es posible que exista un infradiagnóstico debido a la complejidad de identificación) pero muy graves (Chia, 2017), sobre todo en pacientes ancianos con enfermedades de base. Asimismo, también es un agente causal de infecciones gastrointestinales secundarias al consumo de antibióticos como diarrea, colitis severa y colitis pseudomembranosa (Chia, 2018). Una particularidad de esta especie es que es resistente a la vancomicina, ya que presenta una alanina-D-alanina carboxipeptidasa que elimina el residuo terminal D-alanil-D-alanina de alta afinidad para la vancomicina que impediría la síntesis del precursor de la pared celular bacteriana (Chia, 2017). Es posible que su único mecanismo de virulencia sea la existencia de estructuras similares al lipolisacárido bacteriano (Chia, 2017). Por tanto, la expansión de esta especie, debido a la aparición de nuevos nichos ecológicos de forma secundaria a la administración de antibióticos, en pacientes con CDI que no observamos en individuos colonizados por *C. difficile* es un

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

hallazgo que se debe tener en cuenta. Debido a su poder patógeno intestinal (Chia, 2017) y extraintestinal (Chia, 2018), capacidad inflamatoria (Dinh, 2015), podría tener repercusión en la transición del estado colonización sin clínica a un estado de infección. Este hecho no ha sido valorado en ningún trabajo acerca de la patogénesis de la CDI. Por consiguiente, los miembros patógenos de la familia Erysipelatrichaceae que hemos observado, se expanden en los pacientes con CDI, pero en mucho menor medida en los individuos colonizados por *C. difficile* y debido a ello podrían ser predisponentes al desarrollo de CDI. Solo en otros estudios prospectivos, donde se evalúe la microbiota de una cohorte en situación basal y luego se observe los que evolucionen a CDI o no, se podría saber si este hallazgo es causa o consecuencia de la CDI.

6.3.3 Diferencias de composición a nivel de familia y género pertenecientes al *phylum* Bacteroidetes entre los grupos CDI y P con respecto al grupo CTRL.

En el apartado 6.3.1 “Diferencias de composición a nivel de *phylum*” discutimos el incremento en las abundancias relativas que se observa en el *phylum* Bacteroidetes en ambas cohortes de pacientes con CDI e individuos colonizados con *C. difficile* con respecto a los controles sanos. Ahora vamos a discutir a costa de que familias y géneros son debidos estos aumentos.

Las diferencias a nivel de familia que consideramos más significativas en el grupo CDI con respecto a controles sanos son las siguientes:

- Aumento estadísticamente significativo en la familia Bacteroidaceae (26.8% en CDI frente a 11.0% en CTRL).
- Aumentos no estadísticamente significativos en las familias Tannerellaceae (4.7% en CDI frente a 1.1% en CTRL), Marinifilaceae (1.0% en CDI frente a 0.2% en CTRL), Barnesiellaceae (0.8% en CDI frente a 0.4% en CTRL) y Rikenellaceae (2.9% en CDI frente a 2.6% en CTRL).
- Disminuciones no estadísticamente significativas en las familias Muribaculaceae (0.8% en CDI frente a 1.5% en CTRL) y Prevotellaceae (2.0% en CDI frente a 2.5% en CTRL).

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

Por otra parte, las diferencias a nivel de familia que consideramos más significativas en el grupo P con respecto a controles sanos son las siguientes:

- Aumento estadísticamente significativo en la familia Bacteroidaceae (29.1% en P frente a 11.0% en CTRL).
- Aumento no estadísticamente significativo en la familia Tannerellaceae (2.3% en CDI frente a 1.1% en CTRL) y Rikenellaceae (2.7% en P frente a 2.6 en CTRL)
- Disminuciones estadísticamente significativas en las familias Muribaculaceae (0.0% en P frente a 1.5% en CTRL) y Prevotellaceae (1.4% en P frente a 2.5% en CTRL) y Barnesiaceae (0.2% en P frente a 0.4% en CTRL).
- La familia Marinificaceae presenta igualdad de abundancias relativas en los grupos P y CTRL (0.2% en P frente a 0.2% en CTRL).

En consecuencia, podemos considerar que las diferencias a nivel de familia con respecto al grupo de controles sanos que encontramos de forma común en los grupos CDI y P, son el aumento acentuado en Bacteroidaceae y el ligero aumento en Rikenellaceae.

Por el contrario, las diferencias más llamativas en el patrón de disbiosis a nivel de familias del *phylum* Bacteroidetes, con respecto a controles sanos de los grupos CDI y P, son la disminución en Prevotellaceae más pronunciada en P que en CDI, la disminución en Muribaculaceae más pronunciada en P (erradicación total) que en CDI, el aumento en Tannerellaceae más pronunciado en CDI que en P, el aumento de Marinificaceae en CDI que no se observa en P y el aumento en Barnesiaceae en CDI mientras que en P se observa una disminución.

Por tanto, si bien las familias mayoritarias se comportan de forma similar en ambas cohortes de pacientes infectados y colonizados por *C. difficile*, en las familias minoritarias encontramos diferencias que discutiremos a continuación.

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

6.3.3.1 Diferencias de composición en los géneros de la familia Bacteroidaceae entre los grupos CDI y P con respecto al grupo CTRL.

En el grupo de pacientes con CDI se observa un llamativo aumento estadísticamente significativo de la familia Bacteroidaceae con respecto a los controles sanos (26.8% en CDI frente a 11.0% en CTRL). Este incremento es debido en exclusiva al género *Bacteroides*. Por otro lado, en el grupo de individuos colonizados por *C. difficile* se observa otro llamativo aumento aún mayor que el encontrado en el grupo CDI y que es estadísticamente significativo (29.1% en P frente a 11.0% en CTRL), también a expensas totalmente de dicho género. La diferencia entre los grupos CDI y P no es estadísticamente significativa.

Bacteroides es un género que la mayor parte de la comunidad científica ha asociado su depleción a CDI y la pérdida de resistencia a la colonización. No obstante, en algunos trabajos evidenciamos resultados similares a los nuestros, donde hemos encontrado un aumento en su abundancia relativa. En estudios donde han comparado la microbiota intestinal de pacientes con CDI y portadores asintomáticos de *C. difficile* se han visto resultados discordantes. Zhang y col. observaron en 8 pacientes con CDI, 8 portadores asintomáticos (ambos grupos de individuos hospitalizados) y 8 controles sanos que el género *Bacteroides* estaba muy disminuido en infectados (11%), mientras que se conservaba en mayor grado en colonizados (24%) frente a los controles sanos (31%). Los autores exponen que dicho género se ha visto muy afectado por la administración antibiótica (Zhang, 2015). Por otra parte, Han y col. en un trabajo con mayor tamaño muestral, con 58 pacientes con CDI y 21 individuos colonizados por *C. difficile*, encontraron que la familia Bacteroidaceae estaba ligeramente aumentada en los pacientes infectados (23.5%) frente a los controles sanos (20%), y los individuos colonizados presentaron una ligera disminución (18.6%) (Han, 2019). En el estudio de Dong y col. donde encontraron 12 portadores asintomáticos de *C. difficile* al realizar un screening en población china, observaron que la microbiota intestinal de estos pacientes presentaba un descenso significativo de *Bacteroides* (Dong, 2018). Rea y col. en una cohorte de ancianos en instituciones de la tercera edad observaron que su microbiota intestinal presentaba descensos en la familia Bacteroidaceae (56%)

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

con respecto a los controles sanos (63%) (Rea, 2012). Por tanto, ciertamente hay disparidad de resultados.

Los estudios que han analizado la restauración de la microbiota intestinal en pacientes con CDI sometidos a FMT han mostrado que la expansión de *Bacteroides* es un hallazgo común. Weingarden y col. observaron que en las muestras “pre FMT” la familia Bacteroidaceae representaba menos del 1% mientras que en las muestras “post FMT” su abundancia relativa se acercaba a la de los donantes de heces (Weingarden, 2014). Las cifras tan extremas en las muestras “pre FMT” de los pacientes con CDI podrían deberse a que se trataba de pacientes sometidos a varios ciclos de antibióticos con varios fracasos terapéuticos. Shahinas y col. observaron un gran incremento de *Bacteroides* tras el FMT, que se acompañó de un descenso de *Escherichia/Shigella* (Shahinas, 2012). Brown y col. en un trabajo similar donde además determinaron los niveles de diferentes ácidos biliares primarios y secundarios, concluyeron que la depleción de *Bacteroides* que estuvo asociada de forma estadísticamente negativa a los ácidos biliares primarios, significaba una pérdida de resistencia a la colonización (Brown, 2018).

Los estudios donde que han comparado la microbiota intestinal de pacientes con CDI con diferentes cohortes muestran resultados discrepantes con respecto al género *Bacteroides*, aunque la tendencia es que en estos pacientes con CDI está disminuido. Milani y col. observaron una disminución de *Bacteroides* en pacientes con CDI (11%) con respecto a una cohorte de individuos sanos que no habían recibido tratamiento antibiótico (30%). No obstante, en sujetos que sí habían recibido tratamiento antibiótico pero que no presentaban CDI, *Bacteroides* no disminuía (31%) (Milani, 2016). En otros trabajos también se ha evidenciado la pérdida de *Bacteroides* en pacientes con CDI (Sangster, 2016; Vicent, 2013; Skraban, 2016). Schubert y col. mediante un modelo estadístico donde combinaron factores clínicos y datos de la microbiota intestinal de pacientes con CDI, concluyeron que la depleción de *Bacteroides* era indicativo de una mayor probabilidad de CDI (Schubert, 2014). Gu y col. confirmaron la disminución de *Bacteroides* en pacientes con CDI y con diarrea nosocomial no debida a *C. difficile* evidenciada mediante secuenciación masiva del gen ADNr 16S y mediante estudios metagenómicos

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

(Gu, 2016). No obstante, y de forma llamativa, Antharam y col. observaron un aumento de *Bacteroides* en pacientes con CDI (29.5%) y con diarrea nosocomial no debida a *C. difficile* (45.7%) con respecto a controles sanos (16.1%) (Antharam, 2013).

El género *Bacteroides* esta compuesto por bacilos de extremos redondeados Gram negativos, inmóviles, anaerobios estrictos, quimiorganótrofos, sacarolíticos aunque débilmente proteolíticos, de metabolismo fermentativo donde los mayores productos de fermentación son el succinato y el acetato. Comprende más de 60 especies, siendo *Bacteroides fragilis* la especie tipo. Las especies de este género conforman un grupo heterogéneo bioquímica y fisiológicamente (*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2012).

Bacteroides presenta la particularidad de presentar múltiples mecanismos bioquímicos para adaptarse al medio que le rodea. Algunas especies codifican una citocromo oxidasa que provocaría la reducción de los niveles de oxígeno intracelular y por extensión de los niveles de oxígeno en el intestino. Esto permitiría la supervivencia de bacterias anaerobias estrictas que se beneficiarían de esta propiedad de *Bacteroides*, para las cuales el O₂ es letal (Baughn, 2004). Posiblemente está sea una de las causas de su amplia propagación en el intestino de múltiples mamíferos y ser uno de los géneros componentes mayoritarios de la microbiota intestinal humana. Por otra parte, *Bacteroides* presenta una inusual capacidad de reconocer y metabolizar una gran cantidad de polisacáridos provenientes de la dieta y del mismo hospedador. Como ya avanzamos en el apartado “6.3.1.1. Diferencias a nivel de phylum entre los grupos CDI y CTRL”, *Bacteroides* codifica un gran número de CAZYmes (*Carbohydrate-Active Enzymes*), que metabolizan estos polisacáridos (El Kaoutari, 2013). Estos genes se localizan en los llamados PULs (*Polysaccharide Utilization Loci*) de su cromosoma bacteriano. *Bacteroides* presenta múltiples PULs que les permiten adaptarse de forma rápida a cambios en la disponibilidad de estos nutrientes en el intestino (Tuson, 2018). Este hecho es importante, puesto que en el colon los carbohidratos accesibles para las bacterias en su mayoría han sido absorbidos o consumidos, y el remanente lo componen polisacáridos no digeribles que muchas bacterias no pueden metabolizar. *Bacteroides* sí es capaz de degradar estos polisacáridos, adaptarse a

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

ellos y generar carbohidratos más simples que sí pueden asimilar otras muchas bacterias. Dicho todo esto, otro aspecto destacable es que la competición por los nutrientes entre miembros de la microbiota intestinal es mayor cuando los grupos de bacterias están más relacionados filogenéticamente, puesto que de esta manera comparten genes y capacidades funcionales (Wexler, 2017). Este hecho implicaría que la depleción del género *Bacteroides* evidenciada en los pacientes con CDI e individuos colonizados por *C. difficile* por muchos autores (Sangster, 2016; Vicent, 2013; Skraban, 2016), aunque no observada en nuestro estudio, podría tener menos influencia a priori en la pérdida de la resistencia a la colonización por mecanismos de competición de nutrientes, ya que está sería más acusada con la pérdida de miembros del *phylum* Firmicutes, en especial de la clase Clostridia, más cercanos filogenéticamente a *C. difficile*. Por consiguiente, el género *Bacteroides* podría ser más insustancial en este aspecto, aunque esté considerado un género beneficioso. Se ha observado en un modelo murino que *C. difficile* es capaz de degradar la mucina intestinal y metabolizar los ácidos siálicos que la componen (Ng, 2013). Esto le permitiría expandirse en el intestino y ocupar un nicho ecológico. Además, la disponibilidad de los ácidos siálicos de la mucosa intestinal existente tras una disbacteriosis post antibiótica permitiría y sería un factor importante en la expansión de *C. difficile* y debido a la gran actividad sobre los carbohidratos del género *Bacteroides*, el incremento transitorio post antibiótico de estos monosacáridos liberados desde la mucosa intestinal proporcionaría una oportunidad de expansión para *C. difficile*.

Por otra parte, *Bacteroides* es considerado beneficioso al respecto de su capacidad inmunomoduladora puesto que presentan la capacidad de activar las células dendríticas intestinales que inducen a las células plasmáticas de la mucosa intestinal a secretar IgA, que es una vía de defensa innata frente a patógenos oportunistas como *C. difficile* (He, 2007). Asimismo, algunas cepas de *Bacteroides* secretan bacteriocinas como la BSAP-1 (*Bacteroidales Secreted Antimicrobial protein 1*) (Wexler, 2017).

Con respecto a los estudios que han evaluado directamente la influencia de *Bacteroides* en la CDI, Yoon y col. demostraron que *Bacteroides ovatus* era capaz de inhibir *in vitro* el crecimiento de *C. difficile* y que este efecto estuvo mediado

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

por los ácidos biliares y por enzimas que secreta el género *Bacteroides* como la BSH que inhiben la germinación de *C. difficile*. La BSH actúa disminuyendo la reabsorción ácidos biliares desconjugados en el intestino, por tanto, los miembros que producen este enzima inhiben la proliferación de *C. difficile* mediante su efecto sinérgico con BaiCD (Yoon, 2017). Deng y col. observaron que mediante un tratamiento profiláctico bacterioterápico con *Bacteroides fragilis* se disminuía la mortalidad y morbilidad en ratones con CDI. Este hallazgo fue atribuido a la inhibición de la proliferación de *C. difficile*, modulación de la microbiota intestinal e inhibición de la destrucción de la barrera intestinal, mitigando el estrés epitelial y la colitis (Deng, 2018).

Bacteroides también es considerado un patógeno oportunista, ya que es agente etiológico de multitud de infecciones, principalmente intraabdominales. La adquisición de factores de virulencia es lo que provoca que un género comensal, miembro importante de la microbiota intestinal pueda ser en un momento dado un patógeno oportunista. El principal factor de virulencia es la presencia de polisacáridos capsulares (Coyne, 2001).

Por lo tanto, el género *Bacteroides* presenta una dualidad comensal y patógeno oportunista. Mediante estudios *in vitro* y en modelos murinos se ha evidenciado en algunas especies una capacidad para mitigar la CDI (Deng, 2018; Yoon, 2017). Presenta una actividad inmunomoduladora en procesos inflamatorios intestinales que podría limitar la respuesta inmune exacerbada que se observa en los pacientes con CDI (Hee, 2007). Por otra parte, *Bacteroides* presenta una inusual capacidad de reconocer y metabolizar una gran cantidad de polisacáridos provenientes de la dieta y del mismo hospedador. Es capaz de degradar estos polisacáridos, adaptarse a ellos y generar carbohidratos más simples que sí pueden asimilar otras muchas bacterias. Pero como la competición por los nutrientes entre miembros de la microbiota intestinal es mayor cuando los grupos de bacterias están más relacionados filogenéticamente (Wexler, 2017) implicaría que la depleción del género *Bacteroides* evidenciada en los pacientes con CDI e individuos colonizados por *C. difficile* por muchos autores (Sangster, 2016; Vicent, 2013; Skraban, 2016), aunque no observada en nuestro estudio, podría tener menos influencia a priori en la pérdida de la resistencia a la

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

colonización por mecanismos de competición de nutrientes, ya que está sería más acusada con la pérdida de miembros del *phylum* Firmicutes, en especial de la clase Clostridia, más cercanos filogenéticamente a *C. difficile*. Dicho todo esto, y puesto que *Bacteroides* es un género muy adaptable a diferentes condiciones ambientales, las abundancias relativas que encontramos en diferentes poblaciones son variables y eso ha dificultado encontrar asociación con ciertas situaciones patológicas (Johnson, 2017). Los trabajos que han estudiado la microbiota intestinal de la CDI, en distintas situaciones, podrían establecer que podría tratarse de un género protector, ya que la principal tendencia es la disminución de sus abundancias relativas en los pacientes con CDI. No obstante, en algunos trabajos como el Antharam y col. se observó un aumento de los niveles de *Bacteroides* en pacientes con CDI y con diarrea nosocomial no debida a *C. difficile* con respecto a los controles sanos (Antharam, 2013). En el trabajo de Han se encontraron niveles de *Bacteroides* muy parecidos entre pacientes con CDI, individuos colonizados por *C. difficile* y controles sanos (Han, 2019). Nuestros resultados van en la línea de estos hallazgos, con un aumento similar de *Bacteroides* en los pacientes con CDI y en los individuos colonizados con respecto a los controles sanos. Es llamativa la abundancia relativa tan baja de *Bacteroides* en el grupo de los controles sanos, así como también muy baja en el grupo de controles sanos de Antharam y col. Es posible la que perdida de diversidad y riqueza observado en los grupos CDI y P haya afectado en mayor medida al *phylum* Firmicutes con respecto a Bacteroidetes, y que debido a la baja abundancia relativa de *Bacteroides* en los controles sanos, pareciera que aumenta en los pacientes infectados y colonizados por *C. difficile*. Al encontrar este hallazgo en ambos grupos CDI y P, no se trata de un género que explique en parte la no transición desde un estado de colonización a infección, que se observa en los individuos colonizados de *C. difficile*.

6.3.3.2 Diferencias de composición en los géneros de la familia Tannerellaceae entre los grupos CDI y P con respecto al grupo CTRL.

En el grupo de pacientes con CDI se observa un aumento no estadísticamente significativo de la familia Tannerellaceae con respecto a los controles sanos (4.7% en CDI frente a 1.1% en CTRL). Este incremento es debido

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

en exclusiva al género *Parabacteroides*. Por otro lado, en el grupo de individuos colonizados por *C. difficile* se observa otro aumento de menor medida que el encontrado en el grupo CDI, estadísticamente significativo (2.3% en P frente a 1.1% en CTRL), también a expensas totalmente de dicho género. La diferencia entre los grupos CDI y P no es estadísticamente significativa. Dentro de la abundancia relativa del género *Parabacteroides* en el grupo CDI, un 2.7% comprende a la especie *Parabacteroides merdae* y el 2.0% es *Parabacteroides spp.* Con respecto al grupo de los individuos colonizados, un 1.0% pertenece a la especie *P. merdae* y el 1.3% es *Parabacteroides spp.*

Pocos trabajos han destacado la importancia del género *Parabacteroides* con respecto a su papel en la patogénesis de la CDI. Rea y col. mostraron que *Parabacteroides* era el género dominante en 2 pacientes ancianos con CDI (97.4% y 61.5% frente al 15.0% en el grupo control y 8.5% en 20 portadores asintomáticos de *C. difficile*) (Rea, 2001). Zhang y col. encontraron que *Parabacteroides* presentaba un aumento estadísticamente significativo en pacientes con CDI (10%) y portadores asintomáticos de *C. difficile* (15%) (Zhang, 2015). Han y col. obtuvieron que *Parabacteroides* presentó un incremento estadísticamente significativo en pacientes con CDI (3.8%) y en individuos colonizados (5.0%) con respecto a los controles sanos (1.3%) (Han, 2019). Lo único que se ha aportado en la discusión de estos trabajos es que posiblemente este incremento sea debido a un fenómeno de expansión debido a una pérdida de mecanismos de resistencia a la colonización por competición de los nutrientes, es decir, por la aparición de nuevos nichos ecológicos. En el trabajo de Shahinas y col, se observó que *Parabacteroides* aumentaba de forma significativa de forma posterior a un FMT en 6 pacientes con CDI (Shahinas, 2012). Por lo tanto, estamos ante un género que suele presentar abundancias relativas incrementadas tanto en pacientes con CDI y en individuos colonizados por *C. difficile*, en mayor o menor medida. Esto estaría en la misma línea que nuestros resultados. Además, el incremento suele ser mayor en los colonizados que en los infectados, aunque en nuestro estudio ocurre lo contrario.

Parabacteroides es un género de nueva creación compuesto por bacilos Gram negativos, anaerobios estrictos, no formadores de esporas, inmóviles,

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

sacarolíticos, cuyos mayores metabolitos producidos son el ácido acético y el ácido succínico (Sakamoto, 2006).

En el trabajo de Khanna y col. donde compararon la microbiota intestinal de pacientes con CDI con y sin recurrencia posterior, evidenciaron que el género *Parabacteroides* era un predictor muy potente de recurrencia (Khanna, 2016a). Por otra parte, *Parabacteroides diastonis* es una especie productora de succinato como principal metabolito. En un modelo murino se observó que el succinato está presente en muy baja concentración en el intestino y que se elevaba de forma transitoria después de administración antibiótica o después de un tratamiento que alterara el tránsito intestinal. *C. difficile* era capaz de expandirse utilizando como fuente de energía este succinato más accesible. Con este trabajo se intentó identificar el mecanismo subyacente por el cual *P. diastonis* es predictor de recurrencia (Ferreira, 2014). Por otra parte, *P. diastonis* es capaz de potenciar la colitis en ratones con disbacteriosis y con la microbiota intestinal intacta, por lo tanto, este trabajo evidencia su poder patógeno por sí mismo (Dziarski, 2016). En otro trabajo donde se estudió la microbiota intestinal en ratones infectados con *C. difficile* ribotipo 027, que desarrollaron una infección crónica más contagiosa durante un mayor periodo de tiempo, se observó que *P. diastonis* era una especie patógena oportunista importante. Los autores también observaron que el perfil de los AGCC estaba alterado con una disminución de butirato y acetato y un incremento del succinato, que correlacionó con la presencia de *P. diastonis* (Lawley, 2012). Por último, *P. diastonis* ha sido recientemente evidenciada como la especie más representada en una cohorte de pacientes con enfermedad de Crohn (Lopetuso, 2017).

Como conclusión, tenemos muchas evidencias de que *Parabacteroides* es un género patógeno oportunista que se expande cuando se genera una disbacteriosis intestinal y que colabora en la clínica observada en varios trastornos intestinales. Hemos dicho que *P. diastonis* es capaz de potenciar la colitis en ratones con disbacteriosis y con la microbiota intestinal intacta (Dziarski, 2016). Con respecto a la CDI hemos visto que el succinato, principal metabolito de *P. diastonis*, permite la expansión de *C. difficile*, ya que es utilizado por este como fuente de energía (Ferreira, 2014). La bibliografía revisada nos ha mostrado que *Parabacteroides*

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

presenta elevadas abundancias relativas tanto en pacientes con CDI como en individuos colonizados por *C. difficile*, aunque la tendencia es que el aumento es mayor en los colonizados (Zhang, 2015; Han, 2019). No obstante, nuestros resultados indican un aumento en ambos grupos de pacientes, aunque es mayor en los pacientes con CDI. Concluimos que es un género característico de la CDI y marcador de la disbacteriosis presente tanto en individuos colonizados como infectados. Es difícil apresurarse a decir que es un género que diferencia el estado de los infectados y de los colonizados, ya que a raíz de sus mecanismos subyacentes en la patogénesis de la CDI y de la bibliografía al respecto, harían falta estudios metagenómicos para concretar que especies están en juego.

6.3.3.3 Diferencias de composición en los géneros de la familia Prevotellaceae entre los grupos CDI y P con respecto al grupo CTRL.

En el grupo de pacientes con CDI se observa un descenso estadísticamente significativo de la familia Prevotellaceae con respecto a los controles sanos (2.0% en CDI frente a 2.5% en CTRL). Por otro lado, en el grupo de individuos colonizados por *C. difficile* se observa otro descenso estadísticamente significativo (1.4% en P frente a 2.5% en CTRL), aunque más pronunciado que el encontrado en el grupo CDI. La diferencia entre los grupos CDI y P no es estadísticamente significativa. A nivel de género de esta familia destacan la práctica erradicación de *Prevotella 9* en los pacientes con CDI con respecto a controles sanos que no se observa en los colonizados (0.0213% en CDI frente a 1.8% en CTRL y 1.3% en P), la expansión de *Prevotella 7* en el grupo CDI que no se observa en los controles sanos ni en el grupo P (1.2% en CDI frente a 0.0003% en CTRL y 0.0% en P), el aumento de *Paraprevotella* en los pacientes con CDI y el descenso en los individuos colonizados con respecto a los controles sanos (0.4986% en CDI y 0.0473% en P frente a 0.1805% en CTRL).

La pérdida del género *Prevotella* y de otros miembros de la familia Prevotellaceae en los pacientes con CDI es un hallazgo evidenciado en muchos trabajos (Vincent, 2013; Skraban, 2013; Rea, 2012). No obstante, en trabajos donde se ha comparado la microbiota intestinal de pacientes con CDI e individuos colonizados por *C. difficile* también se ha evidenciado esta pérdida en los

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

colonizados. Zhang y col. encontraron una pérdida más pronunciada en *Prevotella* en los portadores asintomáticos, rozando la erradicación, que en los pacientes con CDI, cuando se compararon los datos de ambos grupos con respecto a los controles sanos donde su abundancia relativa fue entorno al 5% (Zhang, 2015). En el trabajo de Han y col. con 58 pacientes con CDI, 21 individuos colonizados y 20 controles sanos, también se evidenció una pérdida de *Prevotella* en infectados (1.4%) y colonizados (0.6%) con respecto a los controles sanos (8.2%), aunque de nuevo más profunda en colonizados (Han, 2019). En el grupo de 12 portadores asintomáticos del estudio de Dong y col. también observaron una práctica erradicación de *Prevotella* en estos con respecto a los controles sanos (0.03% frente a 5.53%). Los autores expusieron la hipótesis de que *Prevotella* es un género que protegería al hospedador frente a la colitis inflamatoria producida por patógenos debido a su papel en la digestión de carbohidratos complejos y a la producción de sustratos esenciales para el colonocito (Dong, 2018). Discutiremos esto más adelante porque existe una dualidad de efectos beneficiosos y efectos proinflamatorios.

El género *Prevotella* está comprendido por bacterias Gram negativas, anaerobias, no formadoras de esporas, inmóviles, moderadamente sacarolíticas cuyos principales metabolitos glucolíticos son el acetato y el succinato, aunque generan bajos niveles de otros AGCC. *Prevotella copri* es la principal especie componente de la microbiota intestinal (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2012). Los géneros que manejamos en nuestro estudio, *Prevotella 7* y *Prevotella 9*, provienen de la base de datos que utilizamos para asignar las secuencias SILVA con el fin de incrementar la resolución de la familia Prevotellaceae (Henderson, 2019). Este género presenta más de 40 especies, casi todas ellas se ubican en la cavidad oral y algunas forman parte de la microbiota intestinal.

La abundancia relativa de *Prevotella* como componente de la microbiota intestinal parece estar influenciada por la dieta. Es más común en dietas ricas en vegetales y se correlacionado con el vegetarianismo (Wu, 2011). Aunque otro trabajo ha evidenciado que el efecto de simples ingredientes de la dieta sobre *Prevotella* no es fácilmente predecible (Singh, 2017). Otro hecho importante es que

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

Bacteroides y *Prevotella* son antagónicos, es decir, o predomina uno o predomina otro, debido a fenómenos de competición por los nutrientes (Kovatcheva-Datchary, 2015). Asimismo, los miembros del género *Prevotella* se adaptan a los cambios ambientales y nutricionales de la microbiota intestinal modulando la expresión génica y adquiriendo y perdiendo genes (Gupta, 2015). Esto supone que sea un género con una gran diversidad génica y que exista una gran variabilidad en las cepas, lo que es probable que explique la diferente respuesta de *Prevotella* a la dieta o a diversas condiciones. Estos datos podrían sugerir que se trata de un grupo beneficioso, pero también se ha asociado a procesos inflamatorios. Algunos estudios han demostrado que en los pacientes infectados con VIH existe una disbiosis intestinal caracterizada por un incremento de *Prevotella* y un descenso de *Bacteroidetes* (Luzupone, 2013). Incluso se ha sugerido que *Prevotella* sea la causa principal de la inflamación intestinal persistente observada en estos pacientes y que esto conduzca a una alteración funcional de la mucosa intestinal e inflamación sistémica crónica (Dillon, 2014). Por lo tanto, algunas cepas de *Prevotella* se comportan como patobiontes proinflamatorios y se expanden en un ambiente inflamatorio, exhibiendo una capacidad intrínseca superior de estimular los linfocitos Th17, comparada con otros miembros comensales de la microbiota intestinal (Larsen, 2017). Por otra parte, se ha evidenciado en ratones tratados con antibióticos que la adición de *P. copri* incrementa la susceptibilidad a la colitis inducida por dextrato sulfato sódico. La hipótesis de los autores del estudio fue similar a las del trabajo de Dillon y col., es decir, *P. copri* podría haberse expandido en un ambiente proinflamatorio y exacerbar la misma inflamación (Scher, 2013). No obstante, se requieren más estudios en humanos para caracterizar el rol de *Prevotella* en las distintas patologías donde se ha visto que se incrementan sus abundancias relativas. Pero *Prevotella* no solo exhibe siempre propiedades proinflamatorias, debemos hablar solo de especies y cepas específicas de este género con esta capacidad de patobionte.

Por otra parte, como ya comentamos cuando discutíamos el papel de *Parabacteroides* en la CDI, en un modelo murino se observó que el succinato está presente en muy baja concentración en el intestino y que se elevaba de forma transitoria después de administración antibiótica o después de un tratamiento

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

que alterara el tránsito intestinal. *C. difficile* era capaz de expandirse utilizando como fuente de energía este succinato más accesible (Ng, 2013). *Prevotella*, al igual que *Parabacteroides* es un género cuyo principal metabolito generado es el succinato. Podría permitir o ayudar en la expansión de *C. difficile* mediante el mismo mecanismo. Por otra parte, *P. copri* es capaz de potenciar la colitis en ratones tanto con disbacteriosis como con la microbiota intestinal intacta, por lo tanto, se evidencia su poder patógeno por sí mismo (Dziarski, 2016).

Por consiguiente, en nuestro estudio observamos una disminución de la familia Prevotellaceae en los grupos CDI y P, aunque más pronunciado en P. En el género *Prevotella 9* en los pacientes con CDI se produce una práctica erradicación con respecto a controles sanos que no se observa en los colonizados que conservan una gran parte. Con respecto a *Prevotella 7* en el grupo CDI se observa una expansión que no se observa en los controles sanos ni en el grupo P. Como hemos explicado anteriormente, *Prevotella* es un género con una gran diversidad genética y con mucha variabilidad funcional en sus especies y cepas. Algunas de estas tienen un efecto beneficioso ya que participan en la digestión de carbohidratos complejos, pero otras se comportan como patobiontes proinflamatorios. Además, el hecho que el género *Prevotella* sea productor de succinato podría favorecer la expansión intestinal de *C. difficile* (Ng, 2013). El hecho que *Prevotella* y Prevotellaceae esté disminuido en pacientes con CDI es un hallazgo evidenciado en varios trabajos y no se suelen encontrar resultados contradictorios, por lo cual es un marcador de disbacteriosis en estos pacientes (Vincent, 2013; Skraban, 2013; Rea, 2012). En individuos colonizados por *C. difficile* se han encontrado abundancias relativas de *Prevotella* aun más bajas que las que presentan los pacientes con CDI (Zhang, 2015; Han, 2019). En nuestro estudio ocurre lo mismo, la depleción es mayor en colonizados. Esto podría tener una explicación. El género *Prevotella 9* que está erradicada en el grupo CDI, aunque sin embargo se conserva en los colonizados y en los controles sanos, podría comprender a grupos beneficiosos, de los que se verían privados los pacientes con CDI y no los controles sanos ni los colonizados. Por otra parte, el género *Prevotella 7* que se expande en los pacientes con CDI y se mantiene erradicado en los controles sanos y en los colonizados, podría comprender a esas especies patobiontes proinflamatorias. Debido a la pérdida de miembros del *phylum*

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

Firmicutes y de grupos productores de butirato se produciría un ambiente intestinal proinflamatorio, que permitiría la expansión de especies comprendidas en el género *Prevotella 7* en los pacientes con CDI. Esto por alguna razón no dilucidada no ocurriría en los individuos colonizados por *C. difficile*. Por tanto, si mediante estudios metagenómicos se identifican especies y cepas beneficiosas y proinflamatorias podríamos encontrar un biomarcador que explique en parte la diferencia entre el estado de colonización e infección. No obstante, los niveles de *Prevotella 7* y *Prevotella 9* nos parece un buen punto de partida para ello.

Con respecto al género *Paraprevotella* ya hemos visto que es un grupo minoritario de la microbiota intestinal de los controles sanos (0.1805%). Asimismo, se produce una disminución en los individuos colonizados por *C. difficile* (0.0473%) y un aumento en los pacientes con CDI (0.4986%). En ambos casos se trata de diferencias estadísticamente significativas. El aumento de este género en pacientes con CDI ha sido documentado por Milani y col. (0.24% en CDI con respecto a 0.1% en una cohorte de individuos que no han recibido administración antibiótica) (Milani, 2016). No obstante, Han y col. observaron una erradicación de *Paraprevotella* en pacientes con CDI y en individuos colonizados con respecto a los controles sanos (0.10% en CDI y 0.04% en P frente a 0.48% en controles sanos) (Han, 2019)

El género *Paraprevotella* comprende dos especies, *Paraprevotella clara* y *Paraprevotella xylaniphila*. Se trata de bacterias Gram negativas, no formadoras de esporas, inmóviles, anaerobios estrictos, con el succinato y el acetato como principales productos de fermentación (Moritoni, 2009). El hecho de que sea un género productor de succinato podría permitir la expansión de *C. difficile* (Ng, 2013), como explicamos con el género *Prevotella*. Se ha evidenciado en algunas enfermedades como la enfermedad de Behcet o la cirrosis biliar primaria, una expansión de *Paraprevotella* en la microbiota intestinal de estos pacientes (Ye, 2018; Lv, 2016). Los autores de estos estudios han postulado que este género podría provocar una respuesta inmune exacerbada y provocar un daño tisular en la barrera intestinal epitelial.

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

Por consiguiente, aunque *Paraprevotella* es un género poco estudiado y mencionado en su relación con la patogénesis de la CDI, en base a nuestros resultados y su asociación con otras enfermedades, postulamos que podría tratarse de un género que favorecería la creación de un ambiente inflamatorio que ayudaría a desencadenar una respuesta inmune exacerbada en los pacientes con CDI y a aumentar el daño tisular. Asimismo, la no expansión de este género en los individuos colonizados por *C. difficile* resultaría beneficioso para evitar el desarrollo de clínica.

6.3.3.4 Diferencias de composición en los géneros de la familia Rikenellaceae entre los grupos CDI y P con respecto al grupo CTRL.

En el grupo de pacientes con CDI y en el grupo de sujetos colonizados por *C. difficile* no se observan diferencias estadísticamente significativas en las abundancias relativas de la familia Rikenellaceae con respecto a los controles sanos (2.9% en CDI y 2.8% en P frente a 2.6% en CTRL). Asimismo, tampoco hay diferencias significativas entre los grupos CDI y P. El género más representativo de esta familia en los tres grupos de estudio es *Alistipes*. Por consiguiente, podemos considerar que la abundancia relativa de *Alistipes* en los 3 grupos de estudio es similar y presenta una abundancia relativa cercana al 3%.

Alistipes es un género que diversos autores han puesto en valor en cuanto a que se trata de un grupo protector de la CDI. Milani y col. destacaron que la pérdida de *Alistipes*, junto con la expansión de *Enterococcus*, conforman un suceso previo que conllevaría a la cascada de eventos que provoca la pérdida de resistencia a la colonización que se observa en los pacientes con CDI (Milani, 2016). Este descenso de la abundancia relativa de *Alistipes* observada en el trabajo de Milani desde el 11% de los controles sanos hasta el 1.25% en los pacientes con CDI, ha sido corroborada por otros trabajos (Gu, 2016). Shahinas y col. también observaron que la abundancia relativa de *Alistipes* se restauraba en los pacientes sometidos a FMT con éxito (Shahinas, 2012). Por otra parte, Zhang y col. evidenciaron una pérdida de *Alistipes* tanto en pacientes infectados como en individuos colonizados por *C. difficile*, con respecto a los controles sanos (Zhang, 2015). No obstante, Han y col. observaron abundancias relativas similares de

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

Alistipes en pacientes con CDI y en controles sanos, mientras que se observó un leve aumento en los individuos colonizados (Han, 2019). El trabajo de Han y col. pondría en valor la hipótesis de Milani al respecto de que *Alistipes* es un grupo que confiere protección frente a la CDI, puesto que presenta un aumento en los individuos colonizados por *C. difficile*. Nuestros resultados son discrepantes a este respecto, puesto que no encontramos diferencias significativas entre los pacientes infectados, individuos colonizados y los controles sanos. Por tanto, no podríamos concluir con nuestros resultados que es un grupo protector, sino más bien intrascendente.

La familia Rikenellaceae es fenotípicamente diversa y engloba a dos géneros que son *Alistipes* y *Rikenella*. *Alistipes* es componente de la microbiota intestinal en humano mientras que *Rikenella* es más frecuente en animales. *Alistipes* es un género compuesto por bacterias Gram negativas, anaerobias estrictas, no formadoras de esporas e inmóviles, cuyo principal producto de fermentación es el ácido succínico y en menor medida el ácido acético. Su poder patógeno es controvertido, se ha aislado en algunos cultivos de infecciones polimicrobianas junto a otros gérmenes anaerobios, pero no hay consenso acerca de su potencial patogenicidad (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2012).

Como hemos expuesto anteriormente, *Alistipes* y su pérdida en los pacientes con CDI es un hallazgo que muchos autores han remarcado. A partir de aquí se ha supuesto que se trata de un grupo protector. Otros estudios han evaluado este poder protector. Schubert y col. en un estudio con ratones y aplicando un modelo estadístico *random forest*, identificaron una serie de grupos de bacterias que restauraron la resistencia a la colonización que se perdería con la administración antibiótica, y entre estos se encontraba el género *Alistipes* (Schubert, 2014). También se ha evidenciado mediante otro estudio que *Alistipes finegoldii* atenuó la colitis inducida por dextrano sulfato sódico en ratones (Dziarski, 2016). Asimismo, en un reciente metanálisis que tuvo por objetivo identificar biomarcadores de la microbiota intestinal en distintas patologías intestinales incluida la CDI, se ha correlacionado a *Alistipes* con un estado de salud (Mancabelli, 2017). Por otra parte, como ya comentamos con otros géneros

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

productores de succinato, en estudios con ratones se ha observado que el succinato está presente en muy baja concentración en el intestino y que se elevaba de forma transitoria después de administración antibiótica y *C. difficile* era capaz de expandirse utilizando como fuente de energía este succinato más accesible en esta nueva situación (Ng, 2013). *Alistipes*, de forma similar a *Prevotella* y *Parabacteroides*, podría permitir o ayudar en la expansión de *C. difficile* mediante el mismo mecanismo.

Por consiguiente, los trabajos realizados al respecto del estudio de la microbiota intestinal en la CDI y también, los trabajos experimentales con modelos murinos nos sugieren que el género *Alistipes* se asocia con un estado de salud y que resultaría protector de la CDI. No obstante, nuestros resultados mostrarían que *Alistipes* es un género irrelevante, puesto que no observamos diferencias significativas ni fehacientes entre los grupos de infectados y colonizados por *C. difficile* y los controles sanos. Lo lógico hubiese sido evidenciar una pérdida de *Alistipes* en los pacientes con CDI y una conservación en el grupo P con respecto a los controles sanos. Es difícil dar una explicación a este hecho. Sabiendo que existe una variabilidad interindividual en la microbiota intestinal de la población sana mientras que las interrelaciones metabólicas permanecen estables, la microbiota intestinal funcionaría como un ecosistema dinámico que ejerce funciones metabólicas, fisiológicas, inmunológicas y de protección frente a patógenos (Hollister, 2014). Por lo tanto, podemos formular la hipótesis por la cual la cual *Alistipes* podría presentar en nuestra cohorte de controles sanos unos niveles reducidos de partida puesto que otros grupos de bacterias ejercerían sus funciones protectoras, y por ello no observaríamos un descenso en su abundancia relativa en los pacientes con CDI.

6.3.3.5 Diferencias de composición en los géneros de la familia *Barnesiellaceae* entre los grupos CDI y P con respecto al grupo CTRL.

En el grupo de pacientes con CDI se observa un aumento no estadísticamente significativo de la familia *Barnesiellaceae* con respecto a los controles sanos (0.8% en CDI frente a 0.4% en CTRL). Este incremento es debido al género *Barnesiella*. Por otro lado, en el grupo de individuos colonizados por *C.*

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

difficile se observa una reducción estadísticamente significativa (0.2% en P frente a 0.4% en CTRL), también a expensas totalmente de dicho género. La diferencia entre los grupos CDI y P no es estadísticamente significativa.

El género *Barnesiella* comprende a dos especies, *Barnesiella viscericola* y *Barnesiella intestinihominis*. Se trata de bacilos Gram negativos, no formadores de esporas, inmóviles, anaerobios estrictos, de metabolismo fermentativo estrictamente sacarolítico cuyos principales metabolitos son el ácido succínico y acético (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2012). Se trata de un género minoritario en la microbiota intestinal humana, normalmente por debajo del 1%.

Pocos estudios han intentado evidenciar el rol de *Barnesiella* como componente de la microbiota intestinal. Con respecto a la patogénesis de la CDI apenas hay dos trabajos que destacaron su importancia. Milani y col. observaron una reducción de *Barnesiella* desde el 1.27% en sujetos que no recibieron administración antibiótica como controles sanos frente al 0.11% en pacientes con CDI (Milani, 2016). Estos autores no destacaron su rol como posible grupo protector. Schubert y col. en un modelo murino observaron una expansión de *Barnesiella* tras la restauración de la microbiota intestinal al administrar metronidazol a ratones, a los que previamente se les había administrado 7 antibióticos diferentes y posteriormente esporas de *C. difficile* (Schubert, 2015). De estos dos estudios deduciríamos que *Barnesiella* colabora en la eliminación de *C. difficile*, pero se requerirían más evidencias. Por otra parte, al ser *Barnesiella* un género productor de succinato, y al haberse evidenciado que *C. difficile* puede ser capaz de expandirse utilizando como fuente de energía este succinato más accesible en esta nueva situación (Ng, 2013), *Barnesiella*, de forma similar a *Prevotella*, *Parabacteroides* y *Alistipes*, podría permitir o ayudar en la expansión de *C. difficile* mediante el mismo mecanismo.

Hemos dicho anteriormente que pocos estudios han intentado evidenciar el rol de *Barnesiella* como componente de la microbiota intestinal. Vamos a exponer algunos para intentar intuir su rol. En un metanálisis que tuvo por objetivo identificar biomarcadores de la microbiota intestinal en distintas patologías intestinales incluida la CDI, se ha correlacionado a *Barnesiella* con un

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

estado de salud (Mancabelli, 2017). Otros estudios, tanto en humanos como en ratones, han demostrado que una microbiota intestinal rica en *Barnesiella* inhibe la proliferación o la colonización de VRE (Ubeda, 2013). Asimismo, se ha descrito papel inmunomodulador anticanceroso de *B. intestinihominis* ya que actuaría modulando la respuesta inmune en este proceso (Daillère, 2016). No obstante, se ha evidenciado que *Barnesiella* estaba anormalmente elevada en infectados por VIH con respecto a controles sanos no infectados (Dinh, 2015).

Nuestros resultados no concuerdan con los de Milani y col. (Milani, 2016), pero podemos afirmar que nuestro estudio es el primer trabajo que expone las abundancias relativas de *Barnesiella* en individuos infectados y colonizados por *C. difficile*. Si bien no existen diferencias significativas entre ambos grupos, nuestros resultados muestran una reducción de *Barnesiella* en grupo P y un aumento en el grupo CDI. A pesar de que la escasa bibliografía al respecto del rol de *Barnesiella* como miembro minoritario de la microbiota intestinal, se podría aventurar que es un género con propiedades beneficiosas para la salud, aunque por mecanismos aún desconocidos. Por tanto, no podemos sacar conclusiones fehacientes de nuestros resultados y concluimos que *Barnesiella* tiene un papel irrelevante en la patogénesis de la CDI y que se requieren más estudios a este respecto.

6.3.3.6 Diferencias de composición en los géneros de la familia Marinifilaceae entre los grupos CDI y P con respecto al grupo CTRL.

En el grupo de pacientes con CDI se observa un aumento no estadísticamente significativo de la familia Marinifilaceae con respecto a los controles sanos (1.0% en CDI frente a 0.3% en CTRL). Este incremento es debido en la práctica al género *Odoribacter*. Por otro lado, en el grupo de individuos colonizados por *C. difficile* se observa una reducción no estadísticamente significativa (0.2% en P frente a 0.3% en CTRL). La diferencia entre los grupos CDI y P no es estadísticamente significativa (1.0% en CDI frente a 0.2% en P). Por lo tanto, se observa un incremento moderado en la abundancia relativa de *Odoribacter* no estadísticamente significativa con respecto a los individuos colonizados por *C. difficile* y los controles sanos.

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

El género *Odoribacter* está compuesto por bacilos Gram negativos, anaerobios estrictos, inmóviles, no formadores de esporas, cuyos mayores productos de fermentación son el ácido acético, succínico y propiónico (Hardham, 2008). Consta de 3 especies, *Odoribacter denticanis*, *Odoribacter laneus* y *Odoribacter splanchnicus*, que son frecuentemente componentes minoritarios de la microbiota intestinal. Podríamos considerarlo un patógeno oportunista, aunque solo ha sido aislado en abscesos abdominales secundarios a intervenciones quirúrgicas en humanos (Göker, 2011).

En el contexto de la CDI pocos trabajos han puesto en valor la presencia o ausencia de *Odoribacter*. Milani y col. evidenciaron una reducción en la abundancia relativa de *Odoribacter*, prácticamente una erradicación, en pacientes con CDI (0.03%) con respecto a sujetos que no recibieron administración antibiótica previa como controles sanos (1.27%) (Milani, 2016). Han y col. también observaron en 58 pacientes con CDI (0.05%) una erradicación de *Odoribacter* con respecto a los controles sanos (0.46%). Por otra parte, en 21 sujetos colonizados por *C. difficile* (0.53%) no se evidenció apenas diferencia con respecto a los controles sanos, por tanto, se conservaba en los colonizados y se perdía en los infectados. Además, los autores destacaron que *Odoribacter* no es detectable en muchas de las muestras de los pacientes con CDI, cosa que no ocurre en los controles sanos (Han, 2019). Por otra parte, Brown y col. estudiando la restauración de la microbiota intestinal y las modificaciones de los ácidos biliares en heces en 10 pacientes con CDI sometidos a FMT, observaron que *Odoribacter* estuvo correlacionado negativamente de forma significativa con los ácidos biliares primarios, y de forma positiva con los ácidos biliares secundarios, de forma que provocaría la inhibición de la germinación de las esporas de *C. difficile* (Brown, 2018). Por lo tanto, aunque pocos son los trabajos al respecto de la patogénesis de la CDI que citan a *Odoribacter* parecería que van en la línea de que se trate un grupo protector.

Asimismo, en estudios sobre la microbiota intestinal en la enfermedad de Crohn se ha visto que *Odoribacter* presenta bajas abundancias relativas sobre todo en casos graves de colitis ulcerativa (Morgan, 2012b). En otro ensayo clínico aleatorizado con un probiótico en pacientes con síndrome de colon irritable, se

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

evidenció que pacientes con mejoría en los marcadores inflamatorios presentaron una mayor abundancia relativa de *Odoribacter* que los no respondedores (Hod, 2018).

En consecuencia, los pocos trabajos al respecto nos indicarían que el género *Odoribacter* conferiría protección frente a la CDI al intervenir en los mecanismos de resistencia a la colonización (Brown, 2018). Asimismo, mediante mecanismos desconocidos parece tener efectos antiinflamatorios (Hod, 2018). No obstante, nuestros resultados nos muestran un ligero aumento de la abundancia relativa de *Odoribacter* en los pacientes con CDI con respecto a los controles sanos y los individuos colonizados por *C. difficile*. Por tanto, en base a esto no podemos extraer dichas conclusiones y lo consideramos un género a seguir investigando. Además, al ser *Odoribacter* un género productor de succinato, y al haber evidencia que *C. difficile* puede ser capaz de expandirse utilizando como fuente de energía el succinato (Ng, 2013), *Odoribacter*, de forma similar a *Prevotella*, *Parabacteroides*, *Alistipes* y *Barnesiella*, podría permitir o ayudar en la expansión de *C. difficile* mediante el mismo mecanismo. También hemos de tener en cuenta la variabilidad interindividual en la microbiota intestinal de la población sana, donde se ha visto que las interrelaciones metabólicas permanecen estables, puesto que la microbiota intestinal es un ecosistema dinámico que ejerce funciones metabólicas, fisiológicas, inmunológicas y de protección frente a patógenos (Hollister, 2014). Por lo tanto, podemos formular la hipótesis mediante la cual *Odoribacter* podría presentar en nuestra cohorte de controles sanos unos niveles reducidos, puesto que otros grupos de bacterias ejercerían sus funciones protectoras, y por ello no observaríamos un descenso en su abundancia relativa en los pacientes con CDI, tal como explicamos para el género *Alistipes*.

6.3.4 Diferencias de composición a nivel de familia y género pertenecientes al *phylum* Proteobacteria entre los grupos CDI y P con respecto al grupo CTRL.

En el apartado 6.3.1 “Diferencias de composición a nivel de *phylum*” discutimos el incremento en las abundancias relativas que se observa en el *phylum* Proteobacteria en ambas cohortes de pacientes con CDI e individuos colonizados

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

por *C. difficile* con respecto a los controles sanos. Ahora vamos a discutir a costa de que familias y géneros es debida estos aumentos.

Las diferencias a nivel de familia que consideramos más significativas en el grupo CDI con respecto a controles sanos son las siguientes:

- Aumento no estadísticamente significativo en la familia Enterobacteriaceae (10.6% en CDI frente a 3.0% en CTRL), aunque la p es 0.0521 y de la familia Burkholderiaceae (3.1% en CDI frente a 0.3% en CTRL).

Por otra parte, las diferencias a nivel de familia que consideramos más significativas en el grupo P con respecto a controles sanos son las siguientes:

- Aumento no estadísticamente significativo en la familia Enterobacteriaceae (14.7% en P frente a 3.0% en CTRL), aunque la p es 0.0770, y de la familia Burkholderiaceae (1.2% en P frente a 0.3% en CTRL).

Por consiguiente, en ambos grupos observamos un incremento en la abundancia relativa de las familias Enterobacteriaceae y Burkholderiaceae, si bien es algo más pronunciado en el grupo de los individuos colonizados por *C. difficile*.

6.3.4.1 Diferencias de composición en los géneros de la familia Enterobacteriaceae entre los grupos CDI y P con respecto al grupo CTRL.

El aumento en la abundancia relativa de la familia Enterobacteriaceae en el grupo de pacientes con CDI es debido a los incrementos no estadísticamente significativos de los géneros *Escherichia/Shigella* (9.2% en CDI frente a 2.5% en CTRL) y *Proteus* (0.8% en CDI frente a 0.0% en CTRL), con respecto a los controles sanos. Por otra parte, en el grupo de los individuos colonizados por *C. difficile* observamos un incremento ligeramente superior de *Escherichia/Shigella* (10.6% en P frente a 2.5% en CTRL) y de *Klebsiella* (3.6% en P frente a 0.3% en CTRL), con respecto a los controles sanos. Este incremento de *Klebsiella* en el grupo P no se observa en el grupo CDI y el de *Proteus* del grupo CDI tampoco se observa en P.

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

El incremento de la familia Enterobacteriaceae a expensas del género *Escherichia/Shigella* es un hallazgo frecuente en los pacientes con CDI. Milani y col. observaron un aumento hasta el 10.7% en pacientes con CDI con respecto a un grupo de individuos que no habían recibido administración antibiótica como controles sanos (Milani, 2016), que presentaron una abundancia relativa del 0.9%, de forma similar a nuestros resultados. Además, en este trabajo se observó un llamativo incremento de *Klebsiella* al 14.3% en el grupo de los pacientes con CDI desde el 0.12% de los controles sanos (Milani, 2016). Gu y col. corroboraron el aumento en la familia Enterobacteriaceae y del género *Escherichia/Shigella* obtenido mediante secuenciación masiva del ADNr 16S, mediante estudios metagenómicos para la detección de la especie *Escherichia coli*, que estaba muy incrementada con respecto a los controles sanos (Gu, 2016). De esta forma se evidenció que la principal especie responsable del incremento del género *Escherichia/Shigella* (géneros indiferenciables mediante secuenciación masiva del ADNr 16S) en los pacientes con CDI es mayoritariamente *E. coli*. Por otra parte, en trabajos donde se ha estudiado la microbiota intestinal en pacientes con CDI antes y después de un FMT, se ha observado que el éxito del FMT conlleva una erradicación o dramática disminución de la familia Enterobacteriaceae y de géneros como *Escherichia/Shigella*, *Proteus* y *Klebsiella* (Weingarden, 2014; Shahinas, 2012; Brown, 2018).

Nuestros resultados muestran un incremento, además de en los pacientes con CDI, en los individuos colonizados por *C. difficile*. Este hecho también ha sido observado en algunos de los pocos trabajos que han incluido una cohorte de sujetos colonizados. Han y col. evidenciaron un incremento de la familia Enterobacteriaceae en pacientes infectados (28.1%) y en individuos colonizados (27.8%) con respecto a los controles sanos (13.7%) (Han, 2019). Zhang y col. observaron un incremento menor de *Escherichia/Shigella* en un grupo de individuos colonizados por *C. difficile* (8.7%) con respecto a los pacientes con CDI (23.9%), aunque superior de forma significativa que los controles sanos (3.6%) (Zhang, 2015). Además, observaron un incremento de *Klebsiella* en ambos grupos de pacientes, aunque fue ligeramente mayor en los pacientes con CDI, pero sin alcanzar el 5% (Zhang, 2015). Rea y col. solo observaron el incremento de Enterobacteriaceae en 2 pacientes con CDI ribotipo 027 y no en 22 individuos

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

colonizados (Rea, 2012). Por otra parte, Dong y col. en 12 pacientes colonizados por *C. difficile* obtenidos de la comunidad al realizar un screening poblacional no evidenciaron incrementos significativos de *Escherichia/Shigella* (Dong, 2018).

La familia Enterobacteriaceae es un grupo heterogéneo de bacilos Gram negativos, aeróbicos o anaeróbicos facultativos, no formadores de esporas, móviles o inmóviles, quimiorganótrofos de metabolismo fermentativo o respiratorio. El género *Escherichia/Shigella* coincide con estas características y presenta 5 especies; *E. coli*, *E. hermannii*, *E. fergusonii*, *E. vulneris* y *E. blattae* (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2012). Vamos a asumir que el incremento de *Escherichia/Shigella* ocurre a expensas de la especie *E. Coli* de forma mayoritaria, puesto que ya se ha evidenciado este hecho mediante estudios metagenómicos (Gu, 2016).

E. coli es miembro de la microbiota intestinal de cualquier mamífero y por supuesto del ser humano. Es una de las primeras especies que coloniza a los niños y es un colonizador duradero en los adultos (Palmer, 2007). *E. coli* es eliminado por las heces del hospedador y persiste en el medio ambiente, donde no prolifera. La colonización se produce por la ingesta de bacterias viables en aguas o alimentos contaminados. *E. coli* alcanza el tracto intestinal debido a su tolerancia extrema a la pH ácido del estómago (Lin, 1996). El éxito de la colonización intestinal va a depender de la competición por los nutrientes con el resto de miembros de la microbiota intestinal, la penetración en la capa mucosa ya que es su hábitat natural, la capacidad de evitar las defensas del hospedador y la capacidad de crecimiento rápido superior a la tasa de recambio de la capa mucosa (Conway, 2015). A pesar de la resistencia la colonización que ejerce una microbiota intestinal rica y diversa, los humanos estamos colonizados por una media de 5 cepas diferentes de *E. coli*, produciéndose además una continua sucesión de cepas diferentes (Apperloo-Renkema, 1990). Esto significa que cepas diferentes pueden colonizar y crecer a pesar de haber otras antes. De hecho, es mas difícil la colonización posterior de una misma cepa de *E. coli* que si es diferente (Leatham, 2009).

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

La competición por los nutrientes de *E. coli* en el intestino se produce de varias maneras. En primer lugar *E. coli* podría utilizar nutrientes que no consumen otros miembros de la microbiota intestinal. En segundo lugar, una cepa de *E. coli* podría consumir más rápido y crecer más rápido que el resto de cepas de *E. coli*. En tercer lugar, *E. coli* podría establecer una relación simbiótica con otros géneros, como por ejemplo *Bacteroides*, que es capaz de degradar polisacáridos complejos puesto que *E. coli* solo consume monosacáridos y disacáridos (Conway, 2015). Por consiguiente, la pérdida de diversidad y de riqueza, principalmente debido a la dramática depleción de miembros del phylum Firmicutes, que observamos en los pacientes con CDI y en los individuos colonizados por *C. difficile*, supone una mayor facilidad de colonización de nuevas cepas de *E. coli*. Este hecho explicaría en parte los incrementos observados en el género *Escherichia/Shigella* en los grupos CDI y P con respecto a los controles sanos.

Además de una mayor probabilidad de colonización de nuevas cepas de *E. coli* tanto en infectados como en colonizados por *C. difficile* debido a la disrupción de la microbiota intestinal que presentan, en estos pacientes se produce una expansión de miembros de la familia Enterobacteriaceae debido a dos características. En primer lugar, pueden adoptar un metabolismo respiratorio y fermentativo. En segundo lugar, son aerobios y anaerobios facultativos. Como dijimos en el apartado “6.3.1.1. Diferencias de composición a nivel de phylum entre los grupos CDI y CTRL”, existe una dominancia de anaerobios estrictos en el intestino grueso debido a la limitación de oxígeno en este ambiente. Este hecho tiene importantes consecuencias en el metabolismo y consumo de nutrientes por los componentes de la microbiota intestinal. En consecuencia, el aumento de la disponibilidad de oxígeno en el intestino grueso supone una disrupción de la anaerobiosis que permitiría una ventaja selectiva para los aerobios y anaerobios facultativos, como los miembros de la familia Enterobacteriaceae (Rivera-Chávez, 2016). Esta mayor disponibilidad del oxígeno puede ocurrir por varias causas. En primer lugar, hemos de decir que los colonocitos son la principal fuente de oxígeno en el intestino grueso, por tanto, en la superficie del colon se emite una cantidad muy limitada. Esto es la causa por la cual *E. coli* y otros miembros de la familia Enterobacteriaceae solo proliferan en la superficie epitelial y en la capa

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

mucosa. Asimismo, en los colonocitos la principal vía de obtención de energía es la beta-oxidación del butirato aportado mediante procesos fermentativos por los grupos productores de butirato, en especial pertenecientes al *phylum* Firmicutes (Velazquez, 1997). En este proceso el butirato se transforma en dióxido de carbono, mediante el consumo de oxígeno. Por tanto, la depleción del *phylum* Firmicutes observada en nuestro trabajo, tanto en los pacientes con CDI como en los individuos colonizados por *C. difficile*, conlleva una reorientación metabólica en el colonocito hacia la glucólisis anaerobia, lo que supone un menor consumo de oxígeno y un aumento de la oxigenación en la superficie del colon, que se traduce en una expansión de la familia Enterobacteriaceae, principalmente del género *Escherichia/Shigella* (Donohoe, 2012). Asimismo, el ambiente proinflamatorio debido a la disminución de butirato en el intestino grueso conlleva una hiperplasia en las criptas, y esto supone un reemplazo de los colonocitos hipóxicos a colonocitos indiferenciados normóxicos (López, 2016). Por otra parte, la inflamación intestinal (también las toxinas TcdA y TcdB) provoca un aumento de las especies reactivas de oxígeno capaces de oxidar compuestos de sulfuro endógenos a tetrionato, un compuesto que actúa como aceptor de electrones y que también favorece la expansión de anaerobios facultativos (Winter, 2013). Por consiguiente, mediante estos mecanismos se genera la expansión de la familia Enterobacteriaceae en los pacientes con CDI y en los individuos colonizados por *C. difficile*. De esta forma, se complementa el aumento de *Escherichia/Shigella* mediante colonizaciones de cepas nuevas, explicado en el párrafo anterior.

E. coli es una bacteria que presenta una gran diversidad genética. Esto es debido a que presenta un genoma flexible que contiene entre 4.5 y 5.5 Mbp de ADN en función de las cepas (Bergthorsson, 1998). Además, menos de la mitad de sus genes están conservados en todos los miembros de las diferentes cepas. Estos datos suponen que hagamos una clasificación basada en criterios genéticos y clínicos. Diferenciamos entre las cepas de *E. coli* comensales y sin factores de virulencia que son miembros de la microbiota intestinal, cepas patógenas intestinales productoras de diarrea y cepas productoras de infecciones extraintestinales.

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

Centrándonos en las cepas de *E. coli* productoras de diarrea se han considerado las siguientes:

- *E. coli* enteropatógena (EPEC).
- *E. coli* enterotoxigénica (ETEC).
- *E. coli* enteroinvasiva (EIEC)
- *E. coli* enteroagregativa (EAEC).
- *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC) y *E. coli* Verocitotoxigénica (VTEC).
- *E. coli* difusamente adherente (EAEC).

Estas cepas de *E. coli* producen enfermedades intestinales que cursan desde diarrea autolimitada hasta colitis hemorrágicas. Vamos a desarrollar con algo más de detalle las características de cada una de estas cepas.

E. coli enteropatógena fue la primera cepa patológica identificada de *E. coli*. Se adhiere a las células epiteliales intestinales y provoca la despolimerización de la actina de las microvellosidades, que a su vez conlleva un incremento de la permeabilidad del epitelio intestinal, y una pérdida de la fijación de las uniones intercelulares. También provocaría una migración de leucocitos polimorfonucleares a la luz y el epitelio intestinal. La diarrea sobreviene por el incremento de la secreción de iones, incremento de la permeabilidad intestinal, inflamación intestinal y pérdida de potencial superficie de absorción debido a la reducción de las microvellosidades (Kaper, 2014).

E. coli enterotoxigénica se asocia a una elevada mortalidad en niños menores de 2 años. También es una frecuente causa de diarrea en los turistas de viaje a países subdesarrollados, debida a la ingesta de agua y comida contaminadas por aguas residuales. ETEC produce una enterotoxina termoestable y una enterotoxina termolábil *cholera toxin-like*. Ambas toxinas estimulan el receptor guanilato ciclasa del epitelio intestinal que conlleva un incremento del GMP cíclico. Esto genera una disminución de la reabsorción de sodio y cloruro y un incremento de la secreción de bicarbonato, lo que genera una diarrea acuosa (Kaper, 2004).

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

E. coli enteroinvasiva está muy cercana filogenéticamente a *Shigella*, compartiendo muchas de sus propiedades incluido los mecanismos de virulencia. Ambas bacterias contienen sistemas para invadir células eucariotas y evadir el sistema inmune del hospedador. La patogénesis de EIEC conlleva la penetración en la célula epitelial intestinal, lisis de su vacuola endocítica, replicación intracelular e invasión de celulares epiteliales adyacentes y finalmente inducción de la apoptosis en macrófagos infectados y liberación de IL-1 β . EIEC podría producir desde diarrea acuosa hasta colitis inflamatoria y disentería (Kaper, 2004).

E. coli enteroagregativa se ha asociado a diarrea crónica en países desarrollados y en pacientes inmunocomprometidos. Los mecanismos patogénicos de EAEC incluyen su adherencia a la capa mucosa mediante fimbrias. Esto provoca inflamación ya que induce la liberación de IL-8 que provocaría la migración de los neutrófilos al epitelio intestinal generándose daño tisular (Kaper, 2004).

E. coli productora de toxina Shiga y *E. coli* Verocitotoxigénica causan colitis hemorrágica y el síndrome urémico hemolítico. La infección suele producirse mediante la ingesta de alimentos contaminados. Producen una toxina similar a la toxina Shiga producida por *Shigella dysenteriae*. A veces se manifiesta como diarrea hemorrágica y fallo renal agudo. El mecanismo patogénico comienza cuando STEC o VTEC se ingiere y se adhiere a células epiteliales de tracto gastrointestinal. La toxina es transportada al riñón por vía sanguínea o por migración de los neutrófilos (Kaper, 2004).

Por consiguiente, puesto que en los pacientes con CDI y los individuos colonizados por *C. difficile* de nuestro estudio se encuentran incrementos similares pronunciados de *Escherichia/Shigella* donde probablemente *E. coli* será el componente mayoritario de este *cluster*, y conociendo que existen varias cepas de *E. coli* enteropatógenas, sería interesante conocer la presencia de estas cepas en ambos grupos de estudio. Es por lo cual que formulamos la hipótesis que en el grupo CDI hay una colonización de cepas patogénicas que podrían potenciar los efectos de las toxinas de *C. difficile*. Esta colonización es más susceptible en estos

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

pacientes debido a la pérdida de diversidad y riqueza de la microbiota intestinal que presentan. Por otra parte, esta colonización no se produciría en los individuos colonizados por *C. difficile*. Este hecho podría explicar en parte la diferente expresión clínica en la infección con respecto a la colonización de *C. difficile*.

Con respecto al género *Klebsiella* que está incrementado en los individuos colonizados por *C. difficile*, pocos trabajos han evidenciado este hecho. En trabajos donde se ha estudiado la microbiota intestinal en pacientes con CDI antes y después de un FMT, se ha observado que el éxito del FMT conlleva una erradicación o dramática disminución de la familia Enterobacteriaceae y de géneros como *Klebsiella* (Weingarden, 2014; Shahinas, 2012; Brown, 2018). Zhang y col. observaron un incremento de *Klebsiella* en ambos grupos de pacientes infectados y colonizados por *C. difficile*, aunque fue ligeramente mayor en los pacientes con CDI, pero sin llegar al 5% (Zhang, 2015). Milani y col. observaron un llamativo incremento de *Klebsiella* al 14.3% en el grupo de los pacientes con CDI desde el 0.12% de los controles sanos (Milani, 2016). Por tanto, solo el trabajo de Milani y col. muestra una expansión amplia de este género, mientras que el resto de los trabajos informan de incrementos leves como en nuestro estudio, pero tanto en pacientes infectados como en individuos colonizados por *C. difficile*. Es por lo cual que le damos una menor importancia a la influencia de *Klebsiella* en la patogénesis de la CDI, debido seguramente a una menor capacidad de colonización y de expansión, por la mayor eficacia en este sentido de *E. coli*.

Klebsiella es un frecuente patógeno humano, sobre todo de infecciones respiratorias, urinarias y de tejidos blandos. Comprende a varias especies, pero las más frecuentes son *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca*, siendo la primera más virulenta, ya que la segunda suele asociarse solo a infecciones urinarias y a infecciones polimicrobianas, no produciendo bacteriemias (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2012). *K. pneumoniae* puede localizarse en el intestino y formar parte como miembro minoritario de la microbiota intestinal que se suele situar en la capa mucosa intestinal como *E. coli*. No obstante, la colonización prolongada de cepas virulentas de *K. pneumoniae* puede conducir al desarrollo de enfermedades intestinales inflamatorias como la enfermedad de Crohn o colitis

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

ulcerosa (Kaur, 2018). Los serotipos K1 y K2 son considerados los más virulentos debido a la presencia de una cápsula de polisacárido que le permite eludir la fagocitosis por los macrófagos. Por consiguiente, por todo lo explicado respecto a este género en este párrafo y en el anterior, consideramos que el incremento de *Klebsiella* que observamos en los individuos colonizados por *C. difficile* con respecto a los controles sanos y a los pacientes con CDI, debería complementarse mediante estudios metagenómicos para conocer las especies colonizantes y en caso de ser *K. pneumoniae*, su serotipo. Aún así, lo consideramos un género de poca influencia.

Por último, destacamos un ligero incremento del género *Proteus* en los pacientes con CDI que no se observa ni en controles sanos ni en individuos colonizados por *C. difficile*, donde su abundancia relativa es 0%. *Proteus* es un patógeno oportunista con las características clásicas de la familia Enterobacteriaceae a las que suma una gran movilidad debido a la presencia de un gran número de flagelos peritricos. Comprende 4 especies identificadas (más 3 genomoespecies sin identificar) siendo *Proteus vulgaris* y *Proteus mirabilis* (sobre todo *P. mirabilis*) componentes minoritarios ocasionales de la microbiota intestinal (Drzewiecka, 2016). Ambas especies generalmente producen infecciones urinarias. En un estudio en España con controles sanos se evidenció que solo el 4% estaban colonizados por especies del género *Proteus*, sugiriendo la baja tasa de colonización (Porres-Osante, 2015). Además, se le ha identificado como un potencial agente causal de diarrea, aunque sugiriendo que adopta un rol oportunista cuando la diarrea la produce otro agente causal y no *Proteus* primariamente (Müller, 1986). No obstante, en condiciones normales debe ser considerado como un colonizador (Drzewiecka, 2016).

Pocos trabajos han relacionado la presencia de *Proteus* con la patogénesis de la CDI. Brown y col. observaron que con el FMT se erradicaba la presencia de este género que se observaba en los pacientes con CDI recurrente (Brown, 2018). Nuestros resultados muestran una colonización de *Proteus* en los pacientes con CDI que no se observa en los controles sanos ni en los individuos colonizados por *C. difficile*. Esto es presumiblemente debido a que la microbiota intestinal de estos pacientes lo permite y no así la de los otros dos grupos. La presencia de *Proteus*

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

agrava la disbacteriosis de esos pacientes y potencia la presencia de clínica, ya que hemos visto que adopta un rol oportunista en coinfecciones con otros patógenos intestinales (Müller, 1986). Este hecho no se produciría en los individuos colonizados y explicaría en parte junto a otras alteraciones y diferencias que *C. difficile* no sea causante de clínica en estos individuos.

6.3.4.2 Diferencias de composición en los géneros de la familia Burkholderiaceae entre los grupos CDI y P con respecto al grupo CTRL.

El incremento de la abundancia relativa de la familia Burkholderiaceae en el grupo de pacientes con CDI es debido prácticamente en su totalidad al aumento no estadísticamente significativos del género *Parasutterella* (3.1% en CDI frente a 0.2% en CTRL) con respecto a los controles sanos. Por otra parte, en el grupo de los individuos colonizados por *C. difficile* también se observa un incremento, aunque más moderado y tampoco estadísticamente significativo (1.2% en P frente a 0.2% en CTRL) con respecto a los controles sanos. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos CDI y P.

La familia Burkholderiaceae pertenece a la clase Betaproteobacteria, a diferencia de Enterobacteriaceae que se engloba dentro de la clase Gammaproteobacteria, dentro del *phylum* Proteobacteria. Es una familia muy diversa, tanto fenotípicamente, metabólica y ecológicamente. Incluye a bacterias aerobias y anaerobias, y quimiorganótrofas y quimiolitótrofas ((Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2012). El género *Parasutterella* es relativamente de reciente identificación (Nagai, 2009). Está conformado por cocobacilos Gram negativos, anaerobios estrictos, inmóviles, no formadores de esporas y asacarolíticos. Comprende a dos especies, *Parasutterella excrementihominis* y *Parasutterella secunda*, siendo ambos componentes minoritarios de la microbiota intestinal, aunque principalmente *P. excrementihominis* (Ju, 2019). El conocimiento de las características fisiológicas y metabólicas de *Parasutterella* es muy limitado. En un trabajo muy reciente, se ha conseguido aislar *Parasutterella* en ratones y se han estudiado algunas de sus características. Además, esta cepa ha sido inoculada en ratones para observar el rol que adopta como miembro de su microbiota intestinal. Se observó que *Parasutterella* presenta como principal producto final de

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

fermentación el ácido succínico, y que, aunque es definido como anaerobio estricto es capaz de tolerar ciertas concentraciones de oxígeno, mediante mecanismos desconocidos. También se evidenció que las concentraciones intestinales en los ratones colonizados por *Parasutterella* de ácidos biliares primarios como el ácido cólico y taurocólico, y algunos secundarios como el ácido taurodesoxicólico, estaban disminuidos. Aunque los autores no pueden concluir si este cambio en el metabolismo de los ácidos biliares fue debido a la introducción de *Parasutterella* o de cambios que produjese *Parasutterella* en la actividad de otras bacterias (Ju, 2019). Esta relación con el metabolismo de los ácidos biliares fue conjeturada previamente por Staley y col. en un trabajo donde estudiaron la restauración de la microbiota intestinal en pacientes con CDI sometidos a FMT (Staley, 2016). Observaron que el género *Parasutterella*, junto con otros, se incrementaba en los pacientes curados “post FMT” y formularon la hipótesis de que los miembros de estos géneros tuvieran influencias sobre el metabolismo de los ácidos biliares, mecanismo esencial ya que tiene gran influencia sobre las esporas de *C. difficile*. Aunque los autores recomendaron tomar esta hipótesis con cautela, gracias al trabajo de Ju y col. sabemos que sí tiene influencia sobre el metabolismo intestinal de los ácidos biliares. No obstante, no podemos aseverar si *Parasutterella* es un grupo protector de CDI a este respecto, si no se evidencia que presenta actividad BaiCD. Por otra parte, otro trabajo ha puesto de manifiesto que el género *Parasutterella* era más abundante en heces en pacientes con síndrome inflamatorio intestinal que en controles sanos y que podría estar relacionado con el desarrollo del síndrome de colon irritable. Asimismo, los mismos autores observaron que este incremento en la abundancia relativa de *Parasutterella* se relacionaba con un aumento del cociente entre células inflamatorias y células epiteliales en el tejido intestinal, lo cual sugería que podría estar asociado con la inflamación crónica intestinal en pacientes con enfermedad inflamatorio intestinal (Chen, 2018).

Por consiguiente, nuestros resultados muestran un incremento de *Parasutterella* en pacientes con CDI y en menor medida en individuos colonizados por *C. difficile*, con respecto a los controles sanos, donde es un género muy escaso. En contra de lo mencionado en el trabajo de Staley y col. (Staley, 2016) donde parece que *Parasutterella* es un género protector, nuestros resultados apuntan a lo

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

contrario, ya que se observa en individuos infectados y colonizados por *C. difficile*. Debido a la reciente identificación y más reciente caracterización metabólica (Nagai, 2009; Ju, 2019) no se ha establecido la relación entre CDI y *Parasutterella*, salvo Staley y col. que conjeturaron su actividad sobre el metabolismo de los ácidos biliares (Staley, 2009). De hecho, casi ningún trabajo resalta la abundancia relativa de *Parasutterella* en estos trabajos. Por ejemplo, Zhang y col. observaron una reducción de *Parasutterella* tanto en sujetos infectados como colonizados por *C. difficile* con respecto al 3% observado en los controles sanos (Zhang, 2015), apuntando a que su pérdida disminuye la resistencia a la colonización de patógenos intestinales. Pero, por otra parte, ya hemos visto que es un género relacionado con la inflamación intestinal (Chen, 2019) y, además, al ser un género productor de ácido succínico podría permitir la expansión de *C. difficile*, puesto que lo utiliza como fuente de energía (Ng, 2013). Por lo tanto, es un género del cual se conoce poco y del cual tenemos pruebas a favor y en contra de si se trata de un género protector o predisponente de CDI. Se deberían establecer estudios metagenómicos y funcionales en modelos murinos, en relación con la CDI, para hipotetizar su función en la patogénesis de la CDI.

6.3.5 Diferencias de composición a nivel de familia y género pertenecientes al *phylum* Actinobacteria entre los grupos CDI y P con respecto al grupo CTRL.

6.3.5.1 Diferencias de composición en los géneros de la Familia Bifidobacteriaceae entre los grupos CDI y P con respecto al grupo CTRL.

Dentro del *phylum* Actinobacteria, únicamente destacamos las diferencias en las abundancias relativas de la familia Bifidobacteriaceae. En el grupo de pacientes con CDI se observa una reducción estadísticamente significativa de la familia Bifidobacteriaceae con respecto a los controles sanos, a expensas del género *Bifidobacterium* (0.6% en CDI frente a 3.7% en CTRL). Por otra parte, en el grupo de los individuos colonizados por *C. difficile* también se observa esta disminución no estadísticamente significativa con respecto a los controles sanos (2.1% en CDI frente a 3.7 en CTRL), aunque la familia Bifidobacteriaceae y el género *Bifidobacterium* se conserva más que en los pacientes con CDI. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos CDI y P. Las especies

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

de *Bifidobacterium* implicadas son *Bifidobacterium longum subsp longum* y *Bifidobacterium breve*, principalmente.

Históricamente, en muchos trabajos donde se ha estudiado la microbiota intestinal de pacientes con CDI en diferentes modalidades, se ha obviado el papel de *Bifidobacterium*. Por tanto, son relativamente pocos los estudios que han puesto en valor su posible presencia o ausencia y su rol en la patogénesis de la CDI. En el trabajo de Zhang y col., aunque los autores no lo nombran ni en los resultados ni en la discusión, observamos en una figura que *Bifidobacterium* está erradicado en los pacientes con CDI con respecto a los controles sanos donde se abundancia relativa es del 1%. En individuos colonizados por *C. difficile* *Bifidobacterium* está ligeramente incrementado al 2% (Zhang, 2015). En el trabajo de Han y col. tampoco los autores nombran a *Bifidobacterium* en todo el artículo, no obstante, en una tabla podemos observar que *Bifidobacterium* está disminuido tanto en pacientes infectados (0.59%) como colonizados (0.37%), con respecto a los controles sanos (2.1%) (Han, 2019). Rea y col. evidenciaron que *Bifidobacterium* no se detectó en pacientes con CDI, mientras que sí era detectado en sujetos colonizados (1.6%) y en controles sanos (2.8%) (Rea, 2011). Esta disminución de *Bifidobacterium* se ha observado en otros pocos trabajos. Milani y col. observaron una disminución en pacientes con CDI (0.32%) con respecto a individuos que habían recibido administración antibiótica como controles sanos (0.65%) (Milani, 2016). Asimismo, Skraban y col. observaron que *Bifidobacterium longum* estaba muy disminuido en pacientes con CDI, pero su elevada abundancia relativa era el mejor predictor de no infección o colonización por *C. difficile* (Skraban, 2013). También, Rousseau y col. pusieron de manifiesto que *B. longum* se asociaba a la microbiota intestinal de niños no colonizados por *C. difficile*, a diferencia de los niños colonizados la cual se asociaba a *Klebsiella pneumoniae* y *Ruminococcus gnavus* (Rousseau, 2011). Todos estos limitados trabajos nos indican que en pacientes con CDI sí que se produce una disminución de *Bifidobacterium*. No obstante, en individuos colonizados por *C. difficile*, la bibliografía al respecto aporta resultados dispares. Nuestros resultados van más en la línea de los trabajos de Zhang y Rea (Zhang, 2015; Rea, 2011), donde se conserva el género *Bifidobacterium* en los sujetos colonizados y se erradica en la CDI.

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

El género *Bifidobacterium* está compuesto bacilos Gram positivos de diferente morfología, no formadores de esporas, inmóviles, anaerobios estrictos, aunque algunas especies son capaces de tolerar O₂ siempre en presencia de CO₂. Presenta actividad sacaroclástica y su metabolismo es fermentativo, donde el ácido acético y el ácido láctico son los principales productos finales, a relación molar 3:2. También se genera en mucha menor medida ácido succínico, ácido fórmico y etanol (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2012).

El género *Bifidobacterium* comprende a 70 especies y otras 10 subespecies (<http://www.bacterio.net/bifidobacterium.html>). Se trata de un género de efectos beneficiosos importantes, cuya abundancia relativa como componente de la microbiota intestinal se sitúa entre el 1-4%. *Bifidobacterium catenulam*, *Bifidobacterium pseudocatelanulam*, *Bifidobacterium adolescentes*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis* y *Bifidobacterium dentium* son especies componente comunes de la microbiota intestinal humana (Hidalgo-Cantabrana, 2017). Asimismo, existe una variabilidad interindividual en cuanto a las bifidobacterias presentes (Delgado, 2006).

La particularidad metabólica que presenta *Bifidobacterium* es el catabolismo de los monosacáridos mediante la ruta fructosa 6 fosfato. En esta vía la fructosa-6-fosfato fosfoacetilasa es el principal enzima (Xfp). Xfp tiene afinidad por la glucosa-6-fosfato o xilulosa-5-fosfato. Los principales productos finales, como hemos mencionado antes, son el ácido acético y el ácido láctico (González-Rodríguez, 2013). Por otra parte, *Bifidobacterium* tiene la capacidad de degradar polisacáridos complejos en fuentes de energía accesibles. Por ejemplo, durante la época neonatal y primera niñez *Bifidobacterium* es capaz de degradar oligosacáridos provenientes de la leche humana (Duranti, 2015). Conforme llega la edad adulta la población de *Bifidobacterium* varía hacia unas especies que presenten la capacidad de degradar polisacáridos no digeribles provenientes de las plantas (Duranti, 2014). Este hecho, permite que *Bifidobacterium* tenga influencia sobre otros miembros de la microbiota intestinal, puesto que degrada polisacáridos complejos en azúcares más simples, asimilables por estos otros (De Vuyst, 2011). Por otra parte, *Bifidobacterium* también es capaz de metabolizar polifenoles. Los polifenoles son compuestos naturales encontrados en los

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

vegetales, de diversa estructura química pero siempre con residuos hidroxifenilo. La mayor parte de los polifenoles de la dieta alcanzan el intestino grueso donde son fermentados por miembros de la microbiota intestinal, en especial por bacterias del género *Bifidobacterium* (Cardona, 2013). *Bifidobacterium* degrada el núcleo polifenólico en ácidos carboxílicos aromáticos más simples, que son considerados responsables de sus propiedades beneficiosas (Pasinetti, 2018). Entre estas propiedades están las antimicrobianas y las antiinflamatorias (Boto-Ordóñez, 2014), las cuales podrían ser beneficiosas en el contexto de la CDI.

Bifidobacterium presenta propiedades beneficiosas como resultado de la compleja interrelación con otros miembros de la microbiota intestinal y con el hospedador. Esta correlación no está completamente dilucidada a nivel molecular. Una de estas propiedades beneficiosas para la salud del hospedador es que son importantes en la erradicación de patógenos intestinales. De forma contraria, niveles disminuidos de *Bifidobacterium* se han correlacionado con el sobrecrecimiento de patógenos intestinales (Hidalgo-Cantabrana, 2017). El hecho por el cual en la edad anciana disminuye la abundancia relativa de *Bifidobacterium* como miembro de la microbiota intestinal (Arbolea, 2016), podría estar relacionado con la mayor incidencia de CDI en estos pacientes y con que la edad sea un factor de riesgo importante para el desarrollo de esta infección.

Especies del género *Bifidobacterium* han sido incluidas históricamente en compuestos probióticos debido a las propiedades beneficiosas antes mencionadas. Entre las indicaciones de estos probióticos está la diarrea asociada al sobrecrecimiento de patógenos intestinales, incluido *C. difficile*. Es en los trabajos que han evaluado la eficacia y los mecanismos de acción de estos probióticos, donde se ha evidenciado su actividad en la inhibición de la patogénesis de la CDI, y nos servirán para establecer las bases del significado de nuestros resultados al respecto de este género. Como dijimos en el apartado “6.3.2.6. Diferencias de composición en los Géneros de la Familia Lactobacillaceae entre los grupos CDI y P con respecto al grupo CTRL”, la eficacia de una bacteria probiótica es cepa y especie dependiente (Goldstein, 2017), por tanto, no todas las especies de *Bifidobacterium* van a resultar útiles en la erradicación de *C. difficile*. Las actuales guías clínicas de diagnóstico, tratamiento y prevención de *C. difficile* (European Society of Clinical

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

Microbiology and Infectious Diseases, Infectious Diseases Society of America, Society for Healthcare Epidemiology of America) no recomiendan la administración de probióticos como medida para prevenir o tratar la CDI (McDonald, 2018; Debast, 2014), y esto es debido a que existe una enorme variedad de probióticos disponibles y los ensayos clínicos que se hacen al respecto son normalmente de poca calidad, con tamaños muestrales pequeños, incontrolados y frecuentemente financiados por la casa comercial del mismo probiótico (McFarland, 2009). Una reciente revisión en Cochrane de 31 ensayos clínicos concluyó que existía una evidencia moderada para afirmar que los probióticos eran seguros y eficaces para prevenir la CDI, sobre todo en pacientes no inmunocomprometidos o no severamente debilitados (Goldenberg, 2017). No obstante, pocos trabajos han evaluado la inhibición de *C. difficile* por cepas del *Bifidobacterium* tanto *in vivo* como *in vitro*. Yun y col. investigaron el efecto de la cepa ATCC 15707 de *B. longum* sobre la mortalidad y el daño intestinal en ratones infectados por *C. difficile*, observando un efecto beneficioso en estas dos variables (Yun, 2017). Valdés-Valera y col. observaron que las cepas *B. animalis subsp. lactis* Bb12, *B. longum* IPLA20022, *B. bifidum* IPLA20015 y *B. breve* IPLA20006, eran capaces de inhibir el crecimiento y disminuir la producción de TcdA y TcdB *in vitro* mediante cocultivo con *C. difficile*, aunque este efecto fue variable en base al prebiótico añadido (Valdés-Varela, 2016). El trabajo más completo hasta la fecha que contiene estudios *in vitro* e *in vivo* con ratones, es el realizado por Wei y col., donde evaluaron la capacidad neutralizante a las toxinas de *C. difficile* así como la prevención del desarrollo de CDI en ratones, de la cepa *B. longum* JMD301. Observaron *in vitro* mediante cocultivo con *C. difficile* que *B. longum* JMD301 inhibió su crecimiento y promovió la degradación de TcdA y TcdB. Esto fue confirmado *in vivo* al determinar la cantidad de toxinas y la abundancia de *C. difficile* en el intestino de los ratones infectados por *C. difficile* a los que se le suministró este probiótico. Además, evidenciaron una reducción de interleucinas proinflamatorias como la IL-6 y el TNF α , un aumento de la interleucina inmunosupresora IL-10 y un menor daño tisular intestinal. Posteriormente, ampliaron el experimento *in vitro* con otras 40 cepas probióticas de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* y observaron que el efecto producido por 8 cepas de *B. longum* sobre *C. difficile* era similar al obtenido por la cepa JMD301 y era dosis dependiente (Wei, 2018). En este trabajo también se pone de manifiesto que el pH

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

ácido generado por *Bifidobacterium* es una variable importante en la neutralización de las toxinas, además de en la inhibición del crecimiento y por consiguiente en la producción de toxinas por *C. difficile*. Aquí entra la importancia de los ácidos orgánicos generados por *Bifidobacterium* que es uno de los mecanismos mediante los cuales logra inhibir el sobrecrecimiento y toxicidad de *C. difficile*. Como ya dijimos para las bacterias LAB, el ácido acético y láctico, principales productos de la fermentación de *Bifidobacterium*, contribuyen a la acidificación de del microambiente intestinal y esto les permite competir con otras bacterias menos acidófilas como *C. difficile* (Pessione, 2012). Además, aunque *Bifidobacterium* no genere ácido butírico, un potente, antiinflamatorio, lo hace de forma indirecta puesto que géneros como *Agathobacter* utilizan como sustrato el acetato para producirlo (Rivière, 2015). Asimismo, el ácido láctico es capaz de modular la respuesta inmune innata al actuar sobre los neutrófilos y las células epiteliales intestinales (Blad, 2012), enlazando con otro mecanismo que hace que *Bifidobacterium* tenga efectos beneficiosos sobre la CDI, como es la inmunomodulación. Los otros mecanismos de acción anti *C. difficile* son la síntesis de moléculas antibacterianas y los mecanismos competitivos. Estudios *in vitro* e *in vivo* han evidenciado que la capacidad adherente a la capa mucosa y las células epiteliales intestinales de *Bifidobacterium* interfiere con los patógenos intestinales (Servin, 2004). Otro aspecto importante de *Bifidobacterium* presente en algunas especies y cepas es la presencia de capa polisacáridica extracelular. Se le atribuyen funciones de inmunomodulación y de modulación de la microbiota intestinal, puesto que puede actuar como reservorio de nutrientes (Bottacini, 2017).

Por consiguiente, nuestros resultados muestran una profunda depleción de *Bifidobacterium* en los pacientes con CDI con respecto a los controles sanos. Por otra parte, en los individuos colonizados por *C. difficile* se conserva en gran parte la presencia de *Bifidobacterium*. Este hallazgo lo consideramos muy importante. Pocos trabajos acerca de la microbiota intestinal en pacientes con CDI mediante secuenciación masiva del ADNr 16S han puesto en valor este hecho. Para nosotros es muy destacable que se conserve *Bifidobacterium* en los individuos colonizados, ya que debido a las propiedades beneficiosas y diferentes mecanismos de acción antes revisados sobre la inhibición en patógenos intestinales, particularmente de *C. difficile*, explicaría, al menos en parte, que estos

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

individuos no expresen la clínica asociada a la CDI. Hasta nuestro conocimiento, es la primera vez que se llega a estas conclusiones con respecto a la colonización por *C. difficile*. Asimismo, debido a que la eficacia de *Bifidobacterium* como bacteria con propiedades probióticas es dependiente de la especie y la cepa, mediante estudios metagenómicos se podría complementar el estudio y evidenciar las cepas concretas que se conservan en los individuos colonizados por *C. difficile*.

6.3.6 Diferencias de composición a nivel de familia y género pertenecientes al phylum Verrucomicrobia entre los grupos CDI y P con respecto al grupo CTRL.

6.3.6.1 Diferencias de composición en los géneros de la familia Akkermansiaceae entre los grupos CDI y P con respecto al grupo CTRL.

Dentro del *phylum* Verrucomicrobia, únicamente destacamos las diferencias en las abundancias relativas de la familia Akkermansiaceae. En el grupo de pacientes con CDI se observa un incremento no estadísticamente significativo de la familia Akkermansiaceae con respecto a los controles sanos, a expensas del género *Akkermansia* (6.0% en CDI frente a 4.7% en CTRL). Por otra parte, en el grupo de los individuos colonizados por *C. difficile* se observa una disminución estadísticamente significativa con respecto a los controles sanos (1.3% en CDI frente a 4.7% en CTRL). No se observan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos CDI y P.

La familia Akkermansiaceae solo consta del género *Akkermansia*. *Akkermansia muciniphila* es la única especie aislada en humanos (Derrien, 2004). *Akkermansia* está constituido por bacterias de morfología oval, Gram negativas, inmóviles, no formadoras de esporas, anaerobias estrictas, quimioorganótrofas, de metabolismo fermentativo obligado. Su característica más destacable es la capacidad para fermentar la mucina de la capa mucosa intestinal. El ácido acético y propiónico y el etanol son los principales productos finales de la fermentación de la mucina.

Al respecto de la CDI, solo recientemente se ha incidido en la importancia que podría presentar en su patogénesis. Sangster y col. observaron un incremento

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

de *A. muciniphila* en 12 pacientes con CDI con respecto a 12 controles sanos. Los autores destacaron que debido a la capacidad de *A. muciniphila* de degradar la mucina, y puesto que *C. difficile* por si mismo también es capaz de degradar la mucina, le proporcionaría una ventaja selectiva de expandirse, ya que es capaz adherirse a una capa mucosa alterada con mejor eficacia que otros miembros de la microbiota intestinal (Sangster, 2016). Por tanto, según los autores, la mayor presencia de *A. muciniphila* podría facilitar la transición desde un estado de colonización a un estado de infección. De manera interesante, los autores también reflexionan sobre la dificultad de curación completa y los fracasos terapéuticos de la CDI, puesto que otras bacterias coexistentes a *C. difficile* dificultan reestablecer la microbiota normal, por diferentes mecanismos, y uno de ellos podría ser la degradación de la mucina de la capa mucosa que realiza *A. muciniphila*. Otro trabajo que fue publicado en la misma fecha que el de Sangster y col. también evidenció un incremento de *A. muciniphila* del 3.6% en pacientes con CDI, con respecto al 0.6% que se observó en individuos que no habían recibido tratamiento antibiótico como controles sanos (Milani, 2016). Estos autores señalaron que, aunque *A. muciniphila* presenta propiedades beneficiosas, su expansión en los pacientes con CDI podría estar relacionada con la modificación del microambiente intestinal, y podría reflejar la inflamación de la capa mucosa. Recientemente, Han y col. han mostrado unos resultados menos espectaculares, con una abundancia relativa media *A. muciniphila* del 0.14% en individuos con presencia de tcdB frente al 0.01% de los controles sanos (Han, 2019). Nuestros resultados muestran por primera vez un incremento de *A. muciniphila* en los pacientes con CDI y una disminución en los individuos colonizados por *C. difficile*.

Para entender la naturaleza de nuestros resultados al respecto de *A. muciniphila* resulta interesante revisar la composición, estructura y rol de la capa mucosa. La mucosa intestinal está compuesta principalmente por mucina, que resulta en aglomerados complejos de glicoproteínas con O-glicanos específicos, producidos por las células epiteliales intestinales secretoras específicas. Puede ser secretada en forma de gel o formando parte del glicocálix de éstas células. Su estructura peptídica consiste en repeticiones de los aminoácidos prolina, treonina y serina que conforman los sitios de unión covalente para los polisacáridos

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

altamente O-glicosilados. La estructura básica de polisacárido es una combinación de galactosa, N-acetilgalactosamina y N-acetilglicosamina, con diferentes glicanos unidos a este núcleo cuyo monosacárido terminal suele ser fucosa o ácido siálico. La mucina MUC2 es la más abundante en el colon (Sicard, 2017). La capa mucosa del colon es la más gruesa de todo del intestino, debido a que alberga a un gran número de bacterias. Se divide en una capa interna densa, firmemente ligada al epitelio intestinal, poco permisiva a la penetración de bacterias, y una capa externa expuesta a la actividad proteolítica y sacarolítica de las bacterias de la microbiota intestinal, que además les proporciona sitios de adhesión (Sicard, 2017). La competición por este nicho ecológico es importante a la hora de conformar la estructura de la microbiota intestinal.

Una de las funciones de la capa mucosa intestinal descrita en el párrafo anterior es la protección frente a patógenos intestinales. Una alteración en la integridad de la capa mucosa supone que sea más permeable y se permita un mayor acceso al epitelio y este hecho podría generar inflamación (Antoni, 2014). Por otra parte, la capa mucosa también es una potencial fuente de nutrientes para los patógenos intestinales. Este hecho se pone de manifiesto en el tratamiento antibiótico, ya que perturba la microbiota intestinal y la disponibilidad de la fucosa y los ácidos siálicos de la mucina, lo cual facilita la expansión de *C. difficile* (Ng, 2013). Además, la toxina TcdA de *C. difficile* es capaz por sí misma de disminuir la exocitosis de mucina por las células intestinales productoras (Branka, 1997). Por consiguiente, el incremento de *A. muciniphila* en los pacientes con CDI reflejaría una mayor degradación de la capa mucosa intestinal, lo cual es un proceso importante para el desarrollo de dicha infección. En los individuos colonizados por *C. difficile*, de forma interesante, evidenciamos una disminución de *A. muciniphila* que reflejaría una mayor integridad de la mucosa intestinal. Este hecho, descrito en el presente estudio por primera vez, pensamos que es importante y que diferencia el estado de colonización y de infección de *C. difficile*, junto a otras disimilitudes discutidas.

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

6.4 VISIÓN GLOBAL DE LOS RESULTADOS.

La microbiota intestinal de los individuos infectados y colonizados por *C. difficile* es a grandes rasgos similar. No obstante, es muy diferente a la de los controles sanos en estructura y composición. Con respecto a la estructura, la disbacteriosis que presentan los primeros se manifiesta en una pérdida de alfa diversidad y riqueza. Por consiguiente, ambos grupos de individuos presentan una microbiota intestinal con un número relativamente bajo de OTUs y en franca desproporción, comparada con la de un grupo control en el cual hemos descartado situaciones patológicas que provoquen una disrupción de su microbiota intestinal. Sin embargo, no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en la alfa diversidad y riqueza de la microbiota intestinal de los individuos infectados y colonizados por *C. difficile*. Este hecho ya había sido manifestado en otros trabajos (Chang, 2008). También se ha observado que la pérdida de alfa diversidad y riqueza de los pacientes con CDI se restauraba mediante el FMT y que esto suponía la curación (Weingarden, 2014), demostrando que es un hallazgo característico de las disbacteriosis de estos pacientes y su importancia en la patogénesis de la CDI. No obstante, la pérdida de alfa diversidad y riqueza aparece en otras situaciones. Algunos autores han evidenciado este hallazgo en pacientes con diarrea nosocomial no debida a *C. difficile* (Antharam, 2013; Gu, 2016; Schubert, 2014) y en pacientes hospitalizados que han recibido administración antibiótica pero que no presentaron clínica (Milani, 2016). Por ende, no es una característica única de la microbiota intestinal de los pacientes infectados y colonizados por *C. difficile*, sino que es compartida con otros casos y situaciones clínicas. Asimismo, la virulencia de la cepa infectante o colonizante también podría generar un mayor grado de disbacteriosis traducido en una pérdida de alfa diversidad y riqueza más profunda. De hecho, se ha observado que la presencia en pacientes con CDI del ribotipo 027, considerado hipervirulento, provoca este resultado (Skraban, 2013). Otras condiciones que podrían suponer la pérdida de alfa diversidad y riqueza, aparte de la administración antibiótica, presencia de diarrea y virulencia de la cepa colonizante o infectante de *C. difficile*, son la hospitalización y la presencia de comorbilidades. En el presente trabajo todas estas condiciones son más representativas en los pacientes con CDI que en los individuos colonizados por *C.*

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

difficile. Consideramos importante destacar que el grupo de individuos colonizados por *C. difficile* del presente estudio fue captado principalmente desde la comunidad (87%). Aunque el 47% de estos individuos presentaron diarrea en el momento de la inclusión en el estudio (adquirida en la comunidad), se incluyeron en el grupo P en base a que la diarrea se pudo atribuir a otra causa o bien porque se determinó que la cepa causal de *C. difficile* era no toxigénica, por tanto, no atribuible a la causa de la clínica. Para ello tuvimos en cuenta la definición exacta del estado de colonización de *C. difficile* (Furuya-Kanamori, 2015) puesto que en muchos trabajos hay cierta confusión en este aspecto. No obstante, nuestros resultados muestran que la pérdida de alfa diversidad y riqueza de la microbiota intestinal de los pacientes infectados por *C. difficile* no se diferencia de la de los colonizados, a pesar de ser las condiciones de los primeros más propicias a una disbacteriosis que la de los segundos. Hay muy pocos trabajos que incorporen una cohorte de individuos colonizados por *C. difficile* (y esto es una de las razones de ser del presente estudio) para el estudio de la patogénesis de la CDI, pero en estos la colonización por *C. difficile* en muchas ocasiones también implicaría pérdida de alfa diversidad y de riqueza de su microbiota intestinal. Por tanto, concluimos que la pérdida de alfa diversidad y de riqueza de la microbiota intestinal en individuos colonizados por *C. difficile* no es un factor de desarrollo irremediable hacia la CDI y que, por tanto, debe haber otras diferencias que expliquen por qué esto no sucede.

Por otra parte, la pérdida de riqueza se debe traducir en una pérdida de resistencia a la colonización de patógenos oportunistas intestinales, debido a mecanismos de competición de nutrientes. Aparecerían nichos ecológicos vacantes que la anterior densidad microbiana no permitía. La competición por los nutrientes entre miembros de la microbiota intestinal es mayor cuando los grupos de bacterias están más relacionados filogenéticamente, puesto que de esta manera comparten genes y capacidades funcionales (Wexler, 2017).

El estudio de la beta diversidad de la microbiota intestinal basado en el índice de Jaccard de los individuos infectados y colonizados por *C. difficile* nos muestra una mayor variabilidad interindividual en estos grupos con respecto a los controles sanos, pero sin encontrar diferencias estadísticamente significativas

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

entre los dos primeros grupos. Este hecho enlazaría con la dinámica de cambios de la microbiota intestinal en los pacientes ingresados con CDI que se ha observado en los pocos estudios prospectivos al respecto (Lee, 2017; Vicente, 2016). Este dato explicaría la elevada variabilidad interindividual observada en nuestro grupo de pacientes con CDI, no obstante, el grupo de individuos colonizados por *C. difficile* proviene principalmente de la comunidad. Por otra parte, el estudio de agrupamiento basado en PCoA utilizando la distancia UniFrac muestra como la microbiota intestinal de los grupos de pacientes con CDI e individuos colonizados por *C. difficile* frente a los controles sanos tienen probables estructuras diferentes puesto que se ubican en regiones diferentes, debido a grandes diferencias en su composición. No obstante, los individuos de los grupos CDI y P se solapan en dos *clusters*, por tanto, no podemos diferenciarlos entre sí. Además, es observable que presentan una mayor variabilidad interindividual que el *cluster* de los controles sanos. Por consiguiente, al igual que el estudio de alfa diversidad, la beta diversidad de los individuos colonizados por *C. difficile* tampoco muestra diferencias significativas con la de los pacientes infectados por *C. difficile*, por lo que su composición debe ser similar y las diferencias las deberemos encontrar a nivel de escasos géneros. Por otra parte, este hallazgo que nos indica una diferente estructura de la microbiota intestinal en el estado de infección y colonización por *C. difficile* con respecto a los controles sanos, tampoco es únicamente característico de estas situaciones, ya que se ha observado que pacientes con diarrea nosocomial no debida a *C. difficile* (Gu, 2016) y pacientes hospitalizados a los que se les administró terapia antibiótica (Milani, 2016) también conforman *clusters* diferentes a los controles sanos mediante PCoA. Por consiguiente, tampoco es un elemento diferenciador único del estado de colonización e infección por *C. difficile*.

Los resultados de alfa y beta diversidad y riqueza se traducen en drásticas alteraciones en la composición a nivel de *phylum* en los individuos infectados y colonizados por *C. difficile* con respecto a los controles sanos. En los *phylum* mayoritarios encontramos en ambos grupos CDI y P una muy fuerte depleción de Firmicutes, un aumento en Bacteroidetes y una expansión de Proteobacteria. Este hecho sería responsable que en los análisis de agrupamiento conformen dos

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

clusters separados de los controles sanos, aunque con cierto grado de solapamiento entre ellos.

La reducción de Firmicutes en infectados y colonizados por *C. difficile* conllevaría a la pérdida de varios mecanismos de la resistencia a la colonización de patógenos intestinales ejerce una microbiota intestinal sana, rica y diversa. Este hallazgo, corroborado por varios autores (Weingarden, 2014; Shahinas, 2012; Gu, 2016; Zhang, 2015; Manges, 2010) implica una disminución en AGCC a nivel intestinal. Los clostridiales son los principales productores de AGCC, en especial de butirato que es producto de la fermentación anaerobia, que presentan varias funciones que inhiben la proliferación de patógenos intestinales. En primer lugar, el butirato provoca un pH ácido en el intestino grueso que inactiva enzimas microbianos y ciertos patógenos. En segundo lugar, es la fuente de energía principal de los colonocitos lo que conlleva a una reducción de la carga osmótica. En tercer lugar y más importante desde el punto de vista de la patogénesis de CDI, es que presenta un potente efecto antiinflamatorio. Entre otras acciones, el butirato induce la expansión y función de los linfocitos T reguladores (Buonomo, 2016), que contribuye a que se produzca un control fino de la respuesta inmune. Debido a que las toxinas TcdA y TcdB provocan la secreción de citocinas proinflamatorias por parte de las células inmunes epiteliales y la degranulación de mastocitos, que se traduce en una respuesta inmune exacerbada frente a *C. difficile* que conlleva la presencia de clínica, una respuesta inflamatoria intacta combatiría la infección sin generar efectos adversos. La depleción de miembros butirogénicos de Firmicutes se traduciría en un aumento del stress oxidativo, del riesgo de infecciones oportunistas intestinales, y la creación de un ambiente proinflamatorio.

La expansión del *phylum* Proteobacteria en pacientes con CDI e individuos colonizados por *C. difficile* es consecuencia de la depleción de bacterias butirogénicas anteriormente comentadas. Este hecho conlleva una mayor disponibilidad de oxígeno y a una ventaja selectiva de los anaerobios facultativos como Proteobacteria en detrimento de los anaerobios estrictos (Rivera-Chávez, 2016). Es un hallazgo común en los pacientes infectados (Weingarden, 2014; Shahinas, 2012; Gu, 2016; Manges, 2010) y colonizados (Zhang, 2015; Dong, 2018;

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

Han, 2019) por *C. difficile* y posiblemente el más robusto marcador de disbacteriosis en términos generales (Shin, 2015). Su presencia provoca efectos adversos puesto que son patógenos oportunistas reconocidos.

Bacteroidetes es otro *phylum* mayoritario de la microbiota intestinal que encontramos elevado en los pacientes con CDI y en los individuos colonizados por *C. difficile*. No obstante, este hallazgo es contradictorio puesto que es un *phylum* de potenciales efectos beneficiosos a nivel de catabolismo de polisacáridos complejos y del modelaje de la respuesta inmune (He, 2007). Asimismo, varios autores han evidenciado que sus cantidades se ven reducidas en la CDI (Weingarden, 2014) y el estado de colonización por *C. difficile* (Zhang, 2015). Una explicación posible pudiera ser que nuestra cohorte de controles sanos presenta una abundancia relativa media de Bacteroidetes “más reducida de lo habitual” y de Firmicutes “más abundante de lo habitual”. Aunque ambos *phylum* sumen más del 80%, como suele ocurrir en una microbiota intestinal sana, sí que parece que está algo desnivelada, aunque esto no suponga que sea una microbiota disruptiva, ya que presenta elevada riqueza y alfa diversidad (Human Microbiome Project Consortium, 2012).

Por consiguiente, con respecto a los tres *phylum* mayoritarios, en nuestra cohorte de individuos colonizados por *C. difficile* las diferencias en la composición de la microbiota intestinal con respecto a los controles sanos son bastante similares a las halladas en nuestra cohorte de pacientes con CDI. A este respecto recordemos que la colonización puede explicarse por factores dependientes de la virulencia de la cepa causal de *C. difficile*, o por el grado de compromiso de la microbiota intestinal que es insuficiente para que se establezca una completa virulencia, es decir, una completa germinación y toxicidad suficiente para que se establezca la clínica. Nuestros resultados muestran también que el estado de colonización es un estado disruptivo de la microbiota intestinal en mayor o menor grado de forma similar a la disbacteriosis franca observada en los pacientes con CDI. En un sujeto colonizado se ha debido producir una disbacteriosis previa en mayor o menor grado para que sea posible la colonización de *C. difficile*, pero a su vez, en el contexto de esa disbacteriosis deben existir grupos de bacterias que minimicen la replicación, germinación y toxicidad necesarias para que se

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

establezca la virulencia completa. Los resultados hallados al respecto de la alfa y beta diversidad, riqueza y abundancias relativas de los *phylum* mayoritarios Firmicutes, Bacteroidetes y Proteobacteria todavía no evidenciaron tales diferencias entre individuos infectados y colonizados por *C. difficile*.

Volviendo al *phylum* Firmicutes, el grueso de la drástica depleción, tanto en pacientes infectados como en individuos colonizados por *C. difficile*, es debido a elevadas disminuciones en la abundancia relativa de las familias Lachnospiraceae y Ruminococcaceae y a sus géneros como *Faecalibacterium*, *Subdoligranulum*, *Ruminococcus 2*, *Agathobacter* y *Roseburia*. Nuestros resultados al respecto concuerdan con lo hallado en estudios anteriores, tanto en infectados (Antharam, 2013; Weingarden, 2014) como en colonizados por *C. difficile* (Zhang, 2015). Al respecto de los géneros a expensas de los cuales se produce las disminuciones de estas familias aparece una mayor variabilidad. Esto puede ser debido a que la microbiota intestinal conforma un ecosistema dinámico con funciones fisiológicas, metabólicas, inmunológicas y de protección frente a patógenos, que es estable en base a que existe un grado de redundancia funcional de sus miembros, es decir, de un *core* funcional. Por tanto, la disminución relativa en los géneros de estas familias mayoritarias comparada con cohortes de individuos de referencia puede ser variable, ya que unos cuantos géneros ejercerían las mismas funciones. No obstante, en los estudios anteriores aparecen disminuciones en géneros que aparecen en el nuestro como *Faecalibacterium*, *Subdoligranulum* y *Roseburia*. La conclusión que podemos extraer es que tanto en pacientes con CDI como en individuos colonizados por *C. difficile* se establece una microbiota intestinal con la capacidad para sintetizar butirato muy disminuida. Las consecuencias debido a esto es que también debe existir un ambiente intestinal proinflamatorio en los individuos colonizados, aunque este hecho no debe ser suficiente por si solo para distinguir infección y colonización por *C. difficile*. De hecho, la depleción de las familias Lachnospiraceae y Ruminococcaceae también se ha encontrado en cohortes de pacientes con diarrea nosocomial no debida a *C. difficile* (Antharam, 2013; Schubert, 2016).

Por otra parte, el metabolismo de los ácidos biliares a nivel intestinal es de gran importancia en la patogénesis de la CDI, puesto que los ácidos biliares

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

primarios presentan una actividad germinante de las esporas de *C. difficile* mientras que los secundarios presentan actividad inhibitoria. Los ácidos biliares primarios que llegan al intestino grueso en muy baja cantidad porque la mayor parte son reabsorvidos, son biotransformados en ácidos biliares secundarios mediante enzimas secretados por la microbiota intestinal de forma específica. En individuos sanos con una microbiota intestinal rica y diversa, los ácidos biliares primarios germinantes, son rápidamente desconjugados y transformados en ácidos biliares secundarios por ciertos grupos de bacterias, reduciendo su concentración y la probabilidad de germinación de las esporas de *C. difficile* (Sarker, 2012). El enzima clave es BaiCD, no obstante, esta capacidad esta limitada a un grupo muy reducido de bacterias. Las bacterias cuyo genoma codifique estos enzimas producirían un efecto inhibitorio sobre la germinación de las esporas de *C. difficile*. Perder estos grupos supondría una pérdida de este mecanismo de resistencia a la colonización. Muchas de las especies con actividad BaiCD se incluyen en el *cluster Clostridium XIVa*, muy relacionadas filogenéticamente unas con otras (Ridlon, 2016) que comprende principalmente a la familia Lachnospiraceae (Collins, 1994). *Clostridium Scindens* presenta una actividad BaiCD muy elevada y aunque se engloba dentro del género *Lachnoclostridium*, que está aumentado en los pacientes con CDI con respecto a los controles sanos e individuos colonizados por *C. difficile*, mediante la secuenciación del gen ADNr 16S logramos suficiente profundidad para diferenciar que *C. Scindens* es ligeramente mayor en el grupo de individuos colonizados que en pacientes con CDI, aunque de forma no significativa, pero remarcando la importancia de este minoritario grupo en la inhibición de un microambiente intestinal propicio para la germinación de las esporas de *C. difficile* que se amortiguaría en los individuos colonizados. Respecto al género *Blautia*, que también como grupo de bacterias con actividad BaiCD (Buffie, 2015; Daquigan, 2017) se conserva de igual forma en el grupo P en mayor abundancia que en el grupo CDI, llegando a la misma conclusión. El último género que destacamos con actividad BaiCD es *Eubacterium* (Buffie, 2015; Daquigan, 2017). El género *Eubacterium* se situa en en diferentes familias, por las razones antes esgrimidas sobre la continua reorganización de los clostridiales. En la familia Lachnospiraceae se han situado varios grupos como *Eubacterium ventriosum Group*, *Eubacterium eligens Group*, *Eubacterium xylanophilum Group*, *Eubacterium ruminantium Group*, *Eubacterium fissicatena Group*, *Eubacterium*

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

hallii Group y *Eubacterium oxidoreducens* Group. Todos estos grupos se encuentran en muy escasa abundancia relativa en el grupo de controles sanos y se observa una práctica erradicación en los pacientes con CDI y una mínima conservación en los sujetos colonizados. En *Eubacterium coprostanoligenes* Group de la familia Ruminococcacea se observa la misma tendencia. Todos estos resultados nos confirman que la relación entre el metabolismo de los ácidos biliares por parte de miembros de la microbiota intestinal y su relación con la patogénesis de la CDI es un mecanismo esencial, y el abordaje del presente estudio mediante un grupo de pacientes con CDI y un grupo de individuos colonizados de *C. difficile* así lo muestra.

Como contrapunto a la fuerte disminución de la familia Lachnospiraceae, encontramos una expansión de interés en dos de sus géneros. Los géneros *Ruminococcus Gnavus* Group y *Ruminococcus Torques* Group presentan incrementos de sus abundancias relativas, en los pacientes con CDI y en los individuos colonizados por *C. difficile* con una mayor tendencia en los colonizados aunque sin diferencias significativas. Ambos géneros, a diferencia de otros miembros del cluster *Clostridium XIVa* no son productores de butirato (Dethlefsen, 2006), y son considerados especialistas degradadores de mucina (Sicard, 2017). Por consiguiente, estos géneros dotarían de una ventaja selectiva para la colonización y/o infección a patógenos oportunistas como *C. difficile*. Su presencia no sería discriminadora de ninguno de los dos estados, pero coadyuvaría a la disbacteriosis generada en ambas cohortes de sujetos. Este hallazgo no ha sido documentada en ningún al respecto de la disbacteriosis establecida y asociada a la presencia de *C. difficile*, pero sí en otras situaciones como la enfermedad de Crohn (Joossens, 2011).

Siguiendo con otras familias minoritarias dentro del *phylum* Firmicutes, Veillonellaceae sufre una reconstrucción, tanto en individuos infectados como colonizados por *C. difficile*, donde desaparecen géneros que podríamos considerar “intrascendentes” para nuestro interés, como *Megasphera* y *Megamonas*, mientras que *Veillonella* se expande. *Veillonella* es considerado como un patógeno oportunista (causante de infecciones extraintestinales oportunistas) que se expande debido a la simplificación de la microbiota intestinal, y a la aparición de

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

nuevos nichos ecológicos disponibles en pacientes con CDI (Antharam, 2013; Weingarden, 2014) y en individuos colonizados por *C. difficile* (Han, 2019). El hecho que este hallazgo también se produzca en el grupo de individuos colonizados por *C. difficile* nos indica que no se trataría de un grupo demasiado importante ni discriminatorio de ambos estados. No obstante, es un indicador de disbacteriosis franca en ambos estados.

Dentro de las familias productoras de ácido láctico del *phylum* Firmicutes encontramos diferencias en la composición interesantes en los géneros *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Lactobacillus*. Con respecto a *Streptococcus* se observa incrementos en ambos grupos CDI y P con respecto a los controles sanos, mayor en el caso de los individuos colonizados por *C. difficile*, aunque la diferencia no es significativa. Los trabajos de comparación de microbiota intestinal de pacientes con CDI frente a controles sanos, frente a individuos colonizados por *C. difficile* o en estudios donde se ha comparado esta en pacientes con CDI antes y después a un FMT, han arrojado resultados discrepantes y apenas se han puesto en valor al género *Streptococcus* en la discusión de estos. Algunos autores han considerado este género como patógeno oportunista común que se expande cuando la microbiota intestinal es corrompida por antibióticos (Gu, 2016). Por el contrario, otros no lo encontraron como miembro característico de la microbiota intestinal en pacientes con CDI (Schubert, 2014; Antharam, 2013). En estudios donde se ha observado la variación de la microbiota intestinal en pacientes con CDI tras un FMT se evidenció que *Streptococcus* estaba presente en las muestras “pre FMT”, pero que caía drásticamente en las muestras “post FMT” (Weingarden, 2014; Brown, 2018). En trabajos de comparación de la microbiota intestinal en pacientes con CDI y portadores asintomáticos de *C. difficile* se ha encontrado *Streptococcus* resulta ligeramente superior en los portadores asintomáticos que en el grupo de pacientes con CDI y en controles sanos (Zhang, 2015). La bibliografía al respecto de este género nos lanza resultados dispares, sugiriendo este hecho que la importancia en cuanto a su relación con la patogénesis de la CDI podría ser menor o poco influyente. No obstante, se ha evidenciado en estudios *in vitro* que el ácido láctico reduce los niveles de las toxinas TcdA y TcdB de *C. difficile* de forma dosis dependiente y de forma independiente a la carga bacteriana (Kolling, 2012). Por consiguiente, el género *Streptococcus* y el resto de LAB resultarían

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

beneficiosos en este aspecto. Al igual que ocurre con la expansión del *phylum* Proteobacteria, pensamos que la expansión que se produce en el género *Streptococcus* es debida a la pérdida en la riqueza de anaerobios estrictos que supone una ventaja selectiva para los anaerobios facultativos (Rivera-Chávez, 2016; Donohoe, 2012). Por tanto, en base a nuestros resultados pensamos que la aparición del género *Streptococcus* surge como “efecto” y no como “causa” en la disbiosis presente en pacientes con CDI e individuos colonizados por *C. difficile*. Asimismo, si bien es un género con potencial poder patógeno, pensamos que en el contexto de la CDI se trata de un grupo protector, debido principalmente a la producción metabólica de ácido láctico. El hecho que en nuestro estudio se sitúen sus niveles de forma superior en individuos colonizados que en infectados por *C. difficile* nos lo sitúa como posible candidato a factor protector de moderada importancia, que explique en parte, la no transición de un estado de colonización sin clínica a un estado de infección. Con respecto al género *Enterococcus* nuestros resultados muestran otro incremento, aunque muy leve, en pacientes con CDI y en individuos colonizados por *C. difficile* con respecto a los controles sanos y sin diferencias significativas. Varios y diversos trabajos han evidenciado que los pacientes con CDI presentan incrementos del género *Enterococcus* como miembro de la microbiota intestinal (Sangster, 2012; Milani, 2016; Antharam, 2013; Gu, 2016) aunque también se ha evidenciado en pacientes con diarrea nosocomial no debida a *C. difficile* (Antharam, 2013; Gu, 2016). En individuos colonizados por *C. difficile* también se ha evidenciado la presencia de *Enterococcus* (Ozaki, 20014; Zhang, 2015). A pesar de estos hallazgos y los nuestros se desconoce el efecto y el rol de *Enterococcus* en la patogénesis de la infección y/o colonización por *C. difficile*. *Enterococcus* es un género anaerobio facultativo que es capaz de adaptarse a la presencia de O₂ en su nicho ecológico y adaptarse a un metabolismo oxidativo en ciertas situaciones. También la pérdida de anaerobios estrictos en los grupos CDI y P le supone una ventaja selectiva (Rivera-Chávez, 2016) por el mismo mecanismo que al género *Streptococcus*. Por consiguiente, la aparición de *Enterococcus* es “efecto” y no “causa” de la disrupción de la microbiota intestinal de estos individuos. Tampoco, nuestros resultados muestran que sea un hallazgo diferenciador de la microbiota intestinal de los pacientes con infección y colonización por *C. difficile*. Algunos de los autores mencionados, debido a que *Enterococcus* presenta factores de virulencia y poder patógeno,

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

comportándose como un patógeno oportunista en ciertas situaciones, piensan que podría colaborar en la patogénesis de la CDI. Para nosotros *Enterococcus* presenta una dualidad de efectos positivos (debido a la actividad frente a *C. difficile* del ácido láctico) o negativos (debido a la citolisina y demás factor de virulencia) en función de la cepa de *E. faecalis* o *E. faecium* que formen parte de la microbiota intestinal de los pacientes con CDI o individuos colonizados por *C. difficile*. Por consiguiente, estamos de acuerdo que se trata de un género característico de la colonización y/o infección por *C. difficile*, pero que para poder sacar conclusiones sobre el poder que ejerce en la patogénesis de la CDI se debería recurrir a estudios metagenómicos para conocer la especie y el grado de virulencia de esta. Por último, *Lactobacillus* muestra otro incremento, aunque muy leve, en pacientes con CDI y en individuos colonizados por *C. difficile* con respecto a los controles sanos, sin diferencias significativas aunque superior en el grupo CDI. Se trata de un género poco relacionado con la patogénesis con la CDI al respecto de la microbiota intestinal, y se ha incidido más bien poco en su importancia al respecto, aunque algún autor ha destacado unos resultados similares a los nuestros (Gu, 2016), incluso en los individuos colonizados por *C. difficile* (Zhang, 2015). Los pocos estudios muestran resultados dispares sobre si se trata de un género protector (Shahinas, 2012) o susceptible (Brown, 2018) al desarrollo de CDI. Además, *Lactobacillus* se compone de más de 170 especies y varias subespecies con una gran variabilidad fenotípica y genotípica que hace muy complicado generalizar acerca del género. Aunque se ha asociado a ciertas infecciones, lo cierto es que *Lactobacillus* presenta potenciales efectos beneficiosos debido a la producción de AGCC, en especial el ácido láctico, con los efectos antes mencionados sobre *C. difficile* y sus toxinas, y otras sustancias de interés como los ácidos linoleicos de acción antiinflamatoria, los compuestos fenólicos (Mikelsaar, 2016) y ciertas bacteriocinas (Pessione, 2012). Pero hay que remarcar que no todas las especies de *Lactobacillus* tienen propiedades probióticas inhibiendo el sobrecrecimiento de patógenos intestinales como *C. difficile*, ya que la eficacia de una bacteria probiótica es cepa dependiente (Goldstein, 2017). Por consiguiente, *Lactobacillus* es un género complejo de interpretar en el contexto de la CDI. Su expansión en los pacientes con CDI y en individuos colonizados por *C. difficile*, es debido a la misma razón por la que se produce la expansión de otras LAB como *Streptococcus* y *Enterococcus*. Es difícil de prever lo que supone a la patogénesis de

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

la CDI este género, puesto que algunas especies y cepas de estas especies, no todas, presentan efectos beneficiosos sobre la CDI y que, por otra parte, se han documentado casos de infecciones por *Lactobacillus*, pudiéndose comportar como un patógeno oportunista. Lo cierto es que se deberían recurrir a estudios metagenómicos para caracterizar las especies de *Lactobacillus* a expensas de las que se produce su aumento en los pacientes con CDI y en los individuos colonizados por *C. difficile*, e incluso el tipo de cepa, para poder sacar conclusiones acerca de si suponen protección o susceptibilidad al desarrollo de la CDI. Lo que si que concluimos es que tanto *Lactobacillus* como el resto de LAB son marcadores de disbacteriosis en ambos grupos de individuos.

Dentro de la familia Peptostreptococcaceae del *phylum* Firmicutes se sitúa el género *Clostridioides* que tiene como única especie a *C. difficile*. *Clostridioides* está incrementado, en los grupos CDI y P con respecto al de los controles sanos (donde no hay presencia de *C. difficile*) de forma significativa, aunque con una abundancia relativa casi idéntica muy escasa. La positividad del gen *tcdB* por PCR no distingue entre colonización e infección, ya que en nuestra cohorte de individuos colonizados por *C. difficile* el 53% presenta cepas toxigénicas (obviamente el 100% de las cepas de *C. difficile* en el grupo de pacientes con CDI son toxigénicas). Nuestros resultados sugieren que sugiriendo que la mayor presencia de *C. difficile* no distingue infección ni colonización. Algún autor ha evidenciado que la carga del gen *tcdB*, relacionado con la mayor presencia de toxina TcdB libre, tampoco correlaciona con un estado de colonización o infección, diversidad, estructura de la microbiota intestinal o cambios importantes en géneros productores de butirato beneficiosos (Han, 2019), enlazando con nuestros resultados. Las toxinas TcdA y TcdB son las responsables de la clínica producida por *C. difficile*. Los genes codificantes *tcdA* y *tcdB* se localizan en su locus de patogenicidad y pueden producirse cambios inserciones, deleciones y mutaciones puntuales que conforman una heterogeneidad genética, dando lugar a una serie de diferentes toxinotipos. Esto supone que podrían existir cepas con diferente actividad y especificidad de sus toxinas con respecto a la cepa de referencia de *C. difficile* VPI 10463 (Rupnik, 2016), por consiguiente, son importantes porque muestran propiedades funcionales de las variantes de las toxinas con variabilidad en su actividad y producción. No obstante, la correlación

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

entre los diferentes toxinotipos que nos permita discriminar estados de infección y colonización no se ha clarificado. Una pista podría la variante del tcdB del ribotipo 027 que codifica una toxina de mayor poder citotóxico que las cepas clásicas (Stabler, 2009). Por otra parte, la variabilidad del espectro clínico que presenta la CDI, incluso pudiendo establecerse un estado de colonización asintomática, es debido a condiciones del individuo (como el grado de compromiso de la microbiota intestinal) y a la virulencia de la cepa causal de *C. difficile*. Por consiguiente, nuestros resultados apuntan a que la abundancia relativa de *C. difficile* no es un elemento diferenciador del estado de colonización e infección y que habría que buscar factores de virulencia como el toxinotipado en futuros estudios como tal.

En último lugar al respecto del *phylum* Firmicutes, la familia Erysipelatrichaceae es la última donde observamos diferencias en la composición de sus géneros de los individuos colonizados e infectados por *C. difficile* con respecto a los controles sanos. En el género *Erysipeloclostridium* se observa una expansión en pacientes con CDI y en individuos colonizados por *C. difficile*, aunque de forma no significativa, con mayor abundancia relativa en los infectados. *Erysipelatoclostridium* es un género potencialmente patógeno, escasamente prevalente que suele afectar a pacientes inmunocomprometidos, menores de 5 años y ancianos (Zakham, 2019). También se ha asociado a casos de peritonitis, absceso intestinal y colitis pseudomembranosa (Alcalde-Vargas, 2012), aunque es un grupo muy minoritario de la microbiota intestinal. La expansión observada en ambos grupos CDI y P es presumiblemente debida a la aparición de nuevos nichos ecológicos debido a la pérdida de diversidad y riqueza. Debido al carácter patógeno de este género y al efecto proinflamatorio intestinal de la familia Erysipelatrichaceae (Dinh, 2015), consideramos este hallazgo como relevante y que podría tener repercusión en la transición del estado colonización asintomático hacia un estado de infección, ya que la expansión es más abundante en los pacientes con CDI. Este dato no ha sido valorado en ningún estudio acerca de la patogénesis de la CDI y su relación con la microbiota intestinal, y consideramos que debiera seguir siendo investigado. Con respecto al género *Clostridium innocuum Group*, el comportamiento es similar, observándose incrementos en ambos grupos CDI y P con respecto a los controles sanos (donde

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

la abundancia relativa es prácticamente del 0%), siendo significativas las diferencias entre los infectados y los colonizados por *C. difficile* y los infectados frente a los controles sanos. Se trata de un miembro minoritario de la microbiota intestinal con poder patógeno capaz de producir infecciones extraintestinales pero muy graves (Chia, 2017), sobre todo en pacientes ancianos con enfermedades de base e infecciones gastrointestinales secundarias al consumo de antibióticos como diarrea, colitis severa y colitis pseudomembranosa (Chia, 2018). Asimismo, es un género resistente a la vancomicina de forma constitutiva, debido a particularidades en la composición del peptidoglicano de su pared celular. Por tanto, de igual forma que con *Erysipelatoclostridium*, la expansión de *Clostridium innocuum* Group es debida a la aparición de nuevos nichos ecológicos. El hecho que el incremento sea significativamente superior en pacientes con CDI con respecto a los individuos colonizados por *C. difficile* pensamos que es importante y se debe tener en cuenta en la patogénesis de la CDI. Debido a su poder como patógeno intestinal (Chia, 2017) y capacidad inflamatoria (Dinh, 2015) podría tener repercusión como grupo predisponente a desarrollar CDI. Este hecho no ha sido valorado en ningún estudio acerca de la patogénesis de la CDI. Por consiguiente, los miembros patógenos de la familia Erysipelatrichaceae que hemos mencionado se expanden en los pacientes con CDI, pero en mucho menor medida en los individuos colonizados por *C. difficile* y debido a ello son predisponentes al desarrollo de CDI.

El *phylum* Bacteroidetes sufre una total reestructuración de su composición a nivel de familias y géneros tanto en pacientes con CDI como en individuos colonizados por *C. difficile*. Si bien las familias mayoritarias se comportan de forma similar en ambas cohortes de pacientes infectados y colonizados por *C. difficile*, en las familias minoritarias sí encontramos diferencias. De la siguiente manera, se observa un llamativo incremento significativo del género *Bacteroides* en ambos grupos CDI y P, con respecto a los controles sanos. *Bacteroides* es un género en el cual hay un general consenso sobre la asociación de su depleción con la CDI y la pérdida de resistencia a la colonización (Zhang, 2015; Dong, 2018; Rea, 2012; Weingarden, 2014; Brown, 2018; Shahinas, 2012). No obstante, en algunos trabajos encontramos resultados similares a los nuestros, donde hemos encontrado un aumento en su abundancia relativa tanto en pacientes infectados (Antharam,

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

2013) como en colonizados por *C. difficile* (Han, 2019). *Bacteroides* conforma un género heterogéneo bioquímica y fisiológicamente. Presenta una capacidad muy adaptable al medio y una gran capacidad de metabolización de polisacáridos provenientes de la dieta y del mismo hospedador. Es por ello su amplia distribución como miembro mayoritario de la microbiota intestinal. Consideramos insustancial una teórica pérdida de *Bacteroides*, mostrada por muchos autores, al respecto de la patogénesis de la CDI, debido a que la competición por los nutrientes suele ser mayor entre bacterias cercanas filogenéticamente, por tanto, sería más probable la expansión de *C. difficile* con la depleción del *phylum* Firmicutes. De hecho, se ha observado que *C. difficile* es capaz de degradar la mucina de la capa mucosa y de metabolizar los ácidos siálicos que la componen (Ng, 2013), permitiéndole su expansión. Por tanto, la mayor disponibilidad de los ácidos siálicos de la mucosa intestinal que se genera tras una disbacteriosis post antibiótica sería un factor importante en la expansión de *C. difficile* y debido a la gran actividad sobre los carbohidratos del género *Bacteroides*, el incremento transitorio post antibiótico de estos monosacáridos liberados desde la mucosa intestinal proporcionaría una oportunidad de expansión para *C. difficile*. Asimismo, *Bacteroides* también es considerado un patógeno oportunista, ya que es agente etiológico de multitud de infecciones, principalmente intraabdominales. Por otra parte, mediante estudios *in vitro* y modelos murinos se ha evidenciado en algunas especies una capacidad para mitigar la CDI (Deng, 2018; Yoon, 2017) y presenta una actividad inmunomoduladora en procesos inflamatorios intestinales que podría limitar la respuesta inmune exacerbada que se observa en los pacientes con CDI (Hee, 2007). Por consiguiente, pensamos que es difícil establecer si se trata de un género que indique protección o susceptibilidad a desarrollar CDI. Al producirse el incremento de *Bacteroides* en ambos grupos CDI y P, no se trata de un género que explique en parte la no transición desde un estado de colonización a infección, ya que se observa igual de aumentado en los individuos colonizados de *C. difficile*. Por último, es llamativa la abundancia relativa tan baja de *Bacteroides* en el grupo de los controles sanos. Pensamos que la pérdida de diversidad y riqueza observado en los grupos CDI y P haya afectado en mayor medida al *phylum* Firmicutes con respecto a *Bacteroidetes*, y que debido a la baja abundancia

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

relativa de *Bacteroides* en los controles sanos, pudiera parecer que aumenta en los pacientes infectados y colonizados por *C. difficile*.

Siguiendo con la familia Tannerellaceae del *phylum* Bacteroidetes observamos incrementos significativos del género *Parabacteroides* en los individuos colonizados e infectados por *C. difficile*, en mayor medida en los pacientes con CDI, aunque sin diferencias significativas entre los grupos CDI y P. Pocos estudios han destacado la importancia del género *Parabacteroides* con respecto a su papel en la patogénesis de la CDI. *Parabacteroides* suele presentar abundancias relativas incrementadas tanto en pacientes con CDI y en individuos colonizados por *C. difficile*, en mayor o menor medida, en línea con nuestros resultados (Rea, 2012; Zhang, 2015; Han, 2019). Algún autor, incluso, ha manifestado que se trata de un género marcador de recurrencia (Khanna, 2016a). Ciertamente, existen muchas evidencias de que *Parabacteroides* es un género patógeno oportunista que se expande cuando se genera una disbiosis intestinal y que colabora en la clínica observada en varios trastornos intestinales (Lopetuso, 2017; Dziarski, 2016). Asimismo, *Parabacteroides* es productor de succinato y se ha visto que el succinato está presente en muy baja concentración en el intestino y que se eleva de forma transitoria después de administración antibiótica o después de un tratamiento que alterara el tránsito intestinal. *C. difficile* es capaz de expandirse utilizando como fuente de energía este succinato más accesible (Ferreira, 2014). Concluimos que es un género característico de la CDI y marcador de la disbiosis presente tanto en individuos colonizados como infectados. Es difícil apresurarse a decir que es un género que diferencia el estado de los infectados y de los colonizados, ya que a raíz de sus mecanismos subyacentes en la patogénesis de la CDI y de la bibliografía al respecto, harían falta estudios metagenómicos para concretar que especies están en juego.

Por último, al respecto de la familia Prevotellaceae, aunque bien es cierto que disminuye de forma significativa en pacientes con CDI e individuos colonizados por *C. difficile* con respecto a los controles sanos, a nivel de los géneros que la componen sufre una total reconstrucción. Asimismo, destacan la práctica erradicación del género *Prevotella 9* en los pacientes con CDI con respecto a controles sanos que no se observa en el grupo P y la expansión de *Prevotella 7* en

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

el grupo CDI que no se observa en los controles sanos ni en el grupo P. La pérdida del género *Prevotella* y de otros miembros de la familia Prevotellaceae en los pacientes con CDI (Vincent, 2013; Skraban, 2013; Rea, 2012) e individuos colonizados por *C. difficile* (Zhang, 2015; Han, 2019; Dong, 2018) es un hallazgo evidenciado en muchos estudios. Se suele concluir que *Prevotella* es un género protector debido a su papel en la digestión de carbohidratos complejos y a la producción de sustratos esenciales para el colonocito. No obstante, se ha sugerido que *Prevotella* es la causa principal de la inflamación intestinal persistente en pacientes VIH generando a una alteración funcional de la mucosa intestinal e inflamación sistémica crónica (Dillon, 2014), se ha visto que en ratones tratados con antibióticos la adición de *Prevotella copri* incrementa la susceptibilidad a la colitis inducida por dextrato sulfato sódico (Scher, 2013) y también que, *P. copri* es capaz de potenciar la colitis en ratones tanto con disbacteriosis como con la microbiota intestinal intacta (Dziarski, 2016). Además, *Prevotella*, al igual que *Parabacteroides* es un género cuyo principal metabolito generado es el succinato y podría permitir o ayudar en la expansión de *C. difficile* mediante el mismo mecanismo. Por tanto, se trata de un género con una gran diversidad génica, existiendo una gran variabilidad en las cepas y tenemos una dualidad de efectos patobiontes y beneficiosos. Nuestros resultados muestran que *Prevotella 9* está erradicada en el grupo CDI, aunque sin embargo se conserva en los individuos colonizados por *C. difficile* y en los controles sanos, con lo que podríamos concluir que este género comprendería a grupos beneficiosos, los cuales se verían privados los pacientes con CDI y no los controles sanos ni los colonizados. Por otra parte, el género *Prevotella 7* se expande en los pacientes con CDI y se mantiene erradicado en los controles sanos y en los colonizados, pudiendo comprender a especies patobiontes proinflamatorias. Debido a la pérdida de miembros del phylum Firmicutes y de grupos productores de butirato se produciría un ambiente intestinal proinflamatorio, que permitiría la expansión de especies comprendidas en el género *Prevotella 7* en los pacientes con CDI. Esto por alguna razón no dilucidada no ocurriría en los individuos colonizados por *C. difficile*. Por tanto, si mediante estudios metagenómicos se identifican especies beneficiosas y proinflamatorias podríamos encontrar un biomarcador que explique en parte la diferencia entre el estado de colonización e infección por *C. difficile*. Para ello, los niveles de *Prevotella 7* y *Prevotella 9* nos parece un buen punto de partida. Con

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

respecto al género *Paraprevotella* es un grupo minoritario de la microbiota intestinal de los controles sanos y se observa una escasa disminución significativa en los individuos colonizados por *C. difficile* y un escaso aumento significativo en los pacientes con CDI. El comportamiento de este género en individuos colonizados e infectados ha mostrado resultados dispares (Milani, 2016; Han 2019). El hecho de que sea un género productor de succinato podría permitir la expansión de *C. difficile* (Ng, 2013), como explicamos con el género *Prevotella*. Por consiguiente, aunque *Paraprevotella* es un género poco estudiado en su relación con la patogénesis de la CDI, en base a nuestros resultados y su asociación con otras enfermedades (Ye, 2018; Lv, 2016), postulamos que podría tratarse de un género que favorecería la creación de un ambiente inflamatorio que ayudaría a desencadenar una respuesta inmune exacerbada en los pacientes con CDI y a aumentar el daño tisular. Asimismo, la no expansión de este género en los individuos colonizados por *C. difficile* resultaría beneficioso para evitar el desarrollo de clínica.

Con respecto a la expansión del *phylum* Proteobacteria la observamos tanto en los pacientes con CDI como en los individuos colonizados por *C. difficile*. Dicho incremento es a expensas del género *Escherichia/Shigella*. El incremento de la familia Enterobacteriaceae a expensas del género *Escherichia/Shigella* es un hallazgo frecuente en los pacientes con CDI (Milani, 2016; Gu, 2016; Weingarden, 2014; Shahinas, 2012; Brown, 2018). Asimismo, se ha puesto de manifiesto que la principal especie que se incrementa en este género es *Escherichia coli*. Por consiguiente, vamos a asumir que *E. coli* es la especie predominante en nuestros resultados al respecto. Nuestros resultados, además, muestran un incremento, además de en los pacientes con CDI, en los individuos colonizados por *C. difficile*. Este hecho también ha sido observado en algunos de los pocos trabajos que han incluido una cohorte de sujetos colonizados (Han, 2019; Zhang, 2015). Por consiguiente, puesto que en los pacientes con CDI y los individuos colonizados por *C. difficile* de nuestro estudio se encuentran incrementos similares pronunciados de *Escherichia/Shigella* donde probablemente *E. coli* será el componente mayoritario de este *cluster*, y conociendo que existen varias cepas de *E. coli* enteropatógenas, sería interesante conocer la presencia de estas cepas en ambos grupos de estudio. Es por lo cual que formulamos la hipótesis que en el

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

grupo CDI hay una colonización de cepas patogénicas que podrían potenciar los efectos de las toxinas de *C. difficile*. Esta colonización es más susceptible en estos pacientes debido a la pérdida de diversidad y riqueza de la microbiota intestinal que presentan. Por otra parte, esta colonización no se produciría en los individuos colonizados por *C. difficile*. Este hecho podría explicar en parte la diferente expresión clínica en la infección con respecto a la colonización de *C. difficile*. Asimismo, nuestros resultados también muestran una presencia de *Proteus* en los pacientes con CDI, que no se observa en los controles sanos ni en los individuos colonizados por *C. difficile*. Esto es presumiblemente debido a que la microbiota intestinal de estos pacientes lo permite y no así la de los otros dos grupos. La presencia de *Proteus* agrava la disbacteriosis de esos pacientes y potencia la presencia de clínica, ya que hemos visto que adopta un rol oportunista en coinfecciones con otros patógenos intestinales (Müller, 1986). Este hecho no se produciría en los individuos colonizados y explicaría en parte junto a otras alteraciones y diferencias que *C. difficile* no sea causante de clínica en estos individuos.

En la composición de la microbiota intestinal de individuos infectados y colonizados por *C. difficile*, a nivel de los *phylum* minoritarios Actinobacteria y Verrucomicrobia sí que encontramos diferencias importantes. Con respecto a Actinobacteria es destacable la práctica erradicación estadísticamente significativa del género *Bifidobacterium* en los pacientes con CDI con respecto a los controles sanos, y la parcial conservación en los individuos colonizados. Llama la atención los escasos estudios que han puesto en valor la posible presencia o ausencia de *Bifidobacterium* y su rol en la patogénesis de la CDI. Todos estos limitados trabajos nos indican que en pacientes con CDI se observaría una disminución de *Bifidobacterium* (Zhang, 2015; Milani, 2016; Skraban, 2013) aunque, no obstante, en individuos colonizados por *C. difficile*, la bibliografía al respecto aporta resultados dispares (Zhang, 2015; Rea, 2011; Han, 2019). Consideramos a *Bifidobacterium* un género beneficioso, de propiedades antimicrobianas y antiinflamatorias (Boto-Ordóñez, 2014), las cuales podrían ser favorables en el control de *C. difficile*. De forma contraria, niveles disminuidos de *Bifidobacterium* se han correlacionado con el sobrecrecimiento de patógenos intestinales (Hidalgo-Cantabrana, 2017). Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que algunas especies de *Bifidobacterium*

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

son capaces de inhibir el crecimiento de *C. difficile* y disminuir la producción de TcdA y TcdB (Valdés-Varela, 2016), neutralizar TcdA y TcdB (Wei, 2018) y disminuir el daño tisular y la mortalidad en ratones infectados (Yun, 2017). Estas acciones serían debidas a la capacidad de *Bifidobacterium* de modular la respuesta inmune, la síntesis de ácidos orgánicos y la acidificación del microambiente intestinal (Pessione, 2012). Por consiguiente, consideramos muy destacable que se conserve *Bifidobacterium* en los individuos colonizados por *C. difficile*, ya que debido a las propiedades beneficiosas y diferentes mecanismos de acción en la inhibición en patógenos intestinales como *C. difficile*, se explicaría, al menos en parte, que estos individuos no expresen la clínica asociada a la CDI ya que comportan un mejor control del patógeno. Hasta nuestro conocimiento, es la primera vez que se llega a estas conclusiones con respecto a la colonización por *C. difficile* y el papel de *Bifidobacterium*.

Con respecto al otro *phylum* minoritario Verrucomicrobia, también hemos encontrado diferencias destacables en su composición y abundancia relativa entre los pacientes con CDI y los individuos colonizados por *C. difficile*. Hemos observado que estas diferencias observadas son a expensas del género *Akkermansia*, que solo comprende en humanos a la especie *Akkermansia muciniphila*. En el grupo de pacientes con CDI se observa un incremento no estadísticamente significativo mientras que en el grupo de los individuos colonizados por *C. difficile* se observa una disminución estadísticamente significativa, con respecto a los controles sanos. *A. muciniphila* presenta como característica más destacable es la capacidad para fermentar la mucina de la capa mucosa intestinal. Al respecto de la CDI, solo recientemente se ha incidido en la importancia que podría presentar en su patogénesis. Si dos estudios evidenciaron que en pacientes con CDI se observa una expansión de *A. muciniphila* (Sangster, 2016; Milani, 2016), nuestros resultados muestran por primera vez un incremento de *A. muciniphila* en los pacientes con CDI y una disminución en los individuos colonizados por *C. difficile*. Por consiguiente, el incremento de *A. muciniphila* en los pacientes con CDI reflejaría una mayor degradación de la capa mucosa intestinal, lo cual es proceso importante para el desarrollo de dicha infección. En los individuos colonizados por *C. difficile*, de forma interesante, evidenciamos una disminución de *A. muciniphila* que reflejaría una mayor integridad de la mucosa

CAPÍTULO VI – DISCUSIÓN

intestinal. Este hecho, descrito en el presente estudio por primera vez, pensamos que es importante y que diferencia el estado de colonización y de infección de *C. difficile*, junto con el conjunto de diferencias encontradas.

VII - LÍNEAS DE FUTURO.

CAPÍTULO VII. LÍNEAS DE FUTURO

A lo largo de la discusión hemos planteado diversos estudios metagenómicos futuros que vamos a recopilar en este capítulo.

De forma global es sugerible que en un futuro recurramos a una combinación de estudios metabólicos, de genómica funcional y de metagenómica, junto al estudio del gen ADNr 16S para consolidar la evidencia sobre el estado de colonización asintomática por *C. difficile*.

Hemos visto que las manifestaciones clínicas que produce la CDI son muy variables desde leves a muy graves o fulminantes. Incluso se puede producir una colonización asintomática de *C. difficile*. Este espectro de situaciones es debido a que depende de factores que competen al individuo, como el estado inmune, la presencia de comorbilidades, la edad y el grado de compromiso de la microbiota intestinal, y también a *C. difficile* en cuanto a la virulencia de la cepa causal. Nuestros resultados muestran que la abundancia relativa de *C. difficile* es similar en individuos con infección y colonización. Es por lo cual que factores concernientes a *C. difficile* deberían ser tenidos en cuenta en la diferenciación entre la infección y la colonización. Pensamos que las variantes toxintípicas son un ejemplo al respecto. Por tanto, valoramos la importancia de evaluar factores de virulencia de *C. difficile* en un futuro, junto a estudios de secuenciación masiva del gen ADNr 16S y estudios metagenómicos.

El género *Enterococcus* presenta una dualidad de efectos positivos o negativos en función de la cepa de *E. faecalis* o *E. faecium* que formen parte de la microbiota intestinal de los pacientes con CDI o individuos colonizados por *C. difficile*. Nuestros resultados muestran que se trata de un género característico de ambos grupos CDI y P, pero que para poder sacar conclusiones sobre el poder que ejerce en la patogenicidad de la CDI se debería recurrir a estudios metagenómicos para conocer la especie y el grado de virulencia de esta.

CAPÍTULO VII-LÍNEAS DE FUTURO

Con respecto a *Lactobacillus* se deberían recurrir a estudios metagenómicos para caracterizar las especies a expensas de las cuales se produce su aumento en los pacientes con CDI y en los individuos colonizados por *C. difficile* que observamos en nuestro estudio, e incluso el tipo de cepa, para poder sacar conclusiones acerca de si suponen protección o susceptibilidad al desarrollo de la CDI.

El género *Erysipelatoclostridium* presenta un carácter patógeno, así como la familia Erysipelatrichaceae un efecto proinflamatorio intestinal (Dinh, 2015). Nuestros resultados muestran que podría tener repercusión en la transición desde un estado colonización asintomático hacia un estado de infección, ya que su expansión es más abundante en los pacientes con CDI. Este dato no ha sido valorado en ningún estudio acerca de la patogénesis de la CDI y su relación con la microbiota intestinal, y consideramos que debiera seguir siendo investigado. De igual forma que con *Erysipelatoclostridium*, la expansión de *Clostridium innocuum* Group es debida a la aparición de nuevos nichos ecológicos. El hecho que el incremento sea significativamente superior en pacientes con CDI con respecto a los individuos colonizados por *C. difficile* pensamos que es importante y se debe tener en cuenta en la patogénesis de la CDI. Debido a su poder como patógeno intestinal (Chia, 2017) y capacidad inflamatoria (Dinh, 2015) podría tener repercusión como grupo predisponente a desarrollar CDI. Este hecho no ha sido valorado en ningún estudio acerca de la patogénesis de la CDI. Por consiguiente, los miembros patógenos de la familia Erysipelatrichaceae que hemos mencionado se expanden en los pacientes con CDI, pero en mucho menor medida en los individuos colonizados por *C. difficile* y debido a ello son predisponentes al desarrollo de CDI.

Nuestros resultados muestran que *Prevotella 9* está erradicada en el grupo CDI, aunque sin embargo se conserva en los individuos colonizados por *C. difficile* y en los controles sanos, con lo que podríamos concluir que este género comprendería a grupos beneficiosos, de los cuales se verían privados los pacientes con CDI y no los controles sanos ni los sujetos colonizados. Por otra parte, el género *Prevotella 7* se expande en los pacientes con CDI y se mantiene erradicado en los controles sanos y en los sujetos colonizados, pudiendo

CAPÍTULO VII-LÍNEAS DE FUTURO

comprender a especies patobiontes proinflamatorias. Debido a la pérdida de miembros del *phylum* Firmicutes y de grupos productores de butirato se produciría un ambiente intestinal proinflamatorio, que permitiría la expansión de especies comprendidas en el género *Prevotella* 7 en los pacientes con CDI. Esto por alguna razón no dilucidada no ocurriría en los individuos colonizados por *C. difficile*. Por tanto, si mediante estudios metagenómicos se identifican especies beneficiosas y proinflamatorias podríamos encontrar un biomarcador que explique en parte la diferencia entre el estado de colonización e infección por *C. difficile*. Para ello, los niveles de *Prevotella* 7 y *Prevotella* 9 nos parece un buen punto de partida.

Puesto que en los pacientes con CDI y en los individuos colonizados por *C. difficile* de nuestro estudio se encuentran incrementos pronunciados similares de *Escherichia/Shigella* donde probablemente *E. coli* será el componente mayoritario de este *cluster*, y conociendo que existen varias cepas de *E. coli* enteropatógenas, sería interesante conocer la presencia de estas cepas en ambos grupos de estudio. Es por lo cual que formulamos la hipótesis que en el grupo CDI hay una colonización de cepas patógenas que podrían potenciar los efectos de las toxinas de *C. difficile*. Por otra parte, esta colonización no se produciría en los individuos colonizados por *C. difficile*. Este hecho podría explicar en parte la diferente expresión clínica en la infección con respecto a la colonización de *C. difficile*.

Consideramos que el incremento de *Klebsiella* que observamos en los individuos colonizados por *C. difficile* con respecto a los controles sanos y a los pacientes con CDI, debería complementarse mediante estudios metagenómicos para conocer las especies colonizantes y en caso de ser *K. pneumoniae*, su serotipo. La colonización prolongada de cepas virulentas de *K. pneumoniae* puede conducir al desarrollo de enfermedades intestinales inflamatorias como la enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa (Kaur, 2018). Los serotipos K1 y K2 son considerados los más virulentos debido a la presencia de una cápsula de polisacárido que le permite eludir la fagocitosis por los macrófagos.

CAPÍTULO VII-LÍNEAS DE FUTURO

Por último, nuestros resultados muestran un incremento de *Parasutterella* en pacientes con CDI y en menor medida en individuos colonizados por *C. difficile*, con respecto a los controles sanos donde se trata un género muy escaso. En contra de lo mencionado otros estudios donde parece que *Parasutterella* es un género protector (Staley, 2016), nuestros resultados apuntan a lo contrario, ya que se observa en individuos infectados y colonizados por *C. difficile*. Por lo tanto, es un género del cual se conoce poco y del cual tenemos pruebas a favor y en contra de si se trata de un género protector o predisponente (Chen, 2019) de CDI. Se deberían establecer estudios metagenómicos y funcionales en modelos murinos, en relación con la CDI, para hipotetizar su función en la patogénesis de la CDI.

VIII - CONCLUSIONES.

CAPITULO VIII. CONCLUSIONES.

En base a nuestro objetivo principal de la tesis que era la comparación de la microbiota intestinal de pacientes con CDI e individuos colonizados por *C. difficile* con respecto a un grupo de controles sanos, podemos concluir que los sujetos infectados y colonizados por *C. difficile* presentan una microbiota intestinal con una diversidad, riqueza, estructura y composición completamente diferente a la de los controles sanos. No obstante, la microbiota intestinal de los sujetos infectados y colonizados por *C. difficile* presenta grandes similitudes a nivel de diversidad, riqueza y estructura. Es en la composición donde encontramos que los sujetos colonizados, en especial en géneros minoritarios, presentan diferencias con respecto a los infectados. Este hecho explica, al menos en parte, el estado de colonización asintomático por *C. difficile*.

IX - LIMITACIONES.

CAPÍTULO IX. LIMITACIONES.

Consideramos que la presente tesis presenta dos limitaciones principales. La primera limitación es el tamaño muestral. Cada cohorte de pacientes con CDI, de individuos colonizados por *C. difficile* y de controles sanos está compuesta por 15 sujetos. Este tamaño muestral nos ha permitido encontrar diferencias estadísticamente significativas en cuanto a diversidad, riqueza y composición en los grupos de sujetos infectados y colonizados por *C. difficile* con respecto a los controles sanos. No obstante, las diferencias en cuanto a composición de los sujetos colonizados con respecto a los infectados son mayormente no significativas. Pensamos que con un mayor tamaño muestral las diferencias discutidas serían significativas. Asimismo, esta tesis consiste en un estudio descriptivo. El principal escollo para aumentar el tamaño muestral ha sido la inclusión de individuos colonizados por *C. difficile*.

La segunda limitación que consideramos a tener en cuenta para la interpretación de los resultados es la dieta. La dieta es un factor a tener en cuenta en la composición de la microbiota intestinal y en el presente estudio no se han recogido variables al respecto. Asimismo, pensamos que esto podría tener mayor influencia en la microbiota intestinal de los controles sanos.

X - BIBLIOGRAFÍA.

CAPÍTULO X – BIBLIOGRAFÍA

- Abt MC, Lewis BB, Caballero S, Xiong H, Carter RA, Sušac B et al. Innate Immune Defenses Mediated by Two ILC Subsets Are Critical for Protection against Acute *Clostridium difficile* Infection. *Cell Host Microbe*. 2015; 18(1): 27-37.
- Adams CM, Eckenroth BE, Putnam EE, Doublie S, Shen A. Structural and functional analysis of the CspB protease required for *Clostridium* spore germination. *PLoS Pathog*. 2013; 9: e1003165.
- Akerlund T, Persson I, Unemo M, Noren T, Svenungsson B, Wullt M et al. Increased sporulation rate of epidemic *Clostridium difficile* type 027/NAP1. *J Clin Microbiol*. 2008; 46: 1530–33.
- Aktories K, Schwan C, Jank T. *Clostridium difficile* Toxin Biology. *Annu Rev Microbiol*. 2017; 71: 281-307.
- Alarcón Cavero T, D’Auria G, Delgado Palacio S, Del Campo Moreno R, Ferrer Martínez M. Microbiota. *Procedimientos en Microbiología Clínica*. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2016.
- Alcalá L, Marín M, Martín A, Sánchez-Somolinos M, Catalán P, Peláez MT et al. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infection in Spain: a population-based survey. *J Hosp Infect*. 2011; 79: 13–7.
- Alcalá L, Martín A, Marín M, Sánchez-Somolinos M, Catalán P, Peláez T, Bouza E. The undiagnosed cases of *Clostridium difficile* infection in a whole nation: where is the problem? *Clin Microbiol Infect*. 2012; 18: 204-13.
- Alcalá-Hernández L, Mena-Ribas A, Niubó-Bosh J, Marín-Arriaza M. Diagnóstico microbiológico de la infección por *Clostridium difficile*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2016; 34(9): 595–602.
- Alcalde-Vargas A, Trigo-Salado C, Leo Carnerero E, De-la-Cruz-Ramírez D, Herrera-Justiniano JM. Pseudomembranous colitis and bacteremia in an immune competent patient associated with a rare specie of *Clostridium* (*C. ramosum*). *Rev Esp Enferm Dig*. 2012; 104(9): 498-9.

CAPÍTULO X – BIBLIOGRAFÍA

- Ali S. Spread and persistence of *Clostridium difficile* spores during and after cleaning with sporicidal disinfectants. *J Hosp Infect.* 2011; 79: 97–8.
- Antharam VC, Li EC, Ishmael A, Sharma A, Mai V, Rand KH et al. Intestinal dysbiosis and depletion of butyrogenic bacteria in *Clostridium difficile* infection and nosocomial diarrhea. *J Clin Microbiol.* 2013; 51: 2884–92.
- Antoni L, Nuding S, Wehkamp J, Stange EF. Intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2014; 20(5): 1165-79.
- Anton PM, Gay J, Mykoniatis A, Pan A, O'Brient M, Brown D al. Corticotropin-releasing hormone (CRH) requirement in *Clostridium difficile* toxin A-mediated intestinal inflammation. *P Natl Acad Sci USA.* 2004; 101: 8503–8.
- Antonopoulos DA, Huse SM, Morrison HG, Schmidt TM, Sogin ML, Young VB. Reproducible community dynamics of the gastrointestinal microbiota following antibiotic perturbation. *Infect Immun.* 2009; 7(6): 2367-75.
- Apperloo-Renkema HZ, Van der Waaij BD, Van der Waaij D. Determination of colonization resistance of the digestive tract by biotyping of *Enterobacteriaceae*. *Epidemiol Infect.* 1990 Oct; 105(2): 355-61.
- Arpaia N, Campbell C, Fan X, Dikiy S, Van der Veeken J, deRoos P et al. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature.* 2013; 504(7480): 451-5.
- Asensio A, Monge D. Epidemiology of *Clostridium difficile* infection in Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012; 30(6): 333-7.
- Asensio A, Vaque-Rafart J, Calbo-Torrecillas F, Gestal-Otero JJ, López-Fernández F, Trilla-Garcia A et al. Increasing rates in *Clostridium difficile* infection (CDI) among hospitalised patients, Spain 1999-2007. *Euro Surveill.* 2008; 13: 350–3.
- Asensio A, Bouza E, Grau S, Rubio.Rodriguez D, Rubio-Terres C. Coste de la diarrea asociada a *Clostridium difficile* en España. *Rev Esp Salud Publica.*

CAPÍTULO X – BIBLIOGRAFÍA

2013; 87: 25-33.

- Arboleya S, Watkins C, Stanton C, Ross RP. Gut Bifidobacteria Populations in Human Health and Aging. *Front Microbiol.* 2016; 7: 1204.
- Atlas RM, Bartha R. *Ecología microbiana y Microbiología ambiental.* 2002. 4ª Edición. Madrid (España): Pearson Educación.
- Awad MM, Johanesen PA, Carter GP, Rose E, Lyras D. Clostridium difficile virulence factors: Insights into an anaerobic spore-forming pathogen. *Gut Microbes.* 2014; 5(5): 579-93.
- Baban ST, Kuehne SA, Barketi-Klai A, Cartman ST, Kelly ML, Hardie KR et al. The Role of Flagella in Clostridium difficile Pathogenesis: Comparison between a Non-Epidemic and an Epidemic Strain. *PLoS One.* 2013; 8: e73026.
- Baktash A, Terveer EM, Zwitter RD, Hornung BVH, Corver J, Kuijper EJ et al. Mechanistic Insights in the Success of Fecal Microbiota Transplants for the Treatment of Clostridium difficile Infections. *Front Microbiol.* 2018; 9: 1242.
- Banawas SS. Clostridium difficile Infections: A Global Overview of Drug Sensitivity and Resistance Mechanisms. *BioMed Research International.* 2018; 2018: 8414257.
- Barbut F, Delmée M, Brazier JS, Petit JC, Poxton IR, Rupnik M et al. A European survey of diagnostic methods and testing protocols for Clostridium difficile. *Clin Microbiol Infect.* 2003; 9(10): 989-96.
- Barketi-Klai A, Hoys S, Lambert-Bordes S, Collignon A, Kansau I. Role of fibronectin-binding protein A in Clostridium difficile intestinal colonization. *J Med Microbiol.* 2011; 60: 155-61.
- Barra-Carrasco J, Hernández-Rocha C, Ibáñez P, Guzmán-Durán AM, Álvarez-Lobos M, Paredes-Sabja D. Esporas de Clostridium difficile y su relevancia en la persistencia y transmisión de la infección. *Rev Chilena Infectol* 2014; 31(6): 694-703.

CAPÍTULO X – BIBLIOGRAFÍA

- Barra-Carrasco J, Olgúin-Araneda V, Plaza-Garrido A, Miranda-Cárdenas C, Cofré-Araneda G, Pizarro-Guajardo M et al. The *Clostridium difficile* exosporium cysteine (CdeC) rich protein is required for exosporium morphogenesis and coat assembly. *J Bacteriol.* 2013; 195: 3863–75.
- Bauer MP, Hensgens MP, Miller MA, Gerding DN, Wilcox MH, Dale AP et al. Renal failure and leukocytosis are predictors of a complicated course of *Clostridium difficile* infection if measured on day of diagnosis. *Clin Infect Dis.* 2012; 55(2): S149-53.
- Bauer MP, Notermans DW, van Benthem BHB, Brazier JS, Wilcox MH, Rupnik M et al. *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey. *Lancet.* 2011; 377: 63–73.
- Baughn AD, Malmay MH. The strict anaerobe *Bacteroides fragilis* grows in and benefits from nanomolar concentrations of oxygen. *Nature.* 2004; 427: 441–4.
- Beaud D, Tailliez P, Anba-Mondoloni J. Genetic characterization of the beta-glucuronidase enzyme from a human intestinal bacterium, *Ruminococcus gnavus*. *Microbiology.* 2005; 151: 2323-30.
- Belkaid Y, Hand TW. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell.* 2014; 157: 121–41.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Second Edition. Volume Three. The Firmicutes. 2012.
- Bergthorsson U, Ochman H. Distribution of chromosome length variation in natural isolates of *Escherichia coli*. *Mol Biol Evol.* 1998; 15(1): 6-16.
- Bianco M, Fedele G, Quattrini A, Spigaglia P, Barbanti F, Mastrantonio P et al. Immunomodulatory activities of surface-layer proteins obtained from epidemic and hypervirulent *Clostridium difficile* strains. *J Med Microbiol.* 2011; 60: 1162-7.

CAPÍTULO X – BIBLIOGRAFÍA

- Biazzo M, Cioncada R, Fiaschi L, Tedde V, Spigaglia P, Mastrantonio P et al. Diversity of *cwp* loci in clinical isolates of *Clostridium difficile*. *J Med Microbiol*. 2013; 62: 1444-52.
- Blad CC, Tang C, Offermanns S. G protein-coupled receptors for energy metabolites as new therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov*. 2012 ; 11(8): 603-19.
- Bobo LD, El Feghaly RE, Chen YS, Dubberke ER, Han Z, Baker et al. MAPK-activated protein kinase 2 contributes to *Clostridium difficile*-associated inflammation. *Infect Immun*. 2013; 81: 713–22.
- Bottacini F, van Sinderen D, Ventura M. Omics of bifidobacteria: research and insights into their health-promoting activities. *Biochem J*. 2017; 474(24): 4137-52.
- Boto-Ordóñez M, Urpi-Sarda M, Queipo-Ortuño MI, Tulipani S, Tinahones FJ, Andres-Lacueva C. High levels of Bifidobacteria are associated with increased levels of anthocyanin microbial metabolites: a randomized clinical trial. *Food Funct*. 2014; 5(8): 1932-8.
- Bouza E, Alcalá L, Marín M, Valerio M, Reigadas E, Muñoz P et al. An outbreak of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 in Spain: risk factors for recurrence and a novel treatment strategy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017; 36(10): 1777-86.
- Brandl K, Plitas G, Mihiu CN, Ubeda C, Jia T, Fleisher M, Schnabl B, DeMatteo RP, Pamer EG. Vancomycin-resistant enterococci exploit antibiotic-induced innate immune deficits. *Nature*. 2008; 455(7214): 804-7.
- Brandt LJ. Fecal transplantation for the treatment of *Clostridium difficile* infection, *Gastroenterol. Hepatol*. 2012; 8(3): 191-4.
- Branka JE, Vallette G, Jarry A, Bou-Hanna C, Lemarre P, Van PN, Laboisie CL. Early functional effects of *Clostridium difficile* toxin A on human colonocytes. *Gastroenterology*. 1997; 112(6): 1887-94.

CAPÍTULO X – BIBLIOGRAFÍA

- Braun V, Hundsberger T, Leukel P, Sauerborn M, Eichel-Streiber CV. Definition of the single integration site of the pathogenicity locus in *Clostridium difficile*. *Gene*. 1996; 181: 29-38.
- Britton RA, Young VB. Interaction between the intestinal microbiota and host in *Clostridium difficile* colonization resistance. *Trends Microbiol*. 2012; 20(7): 313-9.
- Britton RA, Young VB. Role of the intestinal microbiota in resistance to colonization by *Clostridium difficile*. *Gastroenterology*. 2014; 146(6): 1547-53.
- Brouwer MS, Roberts AP, Hussain H, Williams RJ, Allan E, Mullany P. Horizontal gene transfer converts non-toxigenic *Clostridium difficile* strains into toxin producers. *Nat Commun*. 2013; 4: 2601.
- Brown JR, Flemer B, Joyce SA, Zulquernain A, Sheehan D, Shanahan F et al. Changes in microbiota composition, bile and fatty acid metabolism, in successful faecal microbiota transplantation for *Clostridioides difficile* infection. *BMC Gastroenterol*. 2018; 18(1): 131.
- Buffie CG, Bucci V, Stein RR, McKenney PT, Ling L, Gobourne A et al. Precision microbiome reconstitution restores bile acid mediated resistance to *Clostridium difficile*. *Nature*. 2015; 517: 205-208.
- Bulusu M, Narayan S, Shetler K, Triadafilopoulos G. Leukocytosis as a harbinger and surrogate marker of *Clostridium difficile* infection in hospitalized patients with diarrhea. *Am J Gastroenterol*. 2000; 95: 3137–141.
- Buonomo EL, Madan R, Pramoonjago P, Li L, Okusa MD, Petri WA Jr. Role of interleukin 23 signaling in *Clostridium difficile* colitis. *J Infect Dis*. 2013; 208(6): 917-20.
- Buonomo EL, Petri WA. The microbiota and immune response during *Clostridium difficile* infection. *Anaerobe*. 2016; 41: 79-84.
- Burns DA, Minton NP. Sporulation studies in *Clostridium difficile*. *J Microbiol Methods*. 2011a; 87: 133-8.

CAPÍTULO X – BIBLIOGRAFÍA

- Burns DA, Heeg D, Cartman ST, Minton NP. Reconsidering the sporulation characteristics of hypervirulent *Clostridium difficile* BI/NAP1/027. *PLoS One*. 2011b; 6: e24894.
- Buttigieg PL, Ramette A. A guide to statistical analysis in microbial ecology: a community-focused, living review of multivariate data analyses. *FEMS Microbiol Ecol*. 2014; 90(3): 543-50.
- Cabrera-Rubio R, Collado MC, Laitinen K, Salminen S, Isolauri E, Mira A. The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *Am J Clin Nutr*. 2012; 96: 544-51.
- Cafardi V, Biagini M, Martinelli M, Leuzzi R, Rubino JT, Cantini F et al. Identification of a Novel Zinc Metalloprotease through a Global Analysis of *Clostridium difficile* Extracellular Proteins. *PLoS One*. 2013; 8(11): e81306.
- Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJ, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods*. 2016; 13(7) :581-3.
- Cani PD, Knauf C. How gut microbes talk to organs: the role of endocrine and nervous routes. *Mol Metab*. 2016; 5: 743-52.
- Cardona F, Andrés-Lacueva C, Tulipani S, Tinahones FJ, Queipo-Ortuño MI. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *J Nutr Biochem*. 2013; 24(8): 1415-22.
- Carter GP, Douce GR, Govind R, Howarth PM, Mackin KE, Spencer J et al. The Anti-Sigma Factor TcdC Modulates Hypervirulence in an Epidemic BI/NAP1/027 Clinical Isolate of *Clostridium difficile*. *PLoS Pathog*. 2011; 7: e1002317.
- Chandrasekaran R, Lacy DB. The role of toxins in *Clostridium difficile* infection. *FEMS Microbiol Rev*. 2017; 41(6): 723-50.

CAPÍTULO X – BIBLIOGRAFÍA

- Chang JY, Antonopoulos DA, Kalra A, Tonelli A, Khalife WT, Schmidt TM et al. Decreased diversity of the fecal Microbiome in recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *J Infect Dis.* 2008; 197(3): 435-8.
- Chang PV, Hao L, Offermanns S, Medzhitov R. The microbial metabolite butyrate regulates intestinal macrophage function via histone deacetylase inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014; 111(6): 2247-52.
- Chao A. Estimating the population size for capture-recapture data with unequal catchability. *Biometrics.* 1987; 43:783–91.
- Chen W, Liu F, Ling Z, Tong X, Xiang C. Human intestinal lumen and mucosa-associated microbiota in patients with colorectal cancer. *PLoS One.* 2012; 7(6): e39743.
- Chen YJ, Wu H, Wu SD, Lu N, Wang YT, Liu HN, Dong L, Liu TT, Shen XZ. *Parasutterella*, in association with irritable bowel syndrome and intestinal chronic inflammation. *J Gastroenterol Hepatol.* 2018; 33(11):1844-52.
- Chia JH, Feng Y, Su LH, Wu TL, Chen CL, Liang YH et al. *Clostridium innocuum* is a significant vancomycin-resistant pathogen for extraintestinal clostridial infection. *Clin Microbiol Infect.* 2017; 23(8): 560-6.
- Chia JH, Wu TS, Wu TL, Chen CL, Chuang CH, Su LH et al. *Clostridium innocuum* is a vancomycin-resistant pathogen that may cause antibiotic-associated diarrhoea. *Clin Microbiol Infect.* 2018; 24(11): 1195-9.
- Chitnis AS, Holzbauer SM, Belflower RM, Winston LG, Bamberg WM, Lyons C et al. Epidemiology of community-associated *Clostridium difficile* infection, 2009 through 2011. *JAMA Intern Med.* 2013; 173(14): 1359-67.
- Chiu CH, Wang YT, Walther BA, Chao A. Improved nonparametric lower bound of species richness via a modified Good-Turing frequency formula. *Biometrics.* 2014; 70: 671–82.

CAPÍTULO X – BIBLIOGRAFÍA

- Chumblor NM, Farrow MA, Lapierre LA, Franklin JL, Lacy DB. Clostridium difficile toxins TcdA and TcdB cause colonic tissue damage by distinct mechanisms. *Infect Immun*. 2016; 84: 2871–7.
- Claesson MJ, Jeffery IB, Conde S, Power SE, O'Connor EM, Cusack S et al. Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature*. 2012; 488(7410): 178-84.
- Collins MD, Lawson PA, Willems A, Cordoba JJ, Fernandez-Garayzabal J, Garcia P et al. The phylogeny of the genus Clostridium: proposal of five new genera and eleven new species combinations, *Int J Syst Evol Microbiol*. 1994; 44: 812-26.
- Conway T, Cohen PS. Commensal and Pathogenic Escherichia coli Metabolism in the Gut. *Microbiol Spectr*. 2015; 3(3): 10.1128/microbiolspec.MBP-0006-2014.
- Cornely OA, Crook DW, Esposito R, Poirier A, Somero MS, Weiss K et al. Fidaxomicin versus vancomycin for infection with Clostridium difficile in Europe, Canada, and the USA: a double-blind, non-inferiority, randomised controlled trial. *Lancet Infect Dis*. 2012; 12(4): 281-9.
- Cores-Calvo O, García-Sánchez E, Valero-Juan LF, García-Sánchez JE, García-García MI. Changes in the epidemiology of Clostridium difficile infection during 2005-2014 in Salamanca, Spain. *Rev Esp Quimioter*. 2016; 29(4): 206-13.
- Corrêa-Oliveira R, Fachi JL, Vieira A, Sato FT, Vinolo MAR. Regulation of immune cell function by short-chain fatty acids. *Clin Transl Immunol*. 2016; 5: e73.
- Cowan AE, Olivastro EM, Koppel DE, Loshon CA, Setlow B, Setlow P. Lipids in the inner membrane of dormant spores of Bacillus species are largely immobile. *Proc Natl Acad Sci*. 2004; 101: 7733–38.
- Cowardin CA, Kuehne SA, Buonomo EL, Marie CS, Minton NP, Petri WA. Inflammasome Activation Contributes to Interleukin-23 Production in Response to Clostridium difficile. *MBio*. 2015; 6(1): e02386–14.

CAPÍTULO X – BIBLIOGRAFÍA

- Coyne MJ, Tzianabos AO, Mallory BC, Carey VJ, Kasper DL, Comstock LE. Polysaccharide biosynthesis locus required for virulence of *Bacteroides fragilis*. *Infect Immunity* 2001; 69: 4342-50.
- Crobach MJ, Planche T, Eckert C, Barbut F, Terveer EM, Dekkers OM et al. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the diagnostic guidance document for *Clostridium difficile* infection. *Clin Microbiol Infect*. 2016; 22(4): 63-81.
- Crobach MJT, Vernon JJ, Loo VG, Kong LY, Péchiné S, Wilcox MH, Kuijper EJ. Understanding *Clostridium difficile* Colonization. *Clin Microbiol Rev*. 2018; 14; 31(2): e00021-17.
- Daillère R, Vétizou M, Waldschmitt N, Yamazaki T, Isnard C, Poirier-Colame V et al. *Enterococcus hirae* and *Barnesiella intestinihominis* Facilitate Cyclophosphamide-Induced Therapeutic Immunomodulatory Effects. *Immunity*. 2016; 45(4): 931-43.
- Daquigan N, Seekatz AM, Greathouse KL, Young VB, White JR. High-resolution profiling of the gut microbiome reveals the extent of *Clostridium difficile* burden. *NPJ Biofilms Microbiomes*. 2017; 3: 35.
- Davies KA, Ashwin H, Longshaw CM, Burns DA, Davis GL, Wilcox MH; EUCLID study group. Diversity of *Clostridium difficile* PCR ribotypes in Europe: results from the European, multicentre, prospective, biannual, point-prevalence study of *Clostridium difficile* infection in hospitalised patients with diarrhoea (EUCLID), 2012 and 2013. *Euro Surveill*. 2016; 21(29).
- Davies KA, Planche T, Wilcox MH. The predictive value of quantitative nucleic acid amplification detection of *Clostridium difficile* toxin gene for faecal sample toxin status and patient outcome. *PLoS One*. 2018; 13(12): e0205941.
- Deakin LJ, Clare S, Fagan RP, Dawson LF, Pickard DJ, West MR et al. *Clostridium difficile* *spo0A* gene is a persistence and transmission factor. *Infect Immun*. 2012; 80: 2704–11.

CAPÍTULO X – BIBLIOGRAFÍA

- Delgado S, Suárez A, Mayo B. Bifidobacterial diversity determined by culturing and by 16S rDNA sequence analysis in feces and mucosa from ten healthy Spanish adults. *Dig Dis Sci.* 2006; 51(10):1878-85.
- Debast SB, Bauer MP, Kuijper EJ; European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection. *Clin Microbiol Infect.* 2014; 20(2): 1-26.
- Deng H, Yang S, Zhang Y, Qian K, Zhang Z, Liu Y et al. *Bacteroides fragilis* Prevents *Clostridium difficile* Infection in a Mouse Model by Restoring Gut Barrier and Microbiome Regulation. *Front Microbiol.* 2018; 9: 2976.
- Derrien M, Vaughan EE, Plugge CM, de Vos WM. *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2004; 54(5): 1469-76.
- Dethlefsen L, Eckburg PB, Bik EM, Relman DA. Assembly of the human intestinal microbiota. *Trends Ecol Evol.* 2006; 21(9): 517-23.
- De Vuyst L, Leroy F. Cross-feeding between bifidobacteria and butyrate-producing colon bacteria explains bifidobacterial competitiveness, butyrate production, and gas production. *Int J Food Microbiol.* 2011; 149(1):73-80.
- Dillon SM, Lee EJ, Kotter CV, Austin GL, Dong Z, Hech DK et al. An altered intestinal mucosal microbiome in HIV-1 infection is associated with mucosal and systemic immune activation and endotoxemia. *Mucosal Immunol.* 2014; 7: 983-94.
- Dingle KE, Didelot X, Ansari MA, Eyre DW, Vaughan A, Griffiths D et al. Recombinational switching of the *Clostridium difficile* S-layer and a novel glycosylation gene cluster revealed by large-scale whole-genome sequencing. *J Infect Dis.* 2013; 207: 675-86.
- Dinh DM, Volpe GE, Duffalo C, Bhalchandra S, Tai AK, Kane AV et al. Intestinal microbiota, microbial translocation, and systemic inflammation in chronic HIV infection. *J. Infect. Dis.* 2015; 211; 19–27.

CAPÍTULO X – BIBLIOGRAFÍA

- Doerner KC, Takamine F, La Voie CP, Mallonee DH, Hylemon PB. Assesment of fecal bacteria with bile acid 7 α -Dehydroxylating activity for the presence of bai-like genes. *Applied Environmental Microbiology*. 1997; 63(3); 1185-88.
- Donohoe DR, Wali A, Brylawski BP, Bultman SJ. Microbial regulation of glucose metabolism and cell-cycle progression in mammalian colonocytes. *PLoS One*. 2012; 7(9): e46589.
- Donaldson GP, Lee SM, Mazmanian SK. Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat Rev Microbiol*. 2015; 14; 20–32.
- Dong D, Ni Q, Wang C, Zhang L, Li Z, Jiang C, EnqiangMao et al. Effects of intestinal colonization by *Clostridium difficile* and *Staphylococcus aureus* on microbiota diversity in healthy individuals in China. *BMC Infect Dis*. 2018; 18(1): 207.
- Donnelly ML, Fimlaid KA, Shen A. Characterization of *Clostridium difficile* spores lacking either SpoVAC or dipicolinic acid synthetase. *J Bacteriol*. 2016; 198: 1694–707.
- Drzewiecka D. Significance and Roles of *Proteus* spp. Bacteria in Natural Environments. *Microb Ecol*. 2016; 72(4): 741-58.
- Duranti S, Milani C, Lugli GA, Turrone F, Mancabelli L, Sanchez B et al. Insights from genomes of representatives of the human gut commensal *Bifidobacterium bifidum*. *Environ Microbiol*. 2015; 17(7): 2515-31.
- Duranti S, Turrone F, Lugli GA, Milani C, ViappianiA, Mangifesta M et al. Genomic characterization and transcriptional studies of the starch-utilizing strain *Bifidobacterium adolescentis* 22L. *Appl Environ Microbiol*. 2014; 80(19): 6080–90.
- Dziarski R, Park SY, Kashyap DR, Dowd SE, Gupta D. Pglyrp-Regulated Gut Microflora *Prevotella falsenii*, *Parabacteroides distasonis* and *Bacteroides eggerthii* Enhance and *Alistipes finegoldii* Attenuates Colitis in Mice. *PLoS One*. 2016; 11(1): e0146162.

CAPÍTULO X – BIBLIOGRAFÍA

- Earle KA, Billings G, Sigal M, Lichtman JS, Hansson GC, Elias JE et al. Quantitative Imaging of Gut Microbiota Spatial Organization. *Cell Host Microbe*. 2015; 18(4): 478-88.
- El Feghaly RE, Stauber JL, Deych E, Gonzalez C, Tarr PI, Haslam DB. Markers of intestinal inflammation, not bacterial burden, correlate with clinical outcomes in *Clostridium difficile* infection. *Clin Infect Dis*. 2013; 56(12): 1713-21.
- El Kaoutari A, Armougom F, Gordon JI, Raoult D, Henrissat B. The abundance and variety of carbohydrate-active enzymes in the human gut microbiota. *Nat Rev Microbiol*. 2013; 11(7): 497-504.
- Escobar-Cortes K, Barra-Carrasco J, Paredes-Sabja D. Proteases and sonication specifically remove the exosporium layer of spores of *Clostridium difficile* strain 630. *J Microbiol Methods*. 2013; 93: 25-31.
- Ethapa T, Leuzzi R, Ng YK, Baban ST, Adamo R, Kuehne SA, Scarselli M, Minton NP, Serruto D, Unnikrishnan M. Multiple factors modulate biofilm formation by the anaerobic pathogen *Clostridium difficile*. *J Bacteriol* 2013; 195: 545-55.
- Ferreyra JA, Wu KJ, Hryckowian AJ, Bouley DM, Weimer BC, Sonnenburg JL. Gut Microbiota-Produced-Succinate promotes *C. difficile* Infection after antibiotic treatment or motility disturbance. *Cell Host & Microbe*. 2014; 16: 770-7.
- Fimlaid KA, Bond JP, Schutz KC, Putnam EE, Leung JM, et al. Global Analysis of the Sporulation Pathway of *Clostridium difficile*. *PLoS Genet*. 2013; 9(8): e1003660.
- Floch MH. Intestinal microecology in health and wellness. *J Clin Gastroenterol*. 2011; 45(1): S108-10.
- Francis MB, Allen CA, Shrestha R, Sorg JA. Bile acid recognition by the *Clostridium difficile* germinant receptor, CspC, is important for establishing infection. *PLoS Pathog*. 2013; 9: e1003356.

CAPÍTULO X – BIBLIOGRAFÍA

- Francis MB, Allen CA, Sorg JA, Spore cortex hydrolysis precedes DPA release during *Clostridium difficile* spore germination. *J Bacteriol.* 2015; 197: 2276-83.
- Francis MB, Sorg JA. Dipicolinic acid release by germinating *Clostridium difficile* spores occurs through a mechanosensing mechanism. *mSphere.* 2016; 1(6): e00306-16.
- Freeman J, Bauer MP, Baines SD, Corver J, Fawley WN, Goorhuis B et al. The changing epidemiology of *Clostridium difficile* infections. *Clin Microbiol Rev.* 2010; 23(3): 529-49.
- Fujitani S, George WL, Morgan MA, Nichols S, Murthy AR. Implications for vancomycin-resistant *Enterococcus* colonization associated with *Clostridium difficile* infections. *Am J Infect Control.* 2011; 39(3): 188-93.
- Furuya-Kanamori L, Marquess J, Yakob L, Riley TV, Paterson DL, Foster NF et al. Asymptomatic *Clostridium difficile* colonization: epidemiology and clinical implications. *BMC Infect Dis.* 2015; 15: 516.
- Furuichi M, Imajo E, Sato Y, Tanno S, Kawada M, Sato S. Characteristics of *Clostridium difficile* colonization in Japanese children. *J Infect Chemother.* 2014; 20: 307–311.
- Garey KW, Sethi S, Yadav Y, DuPont HL. Meta-analysis to assess risk factors for recurrent *Clostridium difficile* infection. *J Hosp Infect.* 2008; 70: 298–304.
- Garey KW, Jiang ZD, Ghantaji S, Tam VH, Arora V, Dupont HL. A common polymorphism in the interleukin-8 gene promoter is associated with an increased risk for recurrent *Clostridium difficile* infection. *Clin Infect Dis.* 2010; 51(12): 1406-10.
- Garsin DA, Frank KL, Silanpää J, Ausubel FM, Hartke A, Shankar N et al. Pathogenesis and Models of Enterococcal Infection. 2014. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N, editors. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection* [Internet]. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary

CAPÍTULO X – BIBLIOGRAFÍA

- Gerding DN, Johnson S, Rupnik M, Aktories K. Clostridium difficile binary toxin CDT: mechanism, epidemiology, and potential clinical importance. Gut Microbes. 2014; 5: 15–27.
- Gerding DN, Meyer T, Lee C, Cohen SH, Murthy UK, Poirier A et al. Administration of spores of nontoxigenic Clostridium difficile strain m3 for prevention of recurrent c difficile infection: A randomized clinical trial. JAMA. 2015; 313: 1719–27.
- Geric B, Carman RJ, Rupnik M, Genheimer CW, Sambol SP, Lyerly DM, Gerding DN et al. Binary toxin-producing, large clostridial toxin-negative Clostridium difficile strains are enterotoxic but do not cause disease in hamsters. J Infect Dis 2006; 193: 1143-50.
- Goh HMS, Yong MHA, Chong KKL, Kline KA. Model systems for the study of Enterococcal colonization and infection. Virulence. 2017; 8(8): 1525-62.
- Göker M, Gronow S, Zeytun A, Nolan M, Lucas S, Lapidus A et al. Complete genome sequence of Odoribacter splanchnicus type strain (1651/6). Stand Genomic Sci. 2011; 4(2): 200-9.
- Goldenberg JZ, Yap C, Lytvyn L, Lo CK, Beardsley J, Mertz D, Johnston BC. Probiotics for the prevention of Clostridium difficile-associated diarrhea in adults and children. Cochrane Database Syst Rev. 2017; 12: CD006095.
- Goldstein EJ, Citron DM, Sears P, Babakhani F, Sambol SP, Gerding DN. Comparative susceptibilities to fidaxomicin (OPT-80) of isolates collected at baseline, recurrence, and failure from patients in two phase III trials of fidaxomicin against Clostridium difficile infection. Antimicrob Agents Chemother. 2011; 55(11): 5194-9.
- Goldstein EJC, Johnson SJ, Maziade PJ, Evans CT, Sniffen JC, Millette M, McFarland LV. Probiotics and prevention of Clostridium difficile infection. Anaerobe. 2017; 45: 114-19.

CAPÍTULO X – BIBLIOGRAFÍA

- Goldstein EJ, Tyrrell KL, Citron DM. Lactobacillus species: taxonomic complexity and controversial susceptibilities. Clin Infect Dis. 2015; 60(2): S98-107.
- Goorhuis A, Bakker D, Corver J, Debast SB, Harmanus C, Notermans DW et al. Emergence of Clostridium difficile infection due to a new hypervirulent strain, polymerase chain reaction ribotype 078. Clin Infect Dis. 2008; 47: 1162-70.
- González-Rodríguez I, Gaspar P, Sánchez B, Gueimonde M, Margolles A, Neves AR. Catabolism of glucose and lactose in Bifidobacterium animalis subsp. lactis, studied by ¹³C Nuclear Magnetic Resonance. Appl Environ Microbiol. 2013;79: 7628–38.
- Gough EK, Stephens DA, Moodie EE, Prendergast AJ, Stoltzfus RJ, Humphrey JH, Manges AR. Linear growth faltering in infants is associated with Acidaminococcus sp. and community-level changes in the gut microbiota. Microbiome. 2015; 3: 24.
- Gotelli NJ, Colwell RK. Estimating species richness. Biological diversity: frontiers in measurement and assessment. 2011; 12: 39-54.
- Grześkowiak Ł, Isolauri E, Salminen S, Gueimonde M. Manufacturing process influences properties of probiotic bacteria. Br J Nutr. 2011; 105(6): 887-94.
- Gupta VK, Chaudhari NM, Iskepalli S, Dutta C. Divergences in gene repertoire among the reference Prevotella genomes derived from distinct body sites of human. BMC Genomics. 2015; 16(1): 153.
- Gu S, Chen Y, Zhang X, Lu H, Lv T, Shen P et al. Identification of key taxa that favor intestinal colonization of Clostridium difficile in an adult Chinese population. Microbes Infect. 2016; 18(1): 30-8.
- Hanchi H, Mottawea W, Sebei K, Hammami R. The Genus Enterococcus: Between Probiotic Potential and Safety Concerns-An Update. Front Microbiol. 2018; 9: 1791.

CAPÍTULO X – BIBLIOGRAFÍA

- Han SH, Yi J, Kim JH, Lee S, Moon HW. Composition of gut microbiota in patients with toxigenic *Clostridioides (Clostridium) difficile*: Comparison between subgroups according to clinical criteria and toxin gene load. *PLoS One*. 2019; 14(2): e0212626.
- Hardham JM, King KW, Dreier K, Wong J, Strietzel C, Eversole RR et al. Transfer of *Bacteroides splanchnicus* to *Odoribacter* gen. nov. as *Odoribacter splanchnicus* comb. nov., and description of *Odoribacter denticanis* sp. nov., isolated from the crevicular spaces of canine periodontitis patients. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2008; 58(1): 103-9.
- Hasegawa M, Yada S, Liu MZ, Kamada N, Muñoz-Planillo R, Do N et al. Interleukin-22 regulates the complement system to promote resistance against pathobionts after pathogen-induced intestinal damage. *Immunity*. 2014; 41(4): 620-32.
- Hasegawa M, Yamazaki T, Kamada N, Tawaratsumida K, Kim YG, Núñez G, et al. Nucleotide-binding oligomerization domain 1 mediates recognition of *Clostridium difficile* and induces neutrophil recruitment and protection against the pathogen. *J Immunol*. 2011; 186(8): 4872-80.
- Healthcare Cost and Utilization Project. HCUP Projections: *Clostridium difficile* infection 2011 to 2012. Report # 2012-01. http://www.hcup-us.ahrq.gov/reports/projections/CDI_Regional_projections_Final.pdf. Acceso: Julio 2018.
- He B, Xu W, Santini PA, Polydorides AD, Chiu A, Estrella J et al. Intestinal bacteria trigger T cell-independent immunoglobulin A(2) class switching by inducing epithelial-cell secretion of the cytokine APRIL. *Immunity*. 2007 ; 26(6): 812-26.
- Henderson G, Yilmaz P, Kumar S, Forster RJ, Kelly WJ, Leahy SC et al. Improved taxonomic assignment of rumen bacterial 16S rRNA sequences using a revised SILVA taxonomic framework. *PeerJ*. 2019; 7: e6496.

CAPÍTULO X – BIBLIOGRAFÍA

- Hensgens MP, Goorhuis A, Dekkers OM, Kuijper EJ. Time interval of increased risk for *Clostridium difficile* infection after exposure to antibiotics. *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67: 742–8.
- Henriques AO, Moran CP. Structure, assembly, and function of the spore surface layers. *Annu Rev Microbiol.* 2007; 61:555–88.
- Hidalgo-Cantabrana C, Delgado S, Ruiz L, Ruas-Madiedo P, Sánchez B, Margolles A. Bifidobacteria and Their Health-Promoting Effects. *Microbiol Spectr.* 2017; 5(3).
- Hill MO. Diversity and evenness: a unifying notation and its consequences. 1973. *Ecology*; 54: 427-73.
- Hod K, Dekel R, Aviv Cohen N, Sperber A, Ron Y, Boaz M et al. The effect of a multispecies probiotic on microbiota composition in a clinical trial of patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil.* 2018; 30(12): e13456.
- Hollander M, Wolfe DA. *Nonparametric Statistical Methods.* 2013. 3º Edición. New York (EEUU). John Wiley & Sons.
- Hollister EB, Gao C, Versalovic J. Compositional and functional features of the gastrointestinal microbiome and their effects on human health. *Gastroenterology.* 2014; 146(6): 1449–58.
- Hryckowian AJ, Pruss KM, Sonnenburg JL. The emerging metabolic view of *Clostridium difficile* pathogenesis. *Curr Opin Microbiol.* 2017; 35: 42-47.
- Huang H, Fang H, Weintraub A, Nord CE. Distinct ribotypes and rates of antimicrobial drug resistance in *Clostridium difficile* from Shanghai and Stockholm *Clin Microbiol Infect.* 2009; 15(12): 1170-3.
- Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature.* 2012; 486(7402): 207-14.

CAPÍTULO X – BIBLIOGRAFÍA

- Janezic S, Rupnik M. Genomic diversity of *Clostridium difficile* strains. *Res Microbiol.* 2015; 166(4): 353-60.
- 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.
- Jawa RS, Mercer DW. *Clostridium difficile*-associated infection: a disease of varying severity. *Am J Surg.* 2012; 204(6): 836-42.
- Johal SS, et al. Colonic IgA producing cells and macrophages are reduced in recurrent and non-recurrent *Clostridium difficile* associated diarrhoea. *J Clin Pathol.* 2004; 57: 973–9.
- Jones BV, Begley M, Hill C, Gahan CG, Marchesi JR. Functional and comparative metagenomic analysis of bile salt hydrolase activity in the human gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008; 105: 13580–5.
- Johnson EL, Heaver SL, Walters WA, Ley RE. Microbiome and metabolic disease: revisiting the bacterial phylum Bacteroidetes. *J Mol Med (Berl).* 2017; 95(1): 1-8.
- Johnson S, Samore MH, Farrow KA, Killgore GE, Tenover FC, Lyras D et al. Epidemics of diarrhea caused by a clindamycin-resistant strain of *Clostridium difficile* in four hospitals. *N Engl J Med.* 1999; 341(22):1645-51.
- Joossens M, Huys G, Cnockaert M, De Preter V, Verbeke K, Rutgeerts P et al. Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. *Gut.* 2011; 60(5): 631-7.
- Joshi LT, Phillips DS, Williams CF, Alyousef A, Baillie L. Contribution of spores to the ability of *Clostridium difficile* to adhere to surfaces. *Appl Environ Microbiol.* 2012; 78: 7671-9.
- Ju T, Kong JY, Stothard P, Willing BP. Defining the role of *Parasutterella*, a previously uncharacterized member of the core gut microbiota. *ISME J.* 2019; 13(6): 1520-34.

CAPÍTULO X – BIBLIOGRAFÍA

- Kaakoush NO. Insights into the Role of Erysipelotrichaceae in the Human Host. *Front Cell Infect Microbiol.* 2015; 5: 84.
- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* 2004; 2(2): 123-40.
- Kang JD, Myers CJ, Harris SC, Kakiyama G, Lee IK, Yun BS et al. Bile Acid 7 α -Dehydroxylating Gut Bacteria Secrete Antibiotics that Inhibit *Clostridium difficile*: Role of Secondary Bile Acids. *Cell Chem Biol.* 2019; 26(1): 27-34.
- Kato H, Kita H, Karasawa T, Maegawa T, Koino Y, Takakuwa H et al. S. Colonisation and transmission of *Clostridium difficile* in healthy individuals examined by PCR ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis. *J Med Microbiol.* 2001; 50: 720–7.
- Kaur CP, Vadivelu J, Chandramathi S. Impact of *Klebsiella pneumoniae* in lower gastrointestinal tract diseases. *J Dig Dis.* 2018; 19(5): 262-71.
- Kelly CR, Kahn S, Kashyap P, Laine L, Rubin D, Atreja A et al. Update on FMT: indications, methodologies, mechanisms and outlook. *Gastroenterol;* 2015; 149(1): 223-37.
- Kelly CP, Kyne L. The host immune response to *Clostridium difficile*. *J Med Microbiol.* 2011; 60: 1070–9.
- Kevorkian Y, Shen A. Revisiting the role of Csp family proteins in regulating *Clostridium difficile* spore germination. *J Bacteriol.* 2017; 199: e00266-17.
- Kevorkian Y, Shirley D J, Shen A. Regulation of *Clostridium difficile* spore germination by the CspA pseudoprotease domain. *Biochimie.* 2016; 122: 243-54.
- Khanna S, Montassier E, Schmidt B, Patel R, Knights D, Pardi DS et al. Gut microbiome predictors of treatment response and recurrence in primary *Clostridium difficile* infection. *Aliment Pharmacol Ther.* 2016a; 44(7): 715-27.

CAPÍTULO X – BIBLIOGRAFÍA

- Khanna S, Pardi DS. Clinical implications of antibiotic impact on gastrointestinal microbiota and *Clostridium difficile* infection. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2016b; 10(10): 1145-52.
- Kim HN, Kim H, Moon HW, Hur M, Yun YM. Toxin positivity and *tcdB* gene load in broad-spectrum *Clostridium difficile* infection. *Infection*. 2018; 46(1):113-7.
- Kleinman L, Talbot GH, Hunsche E, Schüler R, Nord CE. The CDI-DaySyms: Content Development of a New Patient-Reported Outcome Questionnaire for Symptoms of *Clostridium difficile* Infection. *Value Health*. 2018; 21(4): 441-8.
- Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res*. 2013; 41(1):e1.
- Knetsch CW, Lawley TD, Hensgens MP, Corver J, Wilcox MW, Kuijper EJ. Current application and future perspectives of molecular typing methods to study *Clostridium difficile* infections. *Euro Surveill*. 2013; 18: 20381.
- Knoop KA, McDonald KG, Kulkarni DH, Newberry RD. Antibiotics promote inflammation through the translocation of native commensal colonic bacteria. *Gut*. 2016; 65(7): 1100-9.
- Kochan TJ, Somers MJ, Kaiser AM, Shoshiev MS, Hagan AK, Hastie JL et al. Intestinal calcium and bile salts facilitate germination of *Clostridium difficile* spores. *PLoS Pathog*. 2017; 13(7): e1006443.
- Koenigsknecht MJ, Theriot CM, Bergin IL, Schumacher CA, Schloss PD et al. Dynamics and establishment of *Clostridium difficile* infection in the murine gastrointestinal tract. *Infect Immun*. 2015; 83: 934-41.
- Kolling GL, Wu M, Warren CA, Durmaz E, Klaenhammer TR, Timko MP et al. Lactic acid production by *Streptococcus thermophilus* alters *Clostridium difficile* infection and in vitro Toxin A production. *Gut Microbes*. 2012; 3(6): 523-9.

CAPÍTULO X – BIBLIOGRAFÍA

- Kong LY, Dendukuri N, Schiller I, Bourgault AM, Brassard P, Poirier L et al. Predictors of asymptomatic *Clostridium difficile* colonization on hospital admission. *Am J Infect Control*. 2015; 43: 248-53.
- Kovatcheva-Datchary P, Nilsson A, Akrami R, Lee YS, De Vadder F, Arora T et al. Dietary Fiber-Induced Improvement in Glucose Metabolism Is Associated with Increased Abundance of *Prevotella*. *Cell Metab*. 2015; 22(6): 971-82.
- Kreimeyer I, Euler F, Marckscheffel A et al. Autoproteolytic cleavage mediates cytotoxicity of *Clostridium difficile* toxin A. *N-S Arch Pharmacol*. 2011; 383: 253–62.
- Kriss M, Hazleton KZ, Nusbacher NM, Martin CG, Lozupone CA. Low diversity gut microbiota dysbiosis: drivers, functional implications and recovery. *Curr OpinMicrobiol*. 2018; 44: 34-40.
- Kuijper EJ, Barbut F, Brazier JS, Kleinkauf N, Eckmanns T, Lambert ML et al. Update of *Clostridium difficile* infection due to PCR ribotype 027 in Europe, 2008. *Euro Surveill*. 2008; 13(31): 18942.
- Kwon JH, Olsen MA, Dubberke ER. The morbidity, mortality, and costs associated with *Clostridium difficile* infection. *Infect Dis Clin North Am*. 2015; 29: 123–34.
- Kyne L, Warny M, Qamar A, Kelly CP. Association between antibody response to toxin A and protection against recurrent *Clostridium difficile* diarrhoea. *Lancet*. 2001; 357: 189–93.
- Kyne L, Warny M, Qamar A, Kelly CP. Asymptomatic carriage of *Clostridium difficile* and serum levels of IgG antibody against toxin A. *N Engl J Med*. 2000; 342: 390–7.
- Labbé AC, Poirier L, MacCannell D, Louie T, Savoie M, Béliveau et al. *Clostridium difficile* infections in a Canadian tertiary care hospital before and during a regional epidemic associated with the BI/NAP1/027 strain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008; 52(9): 3180-7.

CAPÍTULO X – BIBLIOGRAFÍA

- LaFrance ME, Farrow MA, Chandrasekaran R et al. Identification of an epithelial cell receptor responsible for *Clostridium difficile* TcdB-induced cytotoxicity. *P Natl Acad Sci USA*. 2015; 112: 7073–8.
- Lanis JM, Barua S, Ballard JD. Variations in TcdB activity and the hypervirulence of emerging strains of *Clostridium difficile*. *PLoS Pathog*. 2010; 6: e1001061.
- Larcombe S, Hutton ML, Lyras D. Involvement of Bacteria Other Than *Clostridium difficile* in Antibiotic-Associated Diarrhoea. *Trends Microbiol*. 2016; 24: 463-76.
- Larsen JM. The immune response to *Prevotella* bacteria in chronic inflammatory disease. *Immunology*. 2017; 151: 363-74.
- Lathrop SK, Bloom SM, Rao SM, Nutsch K, Lio CW, Santacruz N et al. Peripheral education of the immune system by colonic commensal microbiota. *Nature*. 2011; 478(7368): 250-4.
- Lawley TD, Clare S, Walker AW, Stares MD, Connor TR, Raisen C et al. Targeted restoration of the intestinal microbiota with a simple, defined bacteriotherapy resolves relapsing *Clostridium difficile* disease in mice. *PLoS Pathog*. 2012; 8(10): e1002995.
- Lawson PA, Rainey FA. Proposal to restrict the genus *Clostridium* (Prazmowski) to *Clostridium butyricum* and related species. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2015; 66: 1009-16.
- Lawson PA, Citron DM, Tyrrell KL, Finegold SM. Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O'Toole 1935) Prévot 1938. *Anaerobe*. 2016; 40: 95-9.
- Leatham MP, Banerjee S, Autieri SM, Mercado-Lubo R, Conway T, Cohen PS. Precolonized human commensal *Escherichia coli* strains serve as a barrier to *E. coli* O157:H7 growth in the streptomycin-treated mouse intestine. *Infect Immun*. 2009; 77(7): 2876-86.

CAPÍTULO X – BIBLIOGRAFÍA

- Lee SM, Donaldson GP, Mikulski Z, Boyajian S, Ley K, Mazmanian SK. Bacterial colonization factors control specificity and stability of the gut microbiota. *Nature*. 2013; 501(7467): 426–9.
- Lee YJ, Arguello ES, Jenq RR, Littmann E, Kim GJ, Miller LC et al. Protective Factors in the Intestinal Microbiome Against *Clostridium difficile* Infection in Recipients of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *J Infect Dis*. 2017; 215(7): 1117-23.
- Legendre P, Lalande V, Eckert C, Barbut F, Fardet L, Meynard JL et al. *Clostridium difficile* associated reactive arthritis: Case report and literature review. *Anaerobe*. 2016; 38: 76-80.
- Lessa FC, Winston LG, McDonald LC. Emerging Infections Program *C. difficile* Surveillance Team. Burden of *Clostridium difficile* infection in the United States. *N Engl J Med*. 2015; 372(24): 2369-70.
- Lin J, Smith MP, Chapin KC, Baik HS, Bennett GN, Foster JW. Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*. 1996; 62(9): 3094-100.
- Litvak Y, Byndloss MX, Tsohis RM, Bäumlér AJ. Dysbiotic Proteobacteria expansion: a microbial signature of epithelial dysfunction. *Curr Opin Microbiol*. 2017; 39: 1-6.
- Loo VG, Bourgault AM, Poirier L, Lamothe F, Michaud S, Turgeon N et al. Host and pathogen factors for *Clostridium difficile* infection and colonization. *N Engl J Med*. 2011; 365(18): 1693-703.
- Loo VG, Poirier L, Miller MA, Oughton M, Libman MD, Michaud S et al. A predominantly clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality. *N Engl J Med*. 2005; 353(23): 2442-9.
- Lopetuso LR, Petito V, Graziani C, Schiavoni E, Paroni Sterbini F, Poscia A et al. Gut Microbiota in Health, Diverticular Disease, Irritable Bowel Syndrome,

CAPÍTULO X – BIBLIOGRAFÍA

and Inflammatory Bowel Diseases: Time for Microbial Marker of Gastrointestinal Disorders. *Dig Dis*. 2018; 36(1): 56-65.

- Lopez CA, Miller BM, Rivera-Chávez F, Velazquez EM, Byndloss MX, Chávez-Arroyo A et al. Virulence factors enhance *Citrobacter rodentium* expansion through aerobic respiration. *Science*. 2016; 353(6305): 1249-53.
- Louis P, Flint HJ. Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *FEMS Microbiol Lett*. 2009 ; 294(1): 1-8.
- Lozupone CA, Li M, Campbell TB, Flores SC, Linderman D, Gebert MJ et al. Alterations in the gut microbiota associated with HIV-1 infection. *Cell Host Microbe*. 2013; 14: 329-33.
- Lozupone C, Knight R. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol*. 2005 ;71(12): 8228-35.
- Lyon SA, Hutton ML, Rood JI, Cheung JK, Lyras D. CdtR regulates TcdA and TcdB production in *Clostridium difficile*. *PLoS Pathog*. 2016; 12: e1005758.
- Lv LX, Fang DQ, Shi D, Chen DY, Yan R, Zhu YX et al. Alterations and correlations of the gut microbiome, metabolism and immunity in patients with primary biliary cirrhosis. *Environ Microbiol*. 2016; 18(7): 2272-86.
- Macpherson AJ, McCoy KD. Stratification and compartmentalisation of immunoglobulin responses to commensal intestinal microbes. *Semin. Immunol*. 2013; 25: 358–363.
- Madan R, Guo X, Naylor C, Buonomo EL, Mackay D, Noor Z et al. Role of leptin-mediated colonic inflammation in defense against *Clostridium difficile* colitis. *Infect Immun*. 2014; 82(1): 341-9.
- Mancabelli L, Milani C, Lugli GA, Turrone F, Cocconi D, van Sinderen D et al. Identification of universal gut microbial biomarkers of common human intestinal diseases by meta-analysis. *FEMS Microbiol Ecol*. 2017; 93(12).

CAPÍTULO X – BIBLIOGRAFÍA

- Mani N, Dupuy B. Regulation of toxin synthesis in *Clostridium difficile* by an alternative RNA polymerase sigma factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98: 5844-9.
- Manges AR, Labbe A, Loo VG, Atherton JK, Behr MA, Masson L et al. Comparative metagenomic study of alterations to the intestinal microbiota and risk of nosocomial *Clostridium difficile*-associated disease. *J Infect Dis*. 2010; 202(12):1877-84.
- Mansour NM, Elkhatib WF, Aboshanab KM, Bahr MMA. Inhibition of *Clostridium difficile* in Mice Using a Mixture of Potential Probiotic Strains *Enterococcus faecalis* NM815, *E. faecalis* NM915, and *E. faecium* NM1015: Novel Candidates to Control *C. difficile* Infection (CDI). *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2018; 10(3): 511-22.
- Mariat D, Firmesse O, Levenez F, Guimarães V, Sokol H, Doré J et al. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiol*. 2009; 9: 123.
- Marín M, Martín A, Alcolea A, Iglesias C, Alcalá L, Peláez T et al. First case of autochthonous *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 detected in Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2014 ;32(6): 355-8.
- Marsh JW, Arora R, Schlackman JL, Shutt KA, Curry SR, Harrison LH et al. Association of relapse of *Clostridium difficile* disease with BI/NAP1/027. *J. Clin. Microbiol*. 2012 ; 50: 4078–82.
- Masui R, Sasaki M, Funaki Y, Ogasawara N, Mizuno M, Iida A, et al . G protein-coupled receptor 43 moderates gut inflammation through cytokine regulation from mononuclear cells. *Inflamm Bowel Dis*. 2013; 19(13): 2848-56.
- Mattila E, Arkkila P, Mattila PS, Tarkka E, Tissari P, Anttila VJ. Extraintestinal *Clostridium difficile* infections. *Clin Infect Dis*. 2013; 57: 148–53.
- McFarland LV. Evidence-based review of probiotics for antibiotic-associated diarrhea and *Clostridium difficile* infections. *Anaerobe*. 2009; 15(6): 274-80.

CAPÍTULO X – BIBLIOGRAFÍA

- McFarland LV, Mulligan ME, Kwok RY, Stamm WE. Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* infection. *N Engl J Med*. 1989; 320: 204–10.
- McFarland LV, Ship N, Auclair J, Millette M. Primary prevention of *Clostridium difficile* infections with a specific probiotic combining *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, and *L. rhamnosus* strains: assessing the evidence. *J Hosp Infect*. 2018; 99(4): 443-52.
- McDonald LC, Gerding DN, Johnson S, Bakken JS, Carroll KC, Coffin SE et al. 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). *Clin Infect Dis*. 2018; 66(7): 1-48.
- McDonald L, Owings M, Jernigan D. *Clostridium difficile* infection in patients discharged from US short-stay hospitals, 1996–2003. *Emerg Infect Dis*. 2006; 12: 409–15.
- Meader E, Mayer MJ, Gasson MJ, Steverding D, Carding SR, Narbad A. Bacteriophage treatment significantly reduces viable *Clostridium difficile* and prevents toxin production in an in vitro model system. *Anaerobe*. 2010; 16(6): 549-54.
- Melville S, Craig L. Type IV pili in Gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2013; 77: 323-41.
- Merrigan M, Venugopal A, Mallozzi M, Roxas B, Viswanathan VK, Johnson S et al. Human hypervirulent *Clostridium difficile* strains exhibit increased sporulation as well as robust toxin production. *J Bacteriol*. 2010; 192: 4904–4911.
- Meyer GK, Neetz A, Brandes G, Tsikas D, Butterfield JH, Just I et al. *Clostridium difficile* toxins A and B directly stimulate human mast cells. *Infect Immun*. 2007; 75: 3868–76.

CAPÍTULO X – BIBLIOGRAFÍA

- Milani C, Ticinesi A, Gerritsen J, Nouvenne A, Lugli GA, Mancabelli L et al. Gut microbiota composition and *Clostridium difficile* infection in hospitalized elderly individuals: a metagenomic study. *Sci Rep.* 2016; 6: 25945.
- Mikelsaar M, Sepp E, Štšepetova J, Songisepp E, Mändar R. Biodiversity of Intestinal Lactic Acid Bacteria in the Healthy Population. *Adv Exp Med Biol.* 2016; 932: 1-64.
- Mits WK. Hype or hypervirulence: a reflection on problematic *C. difficile* strains. *Virulence.* 2013; 4(7): 592-6.
- Monot M, Eckert C, Lemire A, Hamiot A, Dubois T, Tessier C, Dumoulaud et al. *Clostridium difficile*: new insights into the evolution of the pathogenicity locus. *Sci Rep.* 2015; 5: 15023.
- Morales Chamorro R, Serrano Blanch R, Mendez Vidal MJ, Gómez España MA, Rubio Pérez MJ, De la Haba Rodríguez JR et al. Pseudomembranous colitis associated with chemotherapy with 5-fluorouracil. *Clin Transl Oncol.* 2005; 7: 258–61.
- Moreno-Indias I, Cardona F, Tinahones FJ, Queipo-Ortuño MI. Impact of the gut microbiota on the development of obesity and type 2 diabetes mellitus. *Front Microbiol.* 2014; 5: 190.
- Morgan XC, Huttenhower C. Chapter 12: Human Microbiome Analysis. *PLoS Comput Biol.* 2012a; 8(12): e1002808.
- Morgan XC, Tickle TL, Sokol H, Gevers D, Devaney KL, Ward DV et al. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biol.* 2012b; 13(9): R79.
- Moore JH, Pinheiro CC, Zaenker EI, Bolick DT, Kolling GL, van Opstal E et al. Defined Nutrient Diets Alter Susceptibility to *Clostridium difficile* Associated Disease in a Murine Model. *PLoS One.* 2015; 10: e0131829.
- Morotomi M, Nagai F, Sakon H, Tanaka R. *Paraprevotella clara* gen. nov., sp. nov. and *Paraprevotella xylaniphila* sp. nov., members of the family

CAPÍTULO X – BIBLIOGRAFÍA

- 'Prevotellaceae' isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2009; 59(8): 1895-1900.
- Morrison DJ, Preston T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes.* 2016; 7: 189–200.
 - Mukherjee K, Karlsson S, Burman LG, Akerlund T. Proteins released during high toxin production in *Clostridium difficile*. *Microbiology.* 2002; 148: 2245–53.
 - Müller HE. Occurrence and pathogenic role of *Morganella-Proteus-Providencia* group bacteria in human feces. *J Clin Microbiol.* 1986; 23(2): 404-5.
 - Murray R, Boyd D, Levett PN, Mulvey MR, Alfa MJ. Truncation in the *tcdC* region of the *Clostridium difficile* PathLoc of clinical isolates does not predict increased biological activity of toxin B or toxin A. *BMC Infect Dis.* 2009; 9: 103.
 - Musso G, Gambino R, Cassader M. Obesity, diabetes, and gut microbiota: The hygiene hypothesis expanded? *Diabetes Care.* 2010; 33: 2277–84.
 - Nagai F, Morotomi M, Sakon H, Tanaka R. *Parasutterella excrementihominis* gen. nov., sp. nov., a member of the family *Alcaligenaceae* isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2009; 59: 1793-7.
 - Nagai M, Obata Y, Takahashi D, Hase K. Fine-tuning of the mucosal barrier and metabolic systems using the diet-microbial metabolite axis. *Int Immunopharmacol.* 2016; 37: 79–86.
 - Natarajan M, Walk ST, Young VB, Aronoff DM. A clinical and epidemiological review of non-toxicogenic *Clostridium difficile*. *Anaerobe.* 2013; 22: 1–5.
 - Ng KM, Ferreyra JA, Higginbottom SK, Lynch JB, Kashyap PC, Gopinath S et al. Microbiota-liberated host sugars facilitate post-antibiotic expansion of enteric pathogens. *Nature.* 2013; 502(7469): 96-9.

CAPÍTULO X – BIBLIOGRAFÍA

- Oksanen J. *vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.4-4. 2017. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>.
- Ozaki E, Kato H, Kita H, Karasawa T, Maegawa T, Koino Y et al. *Clostridium difficile* colonization in healthy adults: transient colonization and correlation with enterococcal colonization. *J Med Microbiol*. 2004; 53: 167-72.
- Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol*. 2007; 5(7): e177.
- Paredes-Sabja D, Cofre-Araneda G, Brito-Silva C, Pizarro-Guajardo M, Sarker MR. *Clostridium difficile* spore macrophage interactions: spore survival. *PLoS One*. 2012a; 7: e43635.
- Paredes-Sabja D, Sarker MR. Adherence of *Clostridium difficile* spores to Caco-2 cells in culture. *J Med Microbiol*. 2012b; 61: 1208-18.
- Paredes-Sabja D, Sarker MR. Germination response of spores of the pathogenic bacterium *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* to cultured human epithelial cells. *Anaerobe*. 2011; 17: 78–84.
- Paredes-Sabja D, Setlow P, Sarker M. Germination of spores of Bacillales and Clostridiales species: mechanisms and proteins involved, *Trends Microbiol*. 2011;19: 85-94.
- Paredes-Sabja D, Shen A, Sorg JA. *Clostridium difficile* spore biology: sporulation, germination, and spore structural proteins. *Trends Microbiol*. 2014; 22(7): 406–16.
- Parks DH, Chuvochina M, Waite DW, Rinke C, Skarszewski A, Chaumeil PA et al. A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life. *Nat Biotechnol*. 2018 Nov; 36(10): 996-1004.
- Pasinetti GM, Singh R, Westfall S, Herman F, Faith J, Ho L. The Role of the Gut Microbiota in the Metabolism of Polyphenols as Characterized by Gnotobiotic Mice. *J Alzheimers Dis*. 2018; 63(2): 409–21.

CAPÍTULO X – BIBLIOGRAFÍA

- Pechine S, Hennequin C, Boursier C, Hoys S, Collignon A. Immunization Using GroEL Decreases *Clostridium difficile* Intestinal Colonization. *PLoS One*. 2013; 8: e81112.
- Pépin J, Saheb N, Coulombe MA, Alary ME, Corriveau MP, Authier S et al. Emergence of fluoroquinolones as the predominant risk factor for *Clostridium difficile*-associated diarrhea: a cohort study during an epidemic in Quebec. *Clin Infect Dis*. 2005; 41:1254–60.
- Pépin J, Valiquette L, Alary ME, Villemure P, Pelletier A, Forget K et al. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity. *CMAJ*. 2004; 171: 466–72.
- Pereira FC, Saujet L, Tomé AR, Serrano M, Monot M, Couture-Tosi E et al. The Spore Differentiation Pathway in the Enteric Pathogen *Clostridium difficile*. *PLoS Genet*. 2013; 9: e1003782.
- Pessione E. Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: lights and shadows. *Front Cell Infect Microbiol*. 2012; 2: 86.
- Peterfreund GL, Vandivier LE, Sinha R, Marozsan AJ, Olson WC, Zhu J et al. Succession in the gut microbiome following antibiotic and antibody therapies for *Clostridium difficile*. *PLoS One*. 2012; 7(10): e46966.
- Planche TD, Davies KA, Coen PG, Finney JM, Monahan IM, Morris KA et al. Differences in outcome according to *Clostridium difficile* testing method: a prospective multicentre diagnostic validation study of *C. difficile* infection. *Lancet Infect Dis*. 2013; 13: 936–45.
- Polage CR, Solnick JV, Cohen SH. Nosocomial diarrhea: evaluation and treatment of causes other than *Clostridium difficile*. *Clin Infect Dis*. 2012; 55: 982–9.
- Popoff MR, Rubin EJ, Gill DM, Boquet P. Actin-specific ADP-ribosyltransferase produced by a *Clostridium difficile* strain. *Infect Immun*. 1988; 56: 2299–2306.

CAPÍTULO X – BIBLIOGRAFÍA

- Porres-Osante N, Sáenz Y, Somalo S, Torres C. Characterization of Beta-lactamases in Faecal Enterobacteriaceae Recovered from Healthy Humans in Spain: Focusing on AmpC Polymorphisms. *Microb Ecol.* 2015; 70(1): 132-40.
- Postma N, Kiers D, Pickkers P. The challenge of *Clostridium difficile* infection: Overview of clinical manifestations, diagnostic tools and therapeutic options. *Int J Antimicrob Agents.* 2015; 46(1) :47-50.
- Prince AL, Chu DM, Seferovic MD, Antony KM, Ma J, Aagaard KM. The perinatal microbiome and pregnancy: moving beyond the vaginal microbiome. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015; 5: a023051.
- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 2013; 41: D590-6.
- Putnam EE, Nock AM, Lawley TD, Shen A. SpoIVA and SipL are *Clostridium difficile* spore morphogenetic proteins. *J Bacteriol.* 2013; 195: 1214–25.
- Razaq N, Sambol S, Nagaro K, Zukowski W, Cheknis A, Johnson S et al. Infection of hamsters with historical and epidemic BI types of *Clostridium difficile*. *J Infect Dis.* 2007; 196: 1813–1819.
- Rea MC, O'Sullivan O, Shanahan F, O'Toole PW, Stanton C, Ross RP et al. *Clostridium difficile* carriage in elderly subjects and associated changes in the intestinal microbiota. *J Clin Microbiol.* 2012; 50(3): 867-75.
- Reeves AE, Koenigsknecht MJ, Bergin IL, Young VB. Suppression of *Clostridium difficile* in the gastrointestinal tracts of germfree mice inoculated with a murine isolate from the family Lachnospiraceae. *Infect Immun.* 2012; 80(11): 3786-94.
- Reeves AE, Theriot CM, Bergin IL, Huffnagle GB, Schloss PD, Young VB. The interplay between microbiome dynamics and pathogen dynamics in a murine model of *Clostridium difficile* Infection. *Gut Microbes.* 2011; 2(3): 145-58.

CAPÍTULO X – BIBLIOGRAFÍA

- Reunanen J, Kainulainen V, Huuskonen L, Ottman N, Belzer C, Huhtinen H et al. Akkermansia muciniphila Adheres to Enterocytes and Strengthens the Integrity of the Epithelial Cell Layer. *Appl Environ Microbiol.* 2015; 81(11): 3655-62.
- Reynolds CB, Emerson JE, de la Riva L, Fagan RP, Fairweather NF. The Clostridium difficile cell Wall protein CwpV is antigenically variable between strains, but exhibits conserved aggregation-promoting function. *PLoS Pathog.* 2011; 7: e1002024.
- Ridlon JM, Harris SC, Bhowmik S, Kang DJ, Hylemon PB. Consequences of bile salt biotransformations by intestinal bacteria. *Gut Microbes.* 2016; 7(1) :22-39.
- Riggs MM, Sethi AK, Zabarsky TF, Eckstein EC, Jump RL, Donskey CJ. Asymptomatic carriers are a potential source for transmission of epidemic and nonepidemic Clostridium difficile strains among long-term care facility residents. *Clin Infect Dis.* 2007; 45: 992–8.
- Rineh A, Kelso MJ, Vatansever F, Tegos GP, Hamblin M R. Clostridium difficile infection: molecular pathogenesis and novel therapeutics. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2014; 12: 131-50.
- Rivera-Chávez F, Lopez CA, Bäumlér AJ. Oxygen as a driver of gut dysbiosis. *Free Radic Biol Med.* 2017; 105: 93-101.
- Rivière A, Gagnon M, Weckx S, Roy D, De Vuyst L. Mutual Cross-Feeding Interactions between Bifidobacterium longum subsp. longum NCC2705 and Eubacterium rectale ATCC 33656 Explain the Bifidogenic and Butyrogenic Effects of Arabinoxylan Oligosaccharides. *Appl Environ Microbiol.* 2015 ; 81(22): 7767-81.
- Rodríguez-Pardo D, Almirante B, Bartolomé RM, Pomar V, Mirelis B, Navarro F et al. Epidemiology of Clostridium difficile infection and risk factors for unfavorable clinical outcomes: results of a hospital-based study in Barcelona, Spain. *J Clin Microbiol.* 2013; 51(5): 1465-73.

CAPÍTULO X – BIBLIOGRAFÍA

- Rodriguez C, Taminiau B, Van Broeck J, Delm M, Daube G, Clostridium difficile in food and animals: a comprehensive review. *Adv Exp Med Biol.* 2016; 932: 65-92.
- Roshan N, Hammer KA, Riley TV. Non-conventional antimicrobial and alternative therapies for the treatment of Clostridium difficile infection. *Anaerobe.* 2018; 49: 103-11.
- Ross CL, Spinler JK, Savidge TC. Structural and functional changes within the gut microbiota and susceptibility to Clostridium difficile infection. *Anaerobe.* 2016; 41: 37-43.
- Rousseau C, Poilane I, De Pontual L, Maherault AC, Le Monnier A, Collignon A. Clostridium difficile carriage in healthy infants in the community: a potential reservoir for pathogenic strains. *Clin Infect Dis.* 2012; 55: 1209–15.
- Rupnik M, Janezic S. An update on Clostridium difficile toxinotyping. *J Clin Microbiol.* 2016; 54: 13–8.
- Rupnik M. Heterogeneity of large clostridial toxins: importance of Clostridium difficile toxinotypes. *FEMS Microbiol Rev.* 2008; 32: 541–55.
- Sakamoto M, Benno Y. Reclassification of Bacteroides distasonis, Bacteroides goldsteinii and Bacteroides merdae as Parabacteroides distasonis gen. nov., comb. nov., Parabacteroides goldsteinii comb. nov. and Parabacteroides merdae comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2006; 56(7): 1599-605.
- Sambol SP, Merrigan MM, Tang JK, Johnson S, Gerding DN. Colonization for the prevention of Clostridium difficile disease in hamsters. *J Infect Dis.* 2002 ; 186(12): 1781-9.
- Samore MH, DeGirolami PC, Tlucko A, Lichtenberg DA, Melvin ZA, Karchmer AW. Clostridium difficile colonization and diarrhea at a tertiary care hospital. *Clin Infect Dis.* 1994; 18: 181–7.

CAPÍTULO X – BIBLIOGRAFÍA

- Sánchez T, Brooks J, Sullivan P, Juhasz M, Mintz E, Dworkin MS et al. Bacterial diarrhea in persons with HIV infection, United States, 1992–2002. *Clin Infect Dis.* 2005; 41: 1621–7.
- Sánchez-Hurtado K, Corretge M, Mutlu E, McIlhagger R, Starr JM, Poxton IR. Systemic antibody response to *Clostridium difficile* in colonized patients with and without symptoms and matched controls. *J Med Microbiol.* 2008; 57: 717–24.
- Sangster W, Hegarty JP, Schieffer KM, Wright JR, Hackman J, Toole DR et al. Bacterial and Fungal Microbiota Changes Distinguish *C. difficile* Infection from Other Forms of Diarrhea: Results of a Prospective Inpatient Study. *Front Microbiol.* 2016; 7: 789.
- Sansonetti PJ, Santo JPD. Debugging how Bacteria Manipulate the Immune Response. *Immunity.* 2007; 26: 149–61.
- Sarker MR, Paredes-Sabja D. Molecular basis of early stages of *Clostridium difficile* infection: germination and colonization. *Future Microbiol.* 2012; 7(8): 933–43.
- Scher JU, Sczesnak A, Longman RS, Segata N, Ubeda C, Bielski C et al. Expansion of intestinal *Prevotella copri* correlates with enhanced susceptibility to arthritis. 2013; 2: e01202.
- Schmieder R, Edwards R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics.* 2011; 27(6): 863–4.
- Schubert AM, Rogers MA, Ring C, Mogle J, Petrosino JP, Young VB et al. Microbiome data distinguish patients with *Clostridium difficile* infection and non-*C. difficile*-associated diarrhea from healthy controls. *MBio.* 2014; 5(3): e01021-14.
- Schubert AM, Sinani H, Schloss PD. Antibiotic-Induced Alterations of the Murine Gut Microbiota and Subsequent Effects on Colonization Resistance against *Clostridium difficile*. *MBio.* 2015; 6(4): e00974.

CAPÍTULO X – BIBLIOGRAFÍA

- Schwan C, Stecher B, Tzivelekidis T, van Ham M, Rohde M, Hardt WD et al. Clostridium difficile toxin CDT induces formation of microtubule-based protrusions and increases adherence of bacteria. PLoS Pathog. 2009; 5: e1000626.
- Sebaihia M, Wren BW, Mullany P, Fairweather NF, Minton N, Stabler R et al. The multidrug-resistant human pathogen Clostridium difficile has a highly mobile, mosaic genome. Nat Genet. 2006; 38: 779-86.
- Seekatz AM, Wolfrum E, DeWald CM, Putler RKB, Vendrov KC, Rao K et al. Presence of multiple Clostridium difficile strains at primary infection is associated with development of recurrent disease. Anaerobe. 2018 ; 53: 74-81.
- Seekatz AM, Young VB. Clostridium difficile and the microbiota. J Clin Invest. 2014; 124(10): 4182-9.
- Segain JP, Raingeard de la Blétière D, Bourreille A, Leray V, Gervois N, Rosales C et al. Butyrate inhibits inflammatory responses through NFKappaB inhibition: implications for Crohn's disease. Gut. 2000; 47(3): 397-403.
- Servin AL. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. FEMS Microbiol Rev. 2004; 28(4): 405-40.
- Setlow P. I will survive: DNA protection in bacterial spores. Trends Microbiol. 2007; 15: 172–80.
- Shan M, Gentile M, Yeiser JR, Walland AC, Bornstein VU, Chen K, He B et al. Mucus enhances gut homeostasis and oral tolerance by delivering immunoregulatory signals. Science. 2013; 342(6157): 447-53.
- Shin NR, Whon TW, Bae JW. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. Trends Biotechnol. 2015; 33(9): 496-503.
- Shim JK, Johnson S, Samore MH, Bliss DZ, Gerding DN. Primary symptomless colonisation by Clostridium difficile and decreased risk of subsequent diarrhoea. Lancet. 1998; 351: 633– 6.

CAPÍTULO X – BIBLIOGRAFÍA

- Sicard JF, Le Bihan G, Vogeleeer P, Jacques M, Harel J. Interactions of Intestinal Bacteria with Components of the Intestinal Mucus. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017; 7: 387.
- Singh RK, Chang HW, Yan D, Lee KM, Ucmak D, Wong K et al. Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. *J Transl Med.* 2017; 15(1): 73.
- Sirard S, Valiquette L, Fortier LC. Lack of association between clinical outcome of *Clostridium difficile* infections, strain type, and virulence-associated phenotypes. *J Clin Microbiol.* 2011; 49: 4040–46.
- Skraban J, Dzeroski S, Zenko B, Mongus D, Gangl S, Rupnik M. Gut microbiota patterns associated with colonization of different *Clostridium difficile* ribotypes. *PLoS One.* 2013; 8: e58005.
- Shahinas D, Silverman M, Sittler T, Chiu C, Kim P, Allen-Vercoe E, et al. Toward an understanding of changes in diversity associated with fecal microbiome transplantation based on 16S rRNA gene deep sequencing. *MBio.* 2012; 3(5): e00338-12.
- Sherid M, Samo S, Sulaiman S, Husein H, Sifuentes H, Sridhar S. Liver abscess and bacteremia caused by *Lactobacillus*: role of probiotics? Case report and review of the literature. *BMC Gastroenterol.* 2016; 16(1): 138.
- Shimodaira H. An approximately unbiased test of phylogenetic tree selection. *Syst Biol.* 2002; 51(3):492-508.
- Smith A. Outbreak of *Clostridium difficile* infection in an English hospital linked to hypertoxin-producing strains in Canada and the US. *Euro Surveill.* 2005; 10(26): 2735. <https://doi.org/10.2807/esw.10.26.02735-en>. Acceso: Julio 2018.
- Smith PM, Howitt MR, Panikov N, Michaud M, Gallini CA, Bohlooly-Y et al. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science.* 2013; 341(6145): 569-73.

CAPÍTULO X – BIBLIOGRAFÍA

- Solbach P, Chhatwal P, Woltemate S, Tacconelli E, Buhl M, Gerhard M et al. BaiCD gene cluster abundance is negatively correlated with *Clostridium difficile* infection. *PLoS One*. 2018; 13(5): e0196977.
- Soler P, Nogareda F, Cano R. Rates of *Clostridium difficile* infection in patients discharged from Spanish hospitals, 1997-2005. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2008; 29: 887–9.
- Sorg JA, Sonenshein AL. Bile salts and glycine as cogerminants for *Clostridium difficile* spores. *J Bacteriol*. 2008; 190: 2505–12.
- Sorg JA, Sonenshein AL. Inhibiting the initiation of *Clostridium difficile* spore germination using analogs of chenodeoxycholic acid, a bile acid. *J Bacteriol*. 2010; 192: 4983–90.
- Stabler RA, Gerding DN, Songer JG, Drudy D, Brazier JS, Trinh HT et al. Comparative phylogenomics of *Clostridium difficile* reveals clade specificity and microevolution of hypervirulent strains. *J Bacteriol*. 2006; 188: 7297-305.
- Stabler RA, He M, Dawson L, Martin M, Valiente E, Corton C. Comparative genome and phenotypic analysis of *Clostridium difficile* 027 strains provides insight into the evolution of a hypervirulent bacterium. *Genome Biol*. 2009; 10: R102.
- Staley C, Kelly CR, Brandt LJ, Khoruts A, Sadowsky MJ. Complete Microbiota Engraftment Is Not Essential for Recovery from Recurrent *Clostridium difficile* Infection following Fecal Microbiota Transplantation. *MBio*. 2016; 7(6): e01965-16.
- Sunkesula VC, Kundrapu S, Jury LA, Deshpande A, Sethi AK, Donskey CJ. Potential for transmission of spores by patients awaiting laboratory testing to confirm suspected *Clostridium difficile* infection. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2013; 34: 306-8.
- Sun X, He X, Tzipori S, Gerhard R, Feng H. Essential role of the glucosyltransferase activity in *Clostridium difficile* toxin-induced secretion of TNF-alpha by macrophages. *Microb Pathogenesis*. 2009; 46: 298–305.

CAPÍTULO X – BIBLIOGRAFÍA

- Sun X, Hirota SA. The roles of host and pathogen factors and the innate immune response in the pathogenesis of *Clostridium difficile* infection. *Mol Immunol*. 2015; 63(2): 193-202.
- Surawicz CM, Brandt LJ, Binion DG, Ananthakrishnan AN, Curry SR, Gilligan PH et al. Guidelines for diagnosis, treatment, and prevention of *Clostridium difficile* infections. *Am J Gastroenterol*. 2013; 108(4): 478-98.
- Suzuki R, Shimodaira H. Pvcust: An R package for assessing the uncertainty in hierarchical clustering. *Bioinformatics*. 2006; 22(12): 1540-2.
- Taha S, Johansson O, Rivera Jonsson S, Heimer D, Krovacek K. Toxin production by and adhesive properties of *Clostridium difficile* isolated from humans and horses with antibiotic-associated diarrhea. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2007; 30: 163-74.
- Tailford LE, Owen CD, Walshaw J, Crost EH, Hardy-Goddard J, Le Gall G et al. Discovery of intramolecular trans-sialidases in human gut microbiota suggests novel mechanisms of mucosal adaptation. *Nat Commun*. 2015; 6: 7624.
- Thanissery R, Winston JA, Theriot CM. Inhibition of spore germination, growth, and toxin activity of clinically relevant *C. difficile* strains by gut microbiota derived secondary bile acids. *Anaerobe*. 2017; 45: 86-100.
- Theriot CM, Koenigsnecht MJ, Carlson PE Jr, Hatton GE, Nelson AM, Li B, et al. Antibiotic-induced shifts in the mouse gut microbiome and metabolome increase susceptibility to *Clostridium difficile* infection. *Nat Commun*. 2014; 5: 3114.
- Thibault A, Miller MA, Gaese C. Risk factors for the development of *Clostridium difficile*-associated diarrhea during a hospital outbreak. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1991; 12: 345–8.
- Thursby E, Juge N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochemical Journal*. 2017; 474(11): 1823-1836.

CAPÍTULO X – BIBLIOGRAFÍA

- Tickler IA, Goering RV, Whitmore JD, Lynn AN, Persing DH, Tenover FC; Healthcare Associated Infection Consortium. Strain types and antimicrobial resistance patterns of *Clostridium difficile* isolates from the United States, 2011 to 2013. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58(7): 4214-8.
- Trifan A, Stoica O, Stanciu C, Cojocariu C, Singeap AM, Girleanu I et al. *Clostridium difficile* infection in patients with liver disease: a review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2015; 34(12): 2313-24.
- Tuson HH, Foley MH, Koropatkin NM, Biteen JS. The Starch Utilization System Assembles around Stationary Starch-Binding Proteins. *Biophys J.* 2018; 115(2): 242-50.
- Ubeda C, Bucci V, Caballero S, Djukovic A, Toussaint NC, Equinda M et al. Intestinal microbiota containing *Barnesiella* species cures vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* colonization. *Infect Immun.* 2013; 81(3): 965-73.
- Umesaki Y, Setoyama H, Matsumoto S, Imaoka A, Itoh K. Differential roles of segmented filamentous bacteria and clostridia in development of the intestinal immune system. *Infect Immun.* 1999; 67(7): 3504-11.
- Valdés-Varela L, Hernández-Barranco AM, Ruas-Madiedo P, Gueimonde M. Effect of *Bifidobacterium* upon *Clostridium difficile* Growth and Toxicity When Co-cultured in Different Prebiotic Substrates. *Front Microbiol.* 2016; 7: 738.
- Valles-Colomer M, Falony G, Darzi Y, Tigchelaar EF, Wang J, Tito RY et al. The neuroactive potential of the human gut microbiota in quality of life and depression. *Nat Microbiol.* 2019; 4(4): 623-32.
- Van Nood E, Vrieze A, Nieuwdorp M, Fuentes S, Zoetendal EG, de Vos WM et al. Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. *N Engl JMed.* 2013; 368(5): 407-15.
- Vázquez-Baeza Y, Pirrung M, Gonzalez A, Knight R. EMPeror: a tool for visualizing high-throughput microbial community data. *Gigascience.* 2013; 2(1): 16.

CAPÍTULO X – BIBLIOGRAFÍA

- Velázquez OC, Lederer HM, Rombeau JL. Butyrate and the colonocyte. Production, absorption, metabolism, and therapeutic implications. *Adv Exp Med Biol.* 1997; 427: 123-34.
- Vincent C, Miller MA, Edens TJ, Mehrotra S, Dewar K, Manges AR. Bloom and bust: intestinal microbiota dynamics in response to hospital exposures and *Clostridium difficile* colonization or infection. *Microbiome.* 2016; 4: 12.
- Von Eichel-Streiber C, Laufenberg-Feldmann S, Sartingen S, Schulze J, Sauerborn M. Comparative sequence analysis of the *Clostridium difficile* toxins A and B. *Mol Gen Genet.* 1992; 233: 260-8.
- Walk ST, Micic D, Jain R, Lo ES, Trivedi I, Liu EW et al. *Clostridium difficile* ribotype does not predict severe infection. *Clin Infect Dis.* 2012; 55: 1661–1668.
- Waligora AJ, Hennequin C, Mullany P, Bourlioux P, Collignon A, Karjalainen T. Characterization of a cell surface protein of *Clostridium difficile* with adhesive properties. *Infect Immun.* 2001; 69: 2144-53.
- Warny M, Pépin J, Fang A, Killgore G, Thompson A, Brazier J et al. Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. *Lancet.* 2005; 366: 1079–84.
- Wang S, Shen A, Setlow P, Li YQ. Characterization of the dynamic germination of individual *Clostridium difficile* spores using Raman spectroscopy and differential interference contrast microscopy, *J. Bacteriol.* 2015; 14: 2361-73.
- 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.
- Wei Y, Yang F, Wu Q, Gao J, Liu W, Liu C et al. Protective Effects of Bifidobacterial Strains Against Toxigenic *Clostridium difficile*. *Front Microbiol.* 2018; 9: 888.

CAPÍTULO X – BIBLIOGRAFÍA

- Wenisch C, Parschalk B, Hasenhüendl M, Hirschl AM, Graninger W. Comparison of vancomycin, teicoplanin, metronidazole, and fusidic acid for the treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Clin Infect Dis*. 1996; 22: 813–8.
- Wexler AG, Goodman AL. An insider's perspective: *Bacteroides* as a window into the microbiome. *Nat Microbiol*. 2017; 2: 17026.
- Whittaker RH. Evolution and Measurement of Species Diversity. *Taxon*. 1972; 21: 213-51.
- Wiegand PN, Nathwani D, Wilcox MH, Stephens J, Shelbaya A, Haider S. Clinical and economic burden of *Clostridium difficile* infection in Europe: a systematic review of healthcare-facility-acquired infection. *J Hosp Infect*. 2012; 81(1): 1-14.
- Wilcox MH, Gerding DN, Poxton IR, Kelly C, Nathan R, Birch T et al. Bezlotoxumab for Prevention of Recurrent *Clostridium difficile* Infection. *N Engl J Med*. 2017; 376(4): 305-17.
- Wilcox MH, Howe R. Diarrhoea caused by *Clostridium difficile*: response time for treatment with metronidazole and vancomycin. *J Antimicrob Chemother*. 1995; 36: 673–9.
- Wilcox MH, Shetty N, Fawley WN, Shemko M, Coen P, Birtles A et al. Changing epidemiology of *Clostridium difficile* infection following the introduction of a national ribotyping-based surveillance scheme in England. *Clin Infect Dis*. 2012; 55: 1056–63.
- Wilson KH, Sheagren JN, Freter R. Population dynamics of ingested *Clostridium difficile* in the gastrointestinal tract of the Syrian hamster. *J Infect Dis*. 1985; 151: 355–61.
- Winter SE, Lopez CA, Bäumlér AJ. The dynamics of gut-associated microbial communities during inflammation. *EMBO Rep*. 2013; 14(4): 319-27.

CAPÍTULO X – BIBLIOGRAFÍA

- Winston JA, Theriot CM. Impact of microbial derived secondary bile acids on colonization resistance against *Clostridium difficile* in the gastrointestinal tract. *Anaerobe*. 2016; 41: 44-50.
- Wu F, Guo X, Zhang J, Zhang M, Ou Z, Peng Y. *Phascolarctobacterium faecium* abundant colonization in human gastrointestinal tract. *Exp Ther Med*. 2017; 14(4): 3122–26.
- Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen YY, Keilbaugh SA et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science*. 2011; 334(6052): 105-8.
- Wu J, Zhou Z, Hu Y, Dong S. Butyrate-induced GPR41 activation inhibits histone acetylation and cell growth. *J Genet Genomics*. 2012; 39(8): 375-84.
- Xia Y, Sun J. Hypothesis testing and statical analysis of microbiome. *Genes Dis*. 2017; 4(3): 138-48.
- Ye Z, Zhang N, Wu C, Zhang X, Wang Q, Huang X et al. A metagenomic study of the gut microbiome in Behcet's disease. *Microbiome*. 2018; 6(1): 135.
- Yoon S, Yu J, McDowell1, Kim SH, Ju HJ, Ko G. Bile salt hydrolase-mediated inhibitory effect of *Bacteroides ovatus* on growth of *Clostridium difficile*. *J Microbiol*. 2017; 55(11): 892-99.
- Yuan P, Zhang H, Cai C et al. Chondroitin sulfate proteoglycan 4 functions as the cellular receptor for *Clostridium difficile* toxin B. *Cell Res*. 2015; 25: 157–68.
- Yun B, Song M, Park DJ, Oh S. Beneficial Effect of *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 on Survival Rate of *Clostridium difficile* Infection in Mice. *Korean J Food Sci Anim Resour*. 2017; 37(3): 368-75.
- Yutin N, Galperin MY. A genomic update on clostridial phylogeny: Gram-negative spore formers and other misplaced clostridia. *Environ Microbiol*. 2013; 15(10): 2631-41.

CAPÍTULO X – BIBLIOGRAFÍA

- Zacharioudakis IM, Zervou FN, Pliakos EE, Ziakas PD, Mylonakis E. Colonization with toxinogenic *C. difficile* upon hospital admission, and risk of infection: a systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol*. 2015; 110: 381–91.
- Zackular JP, Moore JL, Jordan AT, Juttukonda LJ, Noto MJ, Nicholson MR et al. Dietary zinc alters the microbiota and decreases resistance to *Clostridium difficile* infection. *Nat Med*. 2016; 22(11): 1330-34.
- Zakham F, Pillonel T, Brunel AS, Zambelli PY, Greub G, Croxatto A et al. Molecular diagnosis and enrichment culture identified a septic pseudoarthrosis due to an infection with *Erysipelatoclostridium ramosum*. *Int J Infect Dis*. 2019; 81: 167-9.
- Zar FA, Bakkanagari SR, Moorthi KM, Davis MB. A comparison of vancomycin and metronidazole for the treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea, stratified by disease severity. *Clin Infect Dis*. 2007; 45: 302–7.
- Zhang L, Dong D, Jiang C, Li Z, Wang X, Peng Y. Insight into alteration of gut microbiota in *Clostridium difficile* infection and asymptomatic *C. difficile* colonization. *Anaerobe*. 2015; 34: 1-7.
- Zhang X, Wang X, Yang J, Liu X, Cai L, Zong Z. Colonization of toxigenic *Clostridium difficile* among ICU patients: a prospective study. *BMC Infect Dis*. 2016; 16: 397.
- Zhang X, Zhao Y, Xu J, Xue Z, Zhang M, Pang X et al. Modulation of gut microbiota by berberine and metformin during the treatment of high-fat diet-induced obesity in rats. *Sci Rep*. 2015; 5: 14405.
- Zhao Y, Wu J, Li JV, Zhou NY, Tang H, Wang Y. Gut microbiota composition modifies fecal metabolic profiles in mice. *J. Proteome Res*. 2013; 12: 2987-99.
- Zilberberg MD, Tillotson GS, McDonald C. *Clostridium difficile* infections among hospitalized children, United States, 1997–2006. *Emerg Infect Dis*, 2010;16:604–9.