



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO

«CLOSTRIDIUM DIFFICILE : Formas de resistencia y aprovechamiento
de la etanolamina»

Autor: Sara Rodrigues Valcarce

D.N.I.:50234672-G

Tutor: Maria Pilar Gomez-Serranillos Cuadrado

Convocatoria: Madrid, Febrero 2016

INDICE

- Resumen
- Introducción y antecedentes
- Objetivos
- Metodología
- Resultados y discusión
- Conclusión
- Bibliografía

ABSTRACT

The high persistence of *Clostridium difficile* in the medium is due, among other reasons, having the ability to form endospores, able to survive in the environment for long periods of time and resist to chemical treatments.

This is the big problem that occurs in hospitals and health centers, as their presence in the middle makes patients may be colonized by bacteria and are capable of having an infection of *Clostridium Difficile* (ICD). The magnitude of their impact, socially and economically, requires the need to update the knowledge of *C. difficile* and deeper into the pathogenic process, particularly in the sporulation process.

Ethanolamine is a compound present in cell membranes that certain bacteria can use as a source of nitrogen and carbon. Numerous studies have identified a relationship between the use of ethanolamine and virulence of certain pathogenic bacteria.

This review aims to examine the evolution, in the last ten years, of information and scientific contributions in relation to the process of sporulation of *Clostridium difficile* and the use of ethanolamine . Also, it pretends to delve into the potential role that the use of ethanolamine might have on sporulation.

RESUMEN

La elevada persistencia de *Clostridium difficile* en el medio se debe, entre otros motivos, a la habilidad que presenta para desarrollar formas de resistencias, capaces de sobrevivir en el medio durante largos periodos de tiempo y resistir frente a tratamientos químicos.

Este es el gran problema que presenta en hospitales y en centros sanitarios, pues su presencia en el medio hace que los pacientes puedan ser colonizados por la bacteria y sean susceptibles de padecer una ICD. La importancia de su impacto, tanto social como económico, requiere la necesidad de actualizar los conocimientos sobre *Clostridium difficile* y profundizar más en el proceso patogénico, en concreto en el proceso de esporulación.

La etanolamina es un compuesto presente en las células, utilizado por ciertas bacterias como fuente de carbón y nitrógeno. Numerosos estudiosos han identificado una relación entre la utilización de la etanolamina y la virulencia de ciertas bacterias patógenas.

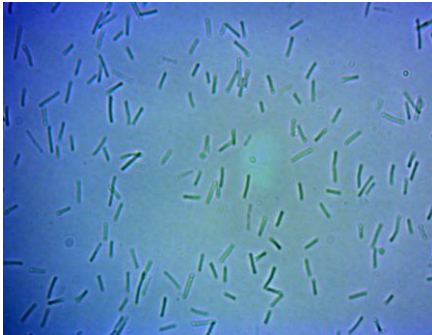
Este trabajo de fin de grado pretende conocer la evolución, a largo de estos últimos diez años, de la información y aportaciones científicas en lo relacionado con el proceso de esporulación de *Clostridium difficile* y en el aprovechamiento de la etanolamina. Así mismo, ahondar el posible papel que el aprovechamiento de la etanolamina pudiera tener en la esporulación.

INTRODUCCIÓN

Clostridium difficile es un bacilo Gram positivo, perteneciente al Filo Firmicutes. Aislado en 1935 por Ivan C. Hall y Elizabeth O'Toole, fue denominado *Bacillus difficile*, por su morfología, por su lento crecimiento y la dificultad que les supuso su aislamiento. En 1938 paso a llamarse *Clostridium difficile* y por lo tanto a pertenecer al género *Clostridium*¹.

- Morfología

Se trata de un largo bacilo anaerobio estricto con un tamaño de aproximadamente 2,5-5,9 x 0,3-1,5 µm, que presenta en su superficie flagelos peritricos que le confieren movilidad a la bacteria. Su



temperatura óptima de crecimiento in vitro es de 30-37 °C y forma colonias con una morfología característica.² Las colonias son redondas con bordes irregulares, de 2-5mm de diámetro, de color blanco en el centro y grisáceo a su alrededor; y no hemolíticas. Además presenta un olor peculiar descrito por varios autores como “olor a establo de caballos” debido a un compuesto volátil que generan denominado p-cresol³.

Existen dos cepas en la naturaleza que pueden colonizar al ser humano y otros mamíferos, una toxigénica y otra no toxigénica. Sin embargo, solo la cepa toxigénica está relacionada con la producción de enfermedad.

-Transmisión. Esporas y colonización

La transmisión de *C.difficile* se produce por la vía fecal-oral desde un portador asintomático o enfermo a un individuo sano⁴.

Clostridium difficile es capaz de formar esporas subterminales.

Esta forma de resistencia le facilita su transmisión, la supervivencia en el medio ambiente y resistencia a tratamientos químicos. Las esporas, ubicuas en el medio ambiente y ampliamente distribuidas sobre todo en centros sanitarios o de cuidados médicos, son ingeridas por contacto con superficies contaminadas. Estas esporas cuando se encuentran en condiciones favorables, como es el caso del intestino de un hospedador susceptible, germinan dando lugar a las formas vegetativas. Por este motivo se considera que las esporas son la forma de transmisión y de iniciación.

La germinación de las esporas es un proceso que depende de la presencia de distintos compuestos: se estimula en presencia de ácido cólico, sus derivados y ciertos aminoácidos y se ve inhibida por oxígeno y por elevadas cantidades de ácido queno-deoxicólico (componente de las sales biliares).

En condiciones normales, la germinación a nivel intestinal se ve inhibida pues las sales biliares son

degradadas por hidrolasas y metabolizadas por otras especies de la flora intestinal. Sin embargo, cuando la flora y el epitelio intestinal se ven afectados, esta degradación no ocurre y se produce un aumento de ácido cólico. Este aumento junto con el hecho de que no haya bacterias competidoras que impidan a *Clostridium* su colonización permiten la germinación de las esporas.

Esto explicaría porque la colonización de *Clostridium* solo se da cuando el epitelio intestinal está alterado y porque existen portadores de esporas asintomáticos.

Por lo tanto, tras la germinación comienza la fase de colonización seguida de la proliferación y producción de toxinas.

Durante la colonización, las formas vegetativas se desplazan gracias a sus flagelos y, mediante sus adhesinas y proteasas, comienzan a adherirse a la mucosa intestinal y a penetrar en los enterocitos⁵.

Toxinas

Las toxinas TcdA y TcdB son las principales responsables del poder patogénico de la bacteria. Se trata de toxinas pertenecientes al grupo de toxinas clostridiales denominadas “large clostridial toxins (LCTs)”, su nombre se debe su gran peso molecular⁴.

Estas toxinas están codificadas por unos genes presentes en un locus de patogenicidad de *Clostridium difficile* denominado PaLoc. Este locus presenta los genes que codifican las toxinas: tcdA y tcdB, y tres genes con actividad reguladora: tcdR, tcdE y tcdC.

Las toxinas tcdA y tcdB presentan una actividad glucosiltransferasa que inactiva GTPasas como las proteínas Rho, Rac o Cdc42 de las células epiteliales del hospedador causando alteraciones en la señalización, en la adhesión, desorganización del esqueleto e incluso la apoptosis. Para ello las toxinas deben interactuar con los receptores celulares y así poder penetrar posteriormente en la célula mediante un mecanismo de endocitosis.

El receptor es distinto para ambas toxinas. El receptor de tcdA es un carbohidrato Gal- β -(1,4)-GlcNac, ubicado en la zona apical de los enterocitos, con el que interactúa la toxina a través de su extremo C-terminal. Esta interacción podría ser la responsable de que los menores de un año sean portadores asintomáticos, pues a esa edad sus organismos no están completamente desarrollados y presentan un déficit de carbohidratos en el lumen intestinal. Por otra parte se desconoce el receptor de la toxina tcdB, se sabe que no es un carbohidrato pues se une a células que carecen de glucocálix. Se cree que la toxina tcdB podría interactuar con distintos receptores o que el receptor se encuentre en distintos tipos celulares, ubicados en el organismo pues se sabe que interactúa e intoxica a un amplio rango de células.

La toxina A, además, presenta actividad proinflamatoria. La entrada de la toxina activa el factor nuclear κ B que a su vez estimula la síntesis de interleucinas y prostaglandinas. Como consecuencia de esta estimulación, se activa la respuesta inmunitaria que conlleva a la formación de la pseudomembrana, a su vez la liberación de prostaglandinas como la prostaglandina E2 produce vasodilatación e induce la secreción de cloruro sódico y salida de agua a través de la mucosa intestinal. Además la toxina A estimula las fibras nerviosas y la liberación de la sustancia P, e inhibe la liberación de noradrenalina en el intestino, lo que conlleva a una mayor secreción de electrolitos y agua al lumen intestinal.

Existe una tercera toxina, toxina binaria CDT, que no está presente en todas las cepas toxigénicas de *Clostridium difficile* y que, por lo tanto; no es esencial en la virulencia de la bacteria pero es considerado un factor de virulencia adicional.⁶

Consecuencias: síntomas y repercusión social.

En cuanto a la sintomatología tras la infección producida por *Clostridium difficile* (ICD) es muy variada, ya que se trata de una bacteria que se encuentra formando parte de la microbiota intestinal en aproximadamente el 70 % de niños menores de 1 año, de manera asintomática; y que puede formar parte de la flora intestinal de los adultos a nivel del colon (representando aproximadamente un 3% del total).⁷

Así podríamos decir que las consecuencias van desde la colonización asintomática hasta la diarrea simple, la colitis fulminante o la muerte.

La diarrea simple generalmente se acompaña de síntomas generales como fiebre, hiperleucocitosis, deshidratación extracelular y dolores abdominales⁸. La diarrea es sin duda la forma más frecuente, a diferencia de otras formas más graves como la colitis pseudomembranosa que afecta a menos de un 10%.

Las principales complicaciones de ICD son megacolon, perforación digestiva, shock séptico, etc.

Estas consecuencias patológicas dependerán de ciertos factores de riesgo tales como la edad (mayores de 65 años), patologías subyacentes, inmunosupresión, hospitalización, cambios en la medicación, antecedentes de cirugías digestivas y otros como tabaquismo, uso de antiácidos o empleo de sondas nasogástricas.

El uso de antibióticos ha estado relacionado con la aparición de infección por *Clostridium difficile* pues suprimen la flora intestinal habitual y esto favorece la colonización y proliferación de *C.difficile*. Los más frecuentes son los beta-lactámicos de amplio espectro y las cefalosporinas.⁷

En los últimos años, *Clostridium difficile* se ha convertido en la principal responsable de las infecciones intestinales nosocomiales, reemplazando incluso a *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) en países como Estados Unidos o Reino Unido. En general, esta bacteria representa entre el 20 y el 30% de los casos de diarreas asociados al uso de antibióticos y es la causa más común de diarrea infecciosa en instituciones sanitarias.

Solo en el año 2005 en EEUU, 250.000 hospitalizaciones se debieron a infecciones por *Clostridium difficile* (ICD).⁹

Aunque los datos sobre los costes asociados a las infecciones son escasos, se espera que el impacto económico de la enfermedad aumente.

OBJETIVOS

La elección de nuestro objetivo se basa en la necesidad de conocer aquellos factores que pudieran influir en la capacidad de la bacteria para crear formas de resistencia. Puesto que recientes estudios han confirmado la existencia de la relación entre el aprovechamiento de la etanolamina por parte de la bacteria y su patogenicidad, trataremos de buscar una posible relación entre ambas.

El objetivo de este trabajo de fin de grado se ha planteado desde un punto de vista global para tratar de afirmar si existe o no una relación entre el aprovechamiento de la etanolamina y la esporulación en *Clostridium difficile*.

Para ello, necesitamos conocer en profundidad estos dos aspectos: estudiaremos la evolución de los artículos centrados en el mecanismo de esporulación a lo largo de los últimos diez años, profundizaremos en el mecanismo mediante el cual *C.difficile* utiliza la etanolamina y buscaremos esa posible relación.

Por lo tanto, el trabajo se puede desglosar en dos partes:

- 1.) Revisión bibliográfica sobre la esporulación de *Clostridium difficile* y breve estudio sobre el mecanismo de aprovechamiento de la etanolamina en *C.difficile*.
- 2.) Posible relación entre el aprovechamiento de la etanolamina y la capacidad de esporulación en *C. difficile*.

METODOLOGÍA

1) Revisión bibliográfica

En la búsqueda de información realizada se utilizó la base de datos Science Direct¹⁰, que contiene artículos de revistas, libros, informes, tesis y bases de datos. Los pasos seguidos fueron los siguientes:

- Etapa 1. Revisión de todos los artículos que hacían referencia a las siguientes palabras clave: Clostridium, *Clostridium difficile*, spores, sporulation, ethanolamine, bacterium y ethanolamine utilization. Los artículos revisados estaban datados entre los años 1997 y 2015.
- Etapa 2. A partir de los artículos obtenidos en la Etapa 1, se realizó un análisis preliminar de los estudios relacionados con la esporulación de *C.difficile* y por otra parte la del aprovechamiento de la etanolamina únicamente en bacterias.
- Etapa 3. Se estudiaron más en profundidad aquellos artículos relacionados con la utilización de la etanolamina. De esta forma conocimos más el mecanismo por el cual ciertas bacterias emplean este compuesto en su catabolismo y el rol de esta capacidad en la patogenia.
- Etapa 4. Finalmente buscamos aquellas referencias que relacionaran el uso de la etanolamina con la esporulación de *C.difficile*. Así conseguimos saber si en el momento de la búsqueda, había un gran número de artículos y publicaciones anteriores que relacionasen ambos aspectos. Esta última búsqueda nos ayudó a saber cómo orientar nuestro trabajo y establecer un segundo objetivo.

2) Relación entre la utilización de la etanolamina y la esporulación

La manera más sencilla de evaluar la formación de esporas de *Clostridium difficile* es mediante el recuento de las esporas.

Por lo tanto, si tratábamos de ver si el empleo de la etanolamina influía en la capacidad de esporular, nos centramos en comparar el número de esporas producidas por una cepa salvaje como la 630 y las producidas por una cepa mutada, sin el gen que permite aprovechar la etanolamina (cepa Δ Eut-B). De esta manera, trataremos de confirmar o rechazar nuestra hipótesis. Así planteamos nuestra hipótesis nula: las cepas de 630 y las cepas de Δ Eut-B serían idénticas, lo que significaría que el aprovechamiento de la etanolamina, no influye en la esporulación.

La cepa mutada se obtuvo a través de un proceso de intercambio alélico. Esta técnica es probablemente la estrategia más implementada para la mutagénesis dirigida en microorganismos¹¹. Con ésta se puede intercambiar un alelo limitado por regiones de ADN idénticas a las regiones de ADN del alelo original. La introducción de este nuevo alelo se realiza a través de un vector y su

posterior conjugación.

Dicho intercambio finalmente requerirá un proceso de recombinación homóloga entre los pares de regiones de ADN idénticas para que tenga lugar realmente el intercambio.¹²

Para llevar a cabo el recuento del número de esporas, seguimos un protocolo extraído de bibliografía¹³. Se realizó en paralelo para la cepa 630 y la cepa Δ Eut-B:

PREPARACIÓN DE ESPORAS DE *CLOSTRIDIUM DIFFICILE*

(Protocolo extraído del artículo «Reconsidering the sporulation Characteristics of Hypervirulent *Clostridium difficile* BI/NAP1/027», Burns D.A. & al, PlosOne, 2011)

1. Sacar las cepas de congelación y cultivar en una placa de cultivo de agar BHIS o CC (Columbia cisteína) con un 3-5% de sangre de caballo e incubar las placas en anaerobiosis a 37°C durante 36-48 horas.
2. Hacer un precultivo con colonias extraídas de las placas citadas anteriormente en 5 ml de medio líquido BHIS en anaerobiosis, una noche a 37°C.
3. Realizar subcultivos con una dilución de 1/100 en un tubo de 10ml de BHIS a partir del precultivo e incubar durante todo el día a 37°C en anaerobiosis. Dejar crecer hasta una densidad óptica $OD_{600\text{ nm}} = 0,2-0,5$ realizar a partir de este subcultivo, otro subcultivo 1/100 en frascos de 100ml de BHIS.
4. Incubar los botes de 100ml en anaerobiosis a 37°C durante 8-10 días.
5. Sacar y verificar la presencia de esporas. Traspasar a dos tubos de 50ml.
6. Lavado de los tubos de 50ml :
Una vez con 10 ml de agua estéril y centrifugación a 5000g durante 10 minutos a 20°C. Retirar el sobrenadante y repetir dos lavados más con 20ml y 30 ml de agua estéril.
7. Tras los tres lavados, coger el precipitado de cada tubo e introducirlos en 10 ml de agua estéril cada uno. Incubar los tubos a baño maría 25 minutos a 75°C. Centrifugar a 5000g 10 minutos 20 °C.
8. Eliminamos el sobrenadante y el precipitado de los dos tubos lo introducimos en 5ml de agua estéril.

9. Realizamos alícuotas de los 5ml, 1ml por tubo.
10. Preparar 100microlitros de alícuota con 900microlitros de tampón PBS y realizar diluciones de 100microlitros de ésta en 900microlitros de PBS (dilución -2). De esta dilución -2, cogemos 100microlitros y lo añadimos en 900 de PBS (dilución -3) y así otra vez más para obtener dilución -4.
11. Cultivo de 100microlitros de las diluciones -2, -3 y -4 en dos placas de cultivo cada muestra: BHI y BHI + taurocolato.

RESULTADOS

1.1) Revisión bibliográfica.

Desde el año 1997 hasta el 2015, existen un total de 1123 artículos en la base de datos Science Direct, que hagan referencia a la esporulación de *Clostridium difficile* y al aprovechamiento de la etanolamina.

En primer lugar, buscamos aquellas referencias que hubieran estudiado el aprovechamiento de la etanolamina únicamente en bacterias y en segundo lugar, la esporulación de *Clostridium difficile*. Una vez obtenidos los resultados obtenidos descartamos aquellos que no trataban en concreto estos dos aspectos, y buscamos artículos que hicieran referencia a una posible relación entre la utilización de la etanolamina y la capacidad para formar esporas en *C.difficile*.

Los datos obtenidos tras realizar un primer cribado fueron los que se muestran en la *Figura 1*:

Palabras clave	Nº de artículos en Science Direct
Bacterium ethanolamine utilization	599
Sporulation Clostridium difficile	512
Ethanolamine sporulation Clostridium difficile	12
Total	1123

Figura 1. Tabla que recoge el número de artículos obtenidos tras la búsqueda en Science Direct.

Si examinamos más en profundidad los resultados obtenidos y analizamos la evolución temporal de las investigaciones, se puede percibir cómo a partir del año 2000 comenzaron a ampliarse los estudios de manera progresiva en ambos campos.

Como apreciamos mejor en el siguiente gráfico, si comparamos el progreso de los dos temas, vemos que la evolución temporal ha seguido un crecimiento muy similar. Sin embargo, cabe destacar un

cambio en el aumento de las publicaciones anuales a partir del año 2007 y a su vez, también resaltar la diferencia abismal en el año 2011.

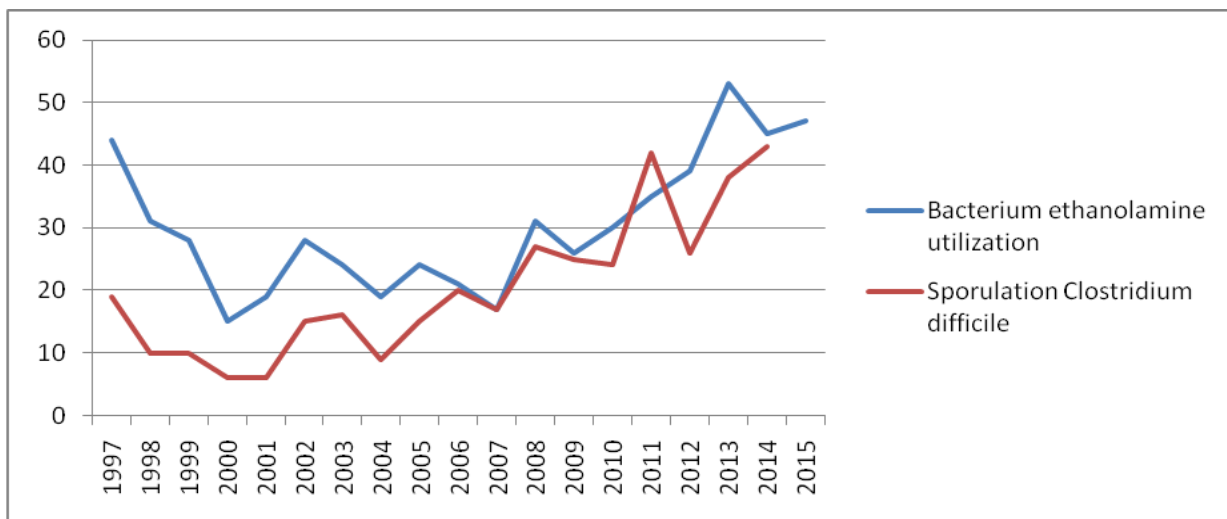


Figura 2. Gráfica con la evolución temporal de las publicaciones.

Este aumento brusco y esta tendencia creciente en las publicaciones referidas a la esporulación de *C.difficile* se debe principalmente a la necesidad de conocer más acerca de esta bacteria pues se ha convertido en los últimos años prácticamente en la principal responsable de las infecciones intestinales nosocomiales

Finalmente en nuestra búsqueda bibliográfica, en nuestro intento por estudiar las publicaciones que relacionasen ambos conceptos y trataran la relación de la utilización de la etanolamina y la capacidad de esporulación, encontramos únicamente 12 publicaciones que contuvieran las palabras clave, en los últimos diez años; aunque ningún artículo realmente se centraba en dicha relación.

1.2) Utilización de etanolamina

La membrana plasmática de las células de mamíferos y de ciertas bacterias se compone de un gran porcentaje de fosfatidiletanolamina. Este compuesto por acción de fosfodiesterasas se descompone en glicerol y etanolamina.

Un gran número de bacterias, como las pertenecientes al género *Clostridium*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* o *Enterococcus*, presentan una enzima denominada etanolamina aminoliasa capaz de escindir la etanolamina en acetaldehído y amoníaco. De esta forma pueden utilizar la etanolamina como única fuente de carbono y nitrógeno.

Las bacterias, por lo tanto, podrán obtener la etanolamina de la dieta del hospedador, de células bacterianas o del intestino del hospedador.¹⁴

Los principales genes implicados en este proceso son *eutB* y *eutC*, junto con hasta otros 16 genes

accesorios. Estudios recientes han descrito casi 100 secuencias completas de genoma bacteriano que contienen operones eut.

Desde la década de los 70 se comenzó a estudiar el mecanismo de utilización de la etanolamina en *Escherichia Coli* y *Salmonella typhimurium*. Desde entonces sabemos, por ejemplo, que una característica del uso de la etanolamina en *S.typhimurium* es que las enzimas esenciales en este proceso residen en un complejo multiproteico, que se cree que ayuda a retener los compuestos volátiles obtenidos en la degradación de la etanolamina para evitar pérdidas y a su vez proteger a la célula.

Sin embargo, con el paso del tiempo y de los estudios se han comprobado diferencias en los distintos grupos filogenéticos de bacterias que contenían estos genes. Así encontramos grupos con operones eut cortos y otros largos, siendo principalmente aerobios estrictos los primeros y anaerobios comensales en la boca o en el intestino, los segundos. Algunos carecen de las estructuras microcompartimentales que presentan ciertos grupos como *S.typhimurium*. Esta ausencia podría demostrar que la función de dichas estructuras es prescindible, pero necesario para aquellas que colonicen tractos anaerobios y dependan más de la etanolamina como fuente de energía.¹⁵

Actualmente se piensa que el uso de la etanolamina podría contribuir en la patogénesis de estas especies que se instauran en el intestino de una manera indirecta, puesto que poder emplear la etanolamina, abundante en esta zona, como fuente de carbón y de nitrógeno favorece su colonización.

Hoy por hoy no se conocen los mecanismos específicos que determinen cómo afecta a la patogénesis, sin embargo hay evidencias claras que indican que existe una estrecha relación. También se sabe que bajos niveles de etanolamina, por haber sido degradada por las bacterias, contribuyen a la aparición de problemas funcionales del intestino. Además una disminución de los niveles de fosfatidiletanolamina en el intestino podría ser causante de enfermedad ya que podría ser necesario para la inmunidad innata si contribuyera al correcto mantenimiento de la mucosa. A su vez, un aumento de acetato al degradar la etanolamina podría interactuar con los receptores asociados a proteínas G como el RPG43, modulando la inmunidad innata y la inflamación.

Según se ha visto en *S.typhimurium* el aprovechamiento de la etanolamina podría estar relacionado con otros mecanismos de patogénesis de las bacterias, ya que en esta especie los genes que regulan los flagelos, la expresión de la virulencia y los genes eut estarían regulados por el mismo regulador. Incluso en *Listeria monocytogenes* se estudió que una delección en los eutB disminuía al 10% la capacidad de crecimiento intracelular en cultivos con células Caco-2.

Una gran variedad de evidencias de distintos patógenos y de distintas infecciones relacionan la

etanolamina con la patogénesis.¹⁶

2) Relación entre la utilización de la etanolamina y la esporulación de *Clostridium difficile*.

Los cultivos en BHI fueron nuestro “blanco”, puesto que no presentaban ácido taurocólico, únicamente crecieron en dicho medio las formas vegetativas. Éstos nos permitieron descartar contaminación y asegurarnos que todo crecimiento que hubiera en el medio de BHI con taurocolato se debía a esporas de *C.difficile*. Finalmente a partir de estos cultivos, tanto con la cepa salvaje como con la cepa mutada, realizamos un recuento de esporas, únicamente en BHI enriquecido con ácido taurocólico, puesto que será en dicho medio donde encontremos únicamente las formas de resistencia.

Tras realizar 5 preparaciones, los resultados obtenidos en el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) fueron los siguientes:

BHI +Taurocolato														
Cepa 630														
1° preparación			2°preparación			3°preparación		4°preparación		5° preparación				
-2	Incontable		-2	Contaminado		-2	Incontable		-2	Incontable				
-3	113	92	-3	Contaminado		-3	Incontable		-3	Incontable				
-4	14	48	-4	86	121	-4	66	82	-4	121	67	-4	26	27

BHI + Taurocolato														
Cepa ΔEut-B														
1°prep.			2°prep.			3°prep.		4°prep.		5° prep.				
-2	95	85	-2	503	554	-2	6	12	-2	140	168	-2	63	74
-3	6	11	-3	108	67	-3	4	0	-3	6	4	-3	3	7
-4	3	0	-4	0	0	-4	0	0	-4	0	0	-4	1	0

Para poder comparar los resultados de recuento en todas las preparaciones, debemos fijar un título para cada una de las preparaciones. Para ello emplearemos la formula aquí descrita:

$$N = \frac{\sum C}{V \times (n_1 + 0,1 \times n_2)} \times \frac{1}{d}$$

C : Suma del total de UFC
V : volumen sembrado

n : numero de placas para una dilución
d : menor dilución empleada

De esta forma obtenemos unos resultados que nos permiten comparar concentraciones de UFC por mililitro en las distintas preparaciones.

Cepa 630				
#1	#2	#4	#5	#6
1,2E+06 UFC/ml	1,03E+07 UFC/ml	7,40E+06 UFC/ml	9,40E+06 UFC/ml	2,67E+06 UFC/ml

Cepa mutante Δ EUT-B				
#1	#2	#4	#5	#6
9E+04 UFC/ml	5,6E+05 UFC/ml	1,00E+04 UFC/ml	1,40E+05 UFC/ml	6,70E+05 UFC/ml

Una vez obtuvimos nuestros datos, realizamos el promedio de nuestros experimentos como se muestra en la *Figura 3*.

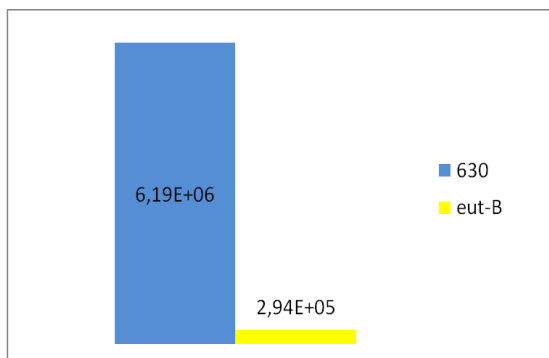


Figura 3. Representación gráfica de las medias de UFC/ml

Finalmente, tras obtener los resultados quisimos comprobar si se cumplía o no nuestra hipótesis nula. Puesto que se trataba de dos muestras aleatorias independientes y de poblaciones diferentes recurrimos a un test no paramétrico como el test estadístico de Mann-Whitney. Este test nos permitiría detectar diferencias entre las dos poblaciones en base a muestras aleatorias de ambas.

Este test también se conoce como test de Wilcoxon de la suma de rangos ya que consiste en realizar comparaciones: compararía a través de las medianas todos los valores de una muestra con los de la otra y se cuenta el número de veces que los de una muestra son superiores a los de la otra.

Como conclusión obtuvimos los siguientes valores:

Resultados	630	Δeut-B
Nº sujetos	5	5
Media	6194000	294000
Desviación Est.	4060502	299216
Mediana	7400000	140000
Cuartil 25%	2670000	90000
Cuartil 75%	9400000	560000
Inter Cuartil	6730000	470000
Índice U	25	0

Así pues obtuvimos un valor de U igual a 25. Aproximando su distribución de probabilidad a la normal logramos un valor estandarizado igual a 0,0079.

Así pudimos concluir que las medias de los dos grupos estudiados eran por lo tanto significativamente diferentes con un riesgo de error de $p < 0,0079$. Es decir que este ensayo nos permitió rechazar, por lo tanto, nuestra hipótesis nula. Así llegamos a la conclusión de que la esporulación de *C.difficile* 630 y la esporulación de *C.difficile* Δ Eut-B no son idénticas.

CONCLUSIÓN

En la actualidad nos enfrentamos a un aumento en los casos de infecciones causadas por *Clostridium difficile*. Podríamos afirmar que se trata de la primera causa de diarreas por infecciones nosocomiales en centros sanitarios. Este cambio epidemiológico se ha visto reflejado en el aumento de publicaciones científicas y estudios centrados en este problema, pues se trata de un problema de salud pública que además conlleva gastos sociales y económicos para la población.

A su vez, la falta de conocimiento en otros aspectos como son los roles de la utilización de la etanolamina por parte de las bacterias, no nos permite concretar si este proceso de aprovechamiento es una buena diana para reducir la patogénesis de ciertas bacterias como es *C.difficile*. A lo largo de la última década, hemos presenciado un aumento en los estudios que muestran evidencias de una relación con la virulencia de las bacterias, sin embargo, no hay datos suficientes.

Esto conlleva a la necesidad de ampliar los estudios con el fin de conocer cuáles son las consecuencias de la degradación de la etanolamina como fuente de energía para las bacterias.

Si concretamos más, la dificultad del control de las infecciones por *C.difficile* como hemos estudiado se centra en su capacidad para formar esporas y sobrevivir en el medio en condiciones muy desfavorables, que suponen la posibilidad de propagación.

En nuestra propuesta de profundizar más en las consecuencias que pueda tener el uso de la etanolamina en la esporulación, para poder controlar en un fin la propagación de esta bacteria y disminuir los casos de infecciones, comprobamos que suprimir el gen que permite este aprovechamiento suponía un cambio en la esporulación de la bacteria. Sin embargo, el estudio no nos permitió afirmar en un 100% que el aprovechamiento de la etanolamina y un cambio esporulación de *C.difficile* estuvieran estrechamente ligados.

En un futuro, sería interesante seguir profundizando en esta propiedad que caracteriza a tantas bacterias anaerobias del tracto intestinal, porque un nuevo descubrimiento en este ámbito podría conllevar a una nueva diana para controlar y reducir a gran escala el gasto económico, social y sanitario que conllevan las infecciones nosocomiales.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Alba Alderete P. *Clostridium difficile: prevalencia e importancia ecológica en animales domésticos y fauna salvaje*. 2011.
- (2) Edwards AN, Suárez, Jose M. and McBride, Shonna M. *Culturing and Maintaining Clostridium difficile in an Anaerobic Environment*. 9/14/2013(79):e50787
- (3) Hafiz, S. and Oakley, C.L. *Clostridium difficile isolation and characteristics*. 1976;9:129-136.
- (4) Pérez M, Hurtado AI, Couto I, Gutiérrez JM, Seoane L, Suárez, José M. y Galeiras, Rita. *Abordaje multidisciplinario de la infección por Clostridium difficile*. 2013;30(2):165-185.
- (5) Dürre P. *Physiology and Sporulation in Clostridium*. 2014 8 August 2014;TBS-0010-2012(Physiology and sporulation in Clostridium. Microbiol Spectrum 2).
- (6) Cartman ST, Kelly ML, Heeg D, T. Heap, John and Minton, Nigel P. *Precise Manipulation of the Clostridium difficile Chromosome Reveals a Lack of Association between the tcdC Genotype and Toxin Production*. July 2012;78(13):4683– 4690.
- (7) Hernández-Rocha C, Naour S, Álvarez-Lobos, Manuel y Paredes-Sabja, Daniel. *Infecciones causadas por Clostridium difficile: una visión actualizada*. 21 Junio 2012;29(4):434-445.
- (8) Hookman, Perry and Barkin, Jamie S. *Clostridium difficile associated infection, diarrhea and colitis*. April 7, 2009;15(13):1554-1580.
- (9) Karasa JA, Enochb DA, Aliyua SH. *A review of mortality due to Clostridium difficile infection*. July 2010;61(1):1-8.
- (10) ScienceDirect. 2016; Disponible en: www.sciencedirect.com/
- (11) Faulds-Pain A, Wren BW. *Improved Bacterial Mutagenesis by High-Frequency Allele Exchange, Demonstrated in Clostridium difficile and Streptococcus suis*. August 2013;79(15):. 4768 – 4771.
- (12) Ng YK, Ehsaan M, Philip S, Collery MM, Janoir C, Collignon A, et al. *Expanding the Repertoire of Gene Tools for Precise Manipulation of the Clostridium difficile Genome: Allelic Exchange Using pyrE Alleles*. 6 February 2013;8(2):e56051.
- (13) Burns D.A. et al, *Reconsidering the sporulation Characteristics of Hypervirulent Clostridium difficile*; BI/NAP1/027PlosOne, 2011
- (14) Staib, Lena and M. Fuchs, Thilo. *From food to cell: nutrient exploitation strategies of enteropathogens*. March 2014;160:1020–1039.
- (15) Pitts AC, Tuck LR, Faulds-Pain A, Lewis, Richard J. and Marles-Wright, Jon. *Structural Insight into the Clostridium difficile Ethanolamine Utilisation Microcompartment*. October 29, 2012;7(10):e48360.
- (16) Garsin DA. *Ethanolamine Utilization in Bacterial Pathogens: Roles and Regulation*. 2010 2010 April;8(4):290-295.