



Análisis de la frecuencia de detección de *Clostridium paraputrificum* y los potenciales cambios en la composición de comunidades bacterianas en muestras de heces de animales de granja y domésticos

Emanuella De La Cruz Bermúdez

Universidad del Rosario
Facultad de Ciencias Naturales
Programa de Biología
Bogotá DC, Colombia 2023

Análisis de la frecuencia de detección de *Clostridium paraputrificum* y los potenciales cambios en la composición de comunidades bacterianas en muestras de heces de animales de granja y domésticos

Emanuella De La Cruz Bermúdez

Trabajo de grado para obtener el título de:
Bióloga

Directora:
Marina Muñoz Díaz, MSc, PhD

Co-directora:
Anny Camargo Mancipe, MD, PhD(c)

Universidad del Rosario
Facultad de Ciencias Naturales
Programa de Biología
Bogotá DC, Colombia 2023

Análisis de la frecuencia de detección de *Clostridium paraputrificum* y los potenciales cambios en la composición de comunidades bacterianas en muestras de heces de animales de granja y domésticos

Emanuella De La Cruz¹, Anny Camargo^{1,2} y Marina Muñoz^{1*}

¹ Centro de Investigaciones en Microbiología y Biotecnología-UR (CIMBIUR), Facultad de Ciencias Naturales, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.

² Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

* Corresponding autor: claudia.munoz@urosario.edu.co

Resumen

Clostridium paraputrificum es una bacteria anaerobia Gram-positiva, móvil y formadora de esporas que causa infecciones pediátricas, enterocolitis y bacteriemia en pacientes inmunocomprometidos. En animales puede causar lesiones quitinolíticas e intestinales relacionadas con quistes gaseosos, gangrena gaseosa y enterocolitis necrotizante. La relevancia clínica ha sido poco descrita, aun cuando los reportes de caso de aislamientos de esta bacteria se asocian con infecciones graves en humanos y animales. En Colombia, se ha descrito el genoma y los factores de virulencia codificantes por *C. paraputrificum* en un grupo reducido de aislamiento obtenidos de humanos, pero no se ha estudiado la frecuencia de infección en humanos o animales, ni los cambios en la composición de la microbiota en presencia de este Clostridial. Debido a esto, en este estudio se determinó la frecuencia de circulación de *C. paraputrificum* en 302 muestras de heces de caninos, felinos y animales de granja del departamento de Boyacá y la ciudad de Bogotá, Cundinamarca usando Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Adicionalmente, se evaluó la composición de las comunidades microbianas en un subconjunto de muestras que incluyó individuos positivos y negativos para esta especie bacteriana en proporción 2:1, respectivamente. Para esto, se realizó secuenciación profunda del 16S-ARNr por la plataforma MinION (Oxford Nanopore Technologies). La frecuencia de detección global fue de *C. paraputrificum* en las muestras (C.par+) fue del 8% ($n=24$). Se encontró que la frecuencia de detección C.par+ en caninos fue del 30% ($n=12$), en felinos fue 6.5% ($n=8$), en caprinos fue 10% ($n=2$), en porcinos fue 2.5% ($n=1$) y en bovinos fue 2.5% ($n=1$). Una vez normalizadas las muestras y de acuerdo con la cantidad de lecturas obtenidas, se incluyeron 18 muestras C. par+ de caninos ($n=9$), caprinos ($n=2$) y felinos ($n=7$). El análisis de las comunidades bacterianas evidenció predominancia de los filo Proteobacteria, Bacteroidetes y Firmicutes en los tres grupos de animales. No obstante, los filo

Tenericutes, Actinobacteria y Kiritimatiellaeota no fueron predominantes en las muestras la abundancia relativa de estos fue mayor en caprinos en comparación con los caninos y felinos. En los caninos y felinos los principales miembros diferencialmente abundantes fueron *Faecalibacterium*, *Bacteroides* y *Bifidobacterium*, mientras que, entre los caprinos, los principales miembros diferencialmente abundantes con los cuales se relacionó fueron *Ruminococcaceae UCG-014*, *Alistipes* y *Escherichia-Shigella*. Este estudio permitió ampliar el panorama de las diferencias en la frecuencia de detección de *C. paraputrificum* entre animales y su potencial relevancia en la composición de la microbiota.

Abstract

Clostridium paraputrificum is a Gram-positive, anaerobic bacterium that is motile and forms spores. It causes pediatric infections, enterocolitis, and bacteremia in immunocompromised patients. In animals, it can lead to chitinolytic, and intestinal lesions associated with gas-filled cysts, gas gangrene, and necrotizing enterocolitis. Clinical significance has been poorly described, even though case reports of isolates of this bacterium are linked to severe infections in humans and animals. In Colombia, the genome and virulence factors encoded by *C. paraputrificum* have been described in a small group of isolates obtained from humans. However, the frequency of infection in humans or animals, as well as changes in the composition of the microbiota in the presence of this Clostridial species, have not been studied. Therefore, this study determined the frequency circulation of *C. paraputrificum* in 302 fecal samples from dogs, cats, and farm animals from the department of Boyacá and the city of Bogotá, Cundinamarca, using Polymerase Chain Reaction (PCR). The composition of microbial communities was evaluated in a subset of samples, including individuals positive and negative for this bacterial species in a 2:1 ratio, respectively. For this, deep sequencing of 16S rRNA was performed using the MinION platform (Oxford Nanopore Technologies). The overall detection frequency of *C. paraputrificum* in the samples (C.par+) was 8% (n=24). The C.par+ detection frequency in dogs was 30% (n=12), in cats was 6.5% (n=8), in goats was 10% (n=2), in pigs was 2.5% (n=1), and in cattle was 2.5% (n=1). Once the samples were normalized and according to the quantity of readings obtained, 18 samples of C. par+ from canines (n=9), caprines (n=2), and felines (n=7) were included. Analysis of bacterial communities revealed a predominance of the phyla Proteobacteria, Bacteroidetes, and Firmicutes in all three animal groups. However, the phyla Tenericutes, Actinobacteria, and Kiritimatiellaeota were not

predominant in the samples; their relative abundance was higher in goats compared to dogs and cats. In dogs and cats, the main differentially abundant members being *Faecalibacterium*, *Bacteroides*, and *Bifidobacterium*, whereas among goats, the main differentially abundant members being *Ruminococcaceae UCG-014*, *Alistipes*, and *Escherichia-Shigella*. This study helped broaden the understanding of differences in the detection frequency of *C. paraputrificum* among animals and its potential relevance in microbiota composition.

Palabras clave

Clostridium paraputrificum, comunidades bacterianas, animales, tracto gastrointestinal

Key words

Clostridium paraputrificum, Bacterial communities, animals, Gastrointestinal tract

1. Introducción

El género *Clostridium* cuenta con diversas bacterias patógenas que se asocian con infecciones entéricas y efectos neurotóxicos e histotóxicos (Uzal et al., 2018). Estas bacterias, anaerobias obligadas o aerotolerantes que producen esporas y toxinas, cuentan con múltiples factores de virulencia que favorecen el establecimiento de la infección (Vijayvargiya et al., 2020). Algunas especies con potencial patógeno del orden Clostridiales son *Clostridioides difficile* y *Clostridium perfringens* involucradas en el desarrollo de afecciones intestinales, *Clostridium botulinum* que produce botulismo y *Clostridium tetani* que es causante de tétanos (Kiu et al., 2017). Debido a su relevancia clínica, estas especies Clostridiales han sido objeto de múltiples estudios alrededor del mundo.

Clostridium paraputrificum es una bacteria anaerobia, Gram-positiva, móvil y formadora de esporas (Mostel & Tatem., 2022; Muñoz et al., 2019), de las menos estudiadas dentro del orden Clostridiales. Esta bacteria puede evadir el sistema inmune y establecer la infección en humanos y animales mediante el daño a las células epiteliales y a las membranas mucosas del intestino (Shinha & Hadi, 2015; Muñoz et al., 2019). Se conoce que esta bacteria posee una alta diversidad a nivel genómico por su plasticidad genómica, alto porcentaje de genes accesorios y la adquisición de genes por transferencia horizontal, que en conjunto le confieren una ventaja adaptativa en una amplia gama de ambientes (Muñoz et al., 2019).

La plasticidad genómica en bacterias confiere ventajas adaptativas que promueven la capacidad de colonización y el avance de la infección en el hospedero. Para el caso particular de *C. paraputrificum*, se ha reportado una amplia batería de factores de virulencia (Muñoz et al., 2019). Dentro de esta batería se incluyen genes codificantes para fosfolipasa (ytpA), que desencadenan una respuesta hidrolítica en las membranas celulares eucariotas y posiblemente en las células epiteliales (Kiu et al., 2017). Además, esta bacteria libera toxinas con una alta actividad citotóxica y proinflamatoria en las células del hospedero derivada de la presencia de los genes *toxZ*, *toxA* y *toxB* (Kiu et al., 2019; Muñoz et al., 2019). Por otra parte, *C. paraputrificum* posee mecanismos para la transferencia genética horizontal y la producción de esporas temporales metabólicamente inactivas (Ciuro et al., 2021) para la resistencia a antibióticos como clindamicina, vancomicina, tetraciclina, fluoroquinolonas y aminocumarinas (Kiu et al., 2017, Saad et al., 2022). Estos factores de virulencia pueden alterar las dinámicas y la composición bacteriana de animales por la disbiosis intestinal y causar enfermedades.

En humanos la mayoría de los estudios disponibles corresponden a reportes de caso se describe que *C. paraputrificum* se transmite por vía fecal-oral y se asocia con sepsis en infantes, infecciones pediátricas, enterocolitis, artritis séptica y bacteriemia en pacientes inmunocomprometidos (ej. Pacientes con SIDA, diabetes, anemia, cirrosis, apendicitis) (Kiu et al., 2017).

Aunque los estudios en animales son escasos, se han reportado datos de la frecuencia de infección en 12 codornices, de los cuales el 60% desarrolló enterocolitis necrotizante por la patogénesis de *C. paraputrificum* (Waligora-Dupriet et al., 2005). En porcinos se ha descrito el aumento del crecimiento poblacional de *C. paraputrificum* con el consumo de dietas de baja complejidad proteica durante la fase de destete (Levesque et al., 2014). Además, se ha identificado que esta bacteria puede causar lesiones en el exosqueleto de camarones por su actividad quitinolítica (Cobos & Yokoyama., 1995).

A pesar de la relevancia de esta especie en términos ecológicos, de salud pública y en las actividades del sector productivo agropecuario, no se conocen estudios de presencia y distribución de *C. paraputrificum* en animales domésticos y/o de granja en Colombia, y mucho menos se ha estudiado la ecología microbiana en presencia de esta especie. En este contexto, el presente estudio tuvo como objetivo describir la frecuencia de detección de esta bacteria en animales domésticos y de granja e identificar los cambios en la composición en las comunidades microbianas en muestras

de heces con presencia de *C. parapatrificum* circulante en felinos, caninos, bovinos, porcinos y felinos del departamento de Boyacá y Bogotá, Cundinamarca, a partir de la secuenciación del gen 16S-ARNr.

2. Métodos

Población de estudio

En el presente estudio se utilizó ADN de 302 muestras de heces de animales domésticos y de granja del repositorio de muestras del Grupo de Investigaciones Microbiológicas – UR (GIMUR). El proceso de colecta se realizó a partir de muestras de heces de animales aparentemente sanos, como se reportó previamente (Camargo *et al.*, 2022). Las muestras de heces de los animales de granja (bovinos, ovinos, caprinos y porcinos) se colectaron estimulando la ampolla rectal y tomando la muestra con guantes estériles directamente de la ampolla rectal. Las muestras de heces de caninos y felinos se colectaron directamente del suelo, inmediatamente posterior a la deposición. La muestra fue recogida del centro de la materia fecal con el fin de evitar contaminación ambiental. Todas las muestras se almacenaron en recipientes estériles de sello hermético, fueron debidamente rotuladas y transportadas en neveras con pilas de hielo hasta los laboratorios de procesamiento.

La extracción de ADN de las muestras fecales se realizó con el kit Stool DNA Isolation (Norgen Biotek Corporation, Ontario, Canadá) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de ADN se evaluó por medio del espectrofotómetro NanoDrop/2000/2000c (productos Thermo Fisher Scientific).

Inicialmente, para la selección del total de las muestras de animales se verificó que el criterio mínimo de la calidad del ADN tuviera la relación 260/280 entre 2.0-2.5 y una concentración de ADN mínima de 10 ng/μL. Una vez verificados estos criterios, para determinar la frecuencia de detección de *C. parapatrificum* en animales, se seleccionaron 122 muestras de heces de felinos, 40 muestras de heces de caninos, 20 muestras de heces de caprinos, 40 muestras de heces porcinos, 40 muestras de heces bovinos y 40 muestras de heces de ovinos.

Frecuencia de detección en los animales evaluados

Para la detección molecular de *C. parapatrificum* en las muestras, se amplificó el gen 16S- ARNr mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) convencional utilizando los cebadores CIPar-F(5'-CCTGAATTACCATGTAATGTGG-3') y CIPar-R (5' -

TCACGGTATTGCATCTCGT- 3') (Kikuchi et al., 2002). La especificidad de estos cebadores se validó *in silico* usando la herramienta BLAST (Kumar & Chordia, 2015) y el software Gene Runner v6.5.52 (Dozmorov et al., 2012). El perfil térmico de la PCR incluyó una desnaturalización inicial a 94 °C durante 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 59 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 2 minutos, y un ciclo de extensión final a 72°C durante 2 minutos (Kikuchi et al., 2002). Las muestras positivas para *C. paraptrophicum* (C.par+) se determinaron al observar una banda a la altura de 268 pares de bases (pb) luego de realizar la electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con tinción SYBR Safe (Invitrogen, Gaithersburg, MD, EE. UU).

El total de muestras positivas por PCR para *C. paraptrophicum* fue 24, distribuidas así: 12 muestras de heces de caninos C. par+, 8 muestras de heces de felinos C. par+, 2 muestras de heces de caprinos C. par+, 1 muestra de heces de porcino C. par+, 1 muestra de heces de bovino C. par+ y ninguna muestra de heces de ovinos C. par+.

Secuenciación por MinION (Oxford Nanopore) y análisis bioinformáticos

La descripción de las comunidades microbianas se llevó a cabo sobre las 24 muestras de heces que se detectaron C. par+ mediante la observación la banda a la altura de 268 pares de bases (pb) en el gel de agarosa luego de la PCR y que cumplieron con los criterios de concentración e integridad del ADN previamente descritos. Para este componente, se incluyeron además 12 muestras de heces con resultado C. par- como grupo de comparación de las comunidades microbiana, logrando una proporción 2:1 entre los grupos C. par+ y C. par-, respectivamente. De este modo, se incluyeron 4 muestras de heces de felinos C. par-, 4 muestras de heces de caninos C. par-, 2 muestras de heces de caprinos C. par-, una muestra de heces porcinos C. par- y una muestra de heces bovinos C. par-. Para seleccionar las muestras de heces C. par- se mantuvo la proporción de muestras por cada animal según las identificadas en el grupo C. par+.

Estas muestras C. par+ y C. par- se amplificaron con los cebadores universales de bacterias 27F (5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') (Dos Santos et al., 2019). Estos cebadores se utilizaron debido a que el gen 16S-ARNr tiene una amplia cobertura para el análisis de las comunidades de procariontes en las muestras. El perfil térmico de la PCR incluyó una desnaturalización inicial a 94 °C durante 30 segundos, seguido de 30 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 47.9 °C durante 1 minuto y 65°C durante 1.15 minutos, y

un ciclo de extensión final a 65 °C durante 10 minutos (Lorentz, 2012). La secuenciación se realizó mediante la plataforma MinION (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, United Kingdom).

El software ONT Guppy GPU v. 6.3.8 (Al-Dujaili et al., 2012) se utilizó para realizar el *Super-accurate basecalling* a partir de los datos Fast5 generando lecturas en formato FastQ con una calidad >14, resultado superior al promedio de calidad aceptada >7 para la plataforma MinION (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, United Kingdom) (Jain et al., 2016). El *demultiplexing* se llevó a cabo con el software ONT Guppy GPU v. 6.3.8 (Al-Dujaili et al., 2012). Los estadísticos de calidad de los archivos “fastq.gz” se calcularon con NanoStat v1.5.0 (De coster et al., 2018) (**Tabla S1**). Luego, los archivos se descomprimieron y se concatenaron para la clasificación taxonómica de géneros bacterianos usando la base de datos del gen 16S-ARNr SILVA v138 (Quast et al., 2012) mediante el programa Kraken2 v2.0.7-beta (Lu et al., 2022). La visualización de los resultados de clasificación de las secuencias bacterianas se ejecutó con la interfaz de Pavian en RStudio v4.2.3 (Breitwieser & Salzberg, 2020).

Normalización de los datos para el análisis de la composición de la microbiota

Luego de la secuenciación de 24 muestras C. par+ y 12 muestras C. par-, se excluyeron 3 muestras C. par+ (2 de caninos y 1 de felino) y 2 muestras C. par- (1 de bovino y 1 de felino) del estudio debido a que en estas se obtuvo un número de lecturas crudas menores a 5.000, lo cual limita la clasificación taxonómica robusta.

El número de lecturas por muestra fue normalizado luego de la clasificación taxonómica, debido a que estas pueden influir en las métricas de disimilitud (Weiss et al., 2017). Lo anterior se realizó mediante la función "rarefy_even_depth" (rngseed = 1) de phyloseq en RStudio v4.2.3 (R Core Team, 2013). Se estableció una profundidad mínima de 10.000 en la normalización, con la cual se logró describir la diversidad de las comunidades microbianas, tomando como indicador la estabilización de la curva de rarefacción. Con esto, se tuvo que excluir una muestra de caninos C. par+, una muestra de felino C. par-, una muestra de caprino C. par- y una muestra de porcino C. par- porque no alcanzaron esta profundidad mínima establecida. Cabe resaltar que, por los criterios de selección mencionados no se incluyeron los porcinos y bovinos C. par-, así que los porcinos y bovinos C. par+ se excluyeron de este componente ya que no se podría realizar una comparación de las comunidades microbianas.

Con todos los estándares de selección previamente establecidos, finalmente los análisis de las comunidades microbianas se realizaron con las siguientes muestras: 9 muestras de heces de caninos C. par+, 7 muestras de heces de felinos C. par+, 2 muestras de heces de caprinos C. par+. Para la comparación con las muestras C. par-, se incluyó: 4 muestras de caninos C. par-, 2 muestras de felinos C. par- y una muestra de caprino C. par- (**Tabla S2**).

Índices de diversidad y análisis de las comunidades microbianas

El análisis de la diversidad alfa se realizó mediante los índices de Shannon y Simpson. El índice de Shannon-Wiener se basa en la diversidad de la comunidad microbiana, teniendo en cuenta la riqueza de grupos taxonómicos y la abundancia relativa en cada muestra. La diversidad de la comunidad será mayor con el incremento del valor del índice de Shannon. Por otra parte, el índice de Simpson evalúa la dominancia de los grupos taxonómicos en la comunidad microbiana. Los valores cercanos a 1 indican que hay dominancia por pocos grupos taxonómicos en la muestra y, por ende, hay baja uniformidad en la comunidad de especies (Fedor & Zvaríková, 2019). Los índices de diversidad alfa de todas las muestras C. par+ y C. par- se obtuvieron en RStudio v4.2.3 (R Core Team, 2013) con el paquete `vegan`.

El análisis de componentes principales (PCA) para evaluar la diversidad beta está basado en los datos de la abundancia relativa de 9 géneros bacterianos diferencialmente abundantes. Se representó gráficamente la distribución de las muestras individuales y su correlación entre sí. Además, se agruparon las muestras individuales según el grupo caninos, felinos y caprinos. La visualización de la gráfica se efectuó con los paquetes de RStudio v4.2.3 (R Core Team, 2013) `factoextra`, `ggfortify` y `ggrebel`.

Los resultados de la clasificación taxonómica de las abundancias relativas de los fila y géneros en las muestras se representaron mediante gráficos de barras apiladas. Primero se realizó este gráfico con las abundancias relativas de los fila predominantes para las muestras totales C. par+ y C. par-. Luego, se realizó con las abundancias relativas de los fila predominantes para felinos C.par+/C. par-, caninos C.par+/C. par- y caprinos C.par+/C. par-. Por último, se hizo el gráfico de las abundancias relativas de los fila y géneros predominantes para cada muestra individual. Para la representación de las gráficas se utilizaron los paquetes de RStudio v4.2.3 (R Core Team, 2013) `tidyverse` y `ggplot2`.

Identificación de los géneros bacterianos diferencialmente abundantes

Los diagramas de rango con escala logarítmica (\log_{10}) para representar los cambios en la abundancia relativa de los géneros bacterianos diferencialmente abundantes entre los caninos, felinos y caprinos tanto C. par+ como C. par- se realizaron con el paquete de RStudio v4.2.3 (R Core Team, 2013) `vegan` y `tidyverse`. Para construir la matriz de correlación de estos géneros bacterianos diferencialmente abundantes entre los caninos, felinos y caprinos tanto C. par+ como C. par- se usaron los paquetes de RStudio v4.2.3 (R Core Team, 2013) `metan` y `ggcorrplot` con el método de correlación de Spearman para datos no paramétricos. Se graficó únicamente las correlaciones estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en estos grupos correspondientes a C. par+ y C. par-.

Análisis estadísticos

Se realizó una prueba de normalidad Shapiro-Wilk para los índices de diversidad de Shannon y Simpson de todas las muestras C. par+ y C. par- ($p > 0.05$) en RStudio v4.2.3 (R Core Team, 2013), con la cual se determinó que los datos no eran paramétricos. Por esto, para evaluar las posibles diferencias significativas se realizó una prueba T-Student ($p < 0.05$) para 2 variables independientes.

Con el paquete `car` de RStudio v4.2.3 (R Core Team, 2013) se realizaron las pruebas estadísticas para 3 grupos independientes (paramétricas y no paramétricas) Anova de 1 vía con Post-Hoc de Tukey/Kruskal-Wallis con Post-Hoc de Dunn con la corrección Benjamini-Hochberg o las pruebas para 2 grupos independientes Mann-Whitney ($p < 0.05$)/TStudent (paramétricas y no paramétricas) para determinar posibles diferencias significativas ($p < 0.05$) de los fila y géneros del análisis de las comunidades microbianas entre los caninos, felinos y caprinos tanto C. par+ como C. par-.

Las diferencias significativas entre los géneros bacterianos diferencialmente abundantes entre los caninos, felinos y caprinos C. par+ y C. par- se evaluaron con las pruebas de Kruskal-Wallis con Post-Hoc de Dunn con la corrección Benjamini-Hochberg y Anova de 1 vía con Post-Hoc Tukey mediante el paquete `car` de RStudio v4.2.3 (R Core Team, 2013).

3. Resultados

Frecuencias de detección en los animales evaluados

En el presente estudio se encontró la presencia ubicuita de *C. paraptrophicum* en animales de granja y animales domésticos, siendo esta mayor en caninos en comparación con felinos, rumiantes y porcinos. Específicamente, la frecuencia de detección global de las muestras *C. par+* fue del 8% ($n=24$). Se encontró que la frecuencia de detección *C. par+* en caninos fue del 30% ($n=12$), en felinos fue 6.5% ($n=8$), en caprinos fue 10% ($n=2$), en porcinos fue 2.5% ($n=1$) y en bovinos fue 2.5% ($n=1$). A pesar de que se evaluaron 40 ovinos ninguno fue *C. par+*. De las 24 muestras *C. par+*, el 46% ($n=11$) eran de animales en Bogotá, mientras que el 54% ($n=13$) eran de animales del departamento de Boyacá.

Análisis de los índices de diversidad

En los grupos *C. par+* y *C. par-* se obtuvieron los valores promedio de los índices de Shannon y Simpson, indicativos de la diversidad alfa de las comunidades bacterianas. En ambos grupos se observó una diversidad relativa baja (Shannon *C. par+* = 2.93, Simpson *C. par+* = 0.80; Shannon *C. par-* = 2.97, Simpson *C. par-* = 0.84) por la dominancia de pocos grupos taxonómicos en las muestras y la poca uniformidad de las comunidades bacterianas en la microbiota de los animales. Se determinó que no hay diferencias significativas entre los grupos *C. par+* y *C. par-* para ninguno de los índices de diversidad. Sin embargo, se puede observar que las *C. par-* tienen una tendencia a mayor diversidad en comparación con *C. par+*. Aunque, se puede observar una mayor distribución de los valores de los índices en las muestras *C. par+* que en *C. par-* (**Fig. 1**).

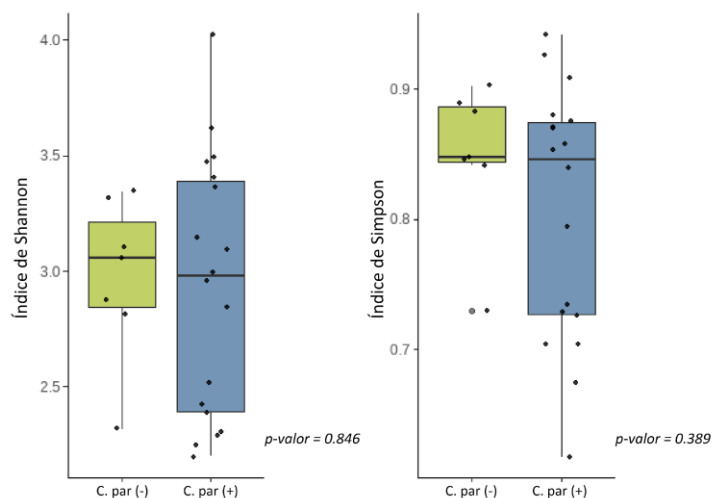


Figura 1. Índices de diversidad Shannon-Wiener y Simpson. No hubo diferencias significativas entre los índices puesto que el *p*-valor del índice de Shannon es de 0.846 y el *p*-valor del índice de Simpson es de 0.389 (**Tabla S3**).

Para el análisis de la diversidad beta, se evidenció en el PCA que los caninos y felinos se relacionan estrechamente en los componentes principales PC1 (23.1%) y PC2 (19.3%), lo cual significa que entre estos grupos hay correlaciones entre las abundancias relativas de los géneros bacterianos diferencialmente abundantes. No obstante, espacialmente el grupo caprinos se diferencia de estos animales domésticos y se puede evidenciar que está relacionado con *Alistipes*, *Escherichia-Shigella* y *Ruminococcaceae UCG-014*. Es importante recalcar que estos componentes principales en conjunto están reflejando la variación de la comunidad microbiana casi en un 50% (**Fig. 2**).

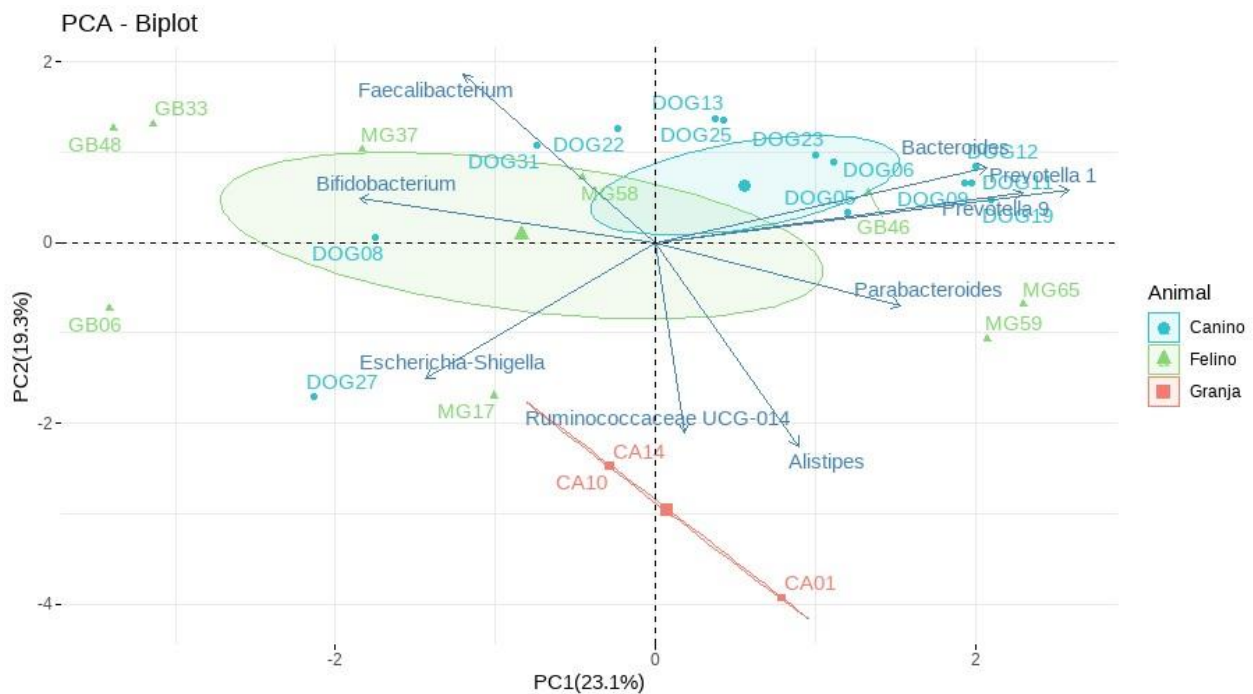


Figura 2. Análisis de componentes principales basado en los datos de la abundancia relativa de 9 géneros bacterianos diferencialmente abundantes, la distribución de las muestras independientes y la agrupación de estas muestras en caninos, felinos y caprinos.

Cambios en la composición de las comunidades bacterianas

El análisis de las abundancias relativas en los animales C. par+ y C. par- demostró que los filo predominantes fueron Proteobacteria, Bacteroidetes y Firmicutes en ambos grupos. No obstante,

en los C. par+ se observó una mayor abundancia de Proteobacteria y una menor abundancia de Bacteroidetes en comparación con los C. par-. En cuanto a los fila de menor abundancia relativa en ambos grupos, en los animales C. par- fue mayor la abundancia relativa de Actinobacteria y Tenericutes que en los animales C. par+ (**Fig. 3a**).

En caninos el filo Bacteroidetes es el más frecuente, estando presente en la mayoría de las muestras en una abundancia relativa entre el 39-77%, mientras que en los caprinos este filo tiene la menor abundancia relativa puesto que no supera el 24% en las muestras. En cambio, en caprinos el filo Firmicutes es uno de los más dominantes, a diferencia de los caninos cuya abundancia relativa se mantiene en un promedio de las muestras es del 20%. Se encontraron diferencias significativas del filo Firmicutes entre felinos y caninos C. par- ([Anova de 1 vía y Tukey $p=0.019$]) (**Tabla S3**), ya que en estos felinos la abundancia relativa de este filo es mayor que en estas muestras de caninos y, de hecho, su abundancia relativa en los felinos C. par- es mayor que la de Proteobacteria y Bacteroidetes.

Ahora bien, el filo Actinobacteria tiene una baja abundancia relativa en la totalidad de muestras, pero es mayor en felinos que en caninos y caprinos. El filo Tenericutes esta exclusivamente presente en caprinos y felinos, no obstante, en caprinos la abundancia relativa promedio de las muestras es del 4.5% y en felinos únicamente se encuentra en una muestra en un 9%. Se encontraron diferencias significativas filo Tenericutes entre caprinos y caninos C. par+ ([Kruskal Wallis y Dunn con la corrección Benjamini–Hochberg $p=0.039$]), ya que como se mencionó este filo no está presente en estos animales. Del mismo modo, en el filo Kiritimatiellaota se encontraron diferencias significativas entre caprinos/caninos ([Kruskal Wallis y Dunn con la corrección Benjamini–Hochberg $p=0.024$]) y caprinos/felinos ([Kruskal Wallis y Dunn con la corrección Benjamini–Hochberg $p=0.021$]) C. par+ (**Tabla S3**), esto pues es el único filo que esta exclusivamente presente en caprinos, cuya abundancia relativa es del 6% presente en la muestra C. par+ (**Fig. 3b**).

A continuación, se realizó un análisis del promedio de las abundancias relativas de los fila para cada animal C. par+ y C. par-. Con esto se evidencio que, en los caninos, felinos y caprinos C. par+ la abundancia relativa de Proteobacteria fue mayor que en los C. par-. En los caninos y caprinos C. par- la abundancia relativa de Bacteroidetes era mayor que en los caninos y caprinos C. par+. En los felinos C. par- la abundancia relativa de Firmicutes fue mayor que en los felinos C. par+, pero

en los caninos C. par+ el filo Firmicutes fue predominante en comparación con los caninos C. par-. En cuanto al filo Actinobacteria, a pesar de que no es predominante en los grupos de animales se encontró que la abundancia relativa de este fue mayor en los felinos C. par- en comparación con los felinos C. par+ y en los caninos C. par- en relación con los caninos C. par+ (**Fig. 3c**).

Además, se realizó la clasificación de los géneros presentes en la comunidad bacteriana de los caprinos, felinos y caninos. En donde, uno de los géneros predominantes en las muestras de los tres grupos de animales fue *Pseudohongiella*. En felinos C- par+, caninos C. par+ y caninos C. par- la abundancia relativa de *Prevotella 9* y *Prevotella 1* fue mayor en comparación con los demás animales. En caninos y felinos C. par+ y C. par- se encontró otro de los géneros predominantes, el cual fue *Faecalibacterium* cuya abundancia relativa fue variable a lo largo de las muestras, pero fue de hasta el 48% en un felino C. par+. Sin embargo, en caprinos la abundancia relativa de *Faecalibacterium* no fue mayor a un 1.5% en los C. par+ y C. par-. Los géneros *Bacteroides* y *Alloprevotella* también tuvieron una abundancia relativa menor en caprinos en comparación con los caninos y los felinos C. par+ y C. par-. En cambio, en los caprinos C. par+ el género con mayor abundancia relativa fue *Blautia*, mientras que en los C. par- el género predominante fue *Escherichia-Shigella* a diferencia de los caninos y felinos C. par+ y C. par-. Además, la abundancia relativa de *Ruminococcaceae UCG-14* fue mayor en felinos C. par- y en caprinos C. par+ y C. par- en comparación con los demás grupos de animales (**Fig. 3d**). Se encontraron diferencias significativas del género *Blautia* entre caprinos y felinos C. par- ([Kruskal Wallis y Dunn con la corrección Benjamini–Hochberg $p=0.023$])

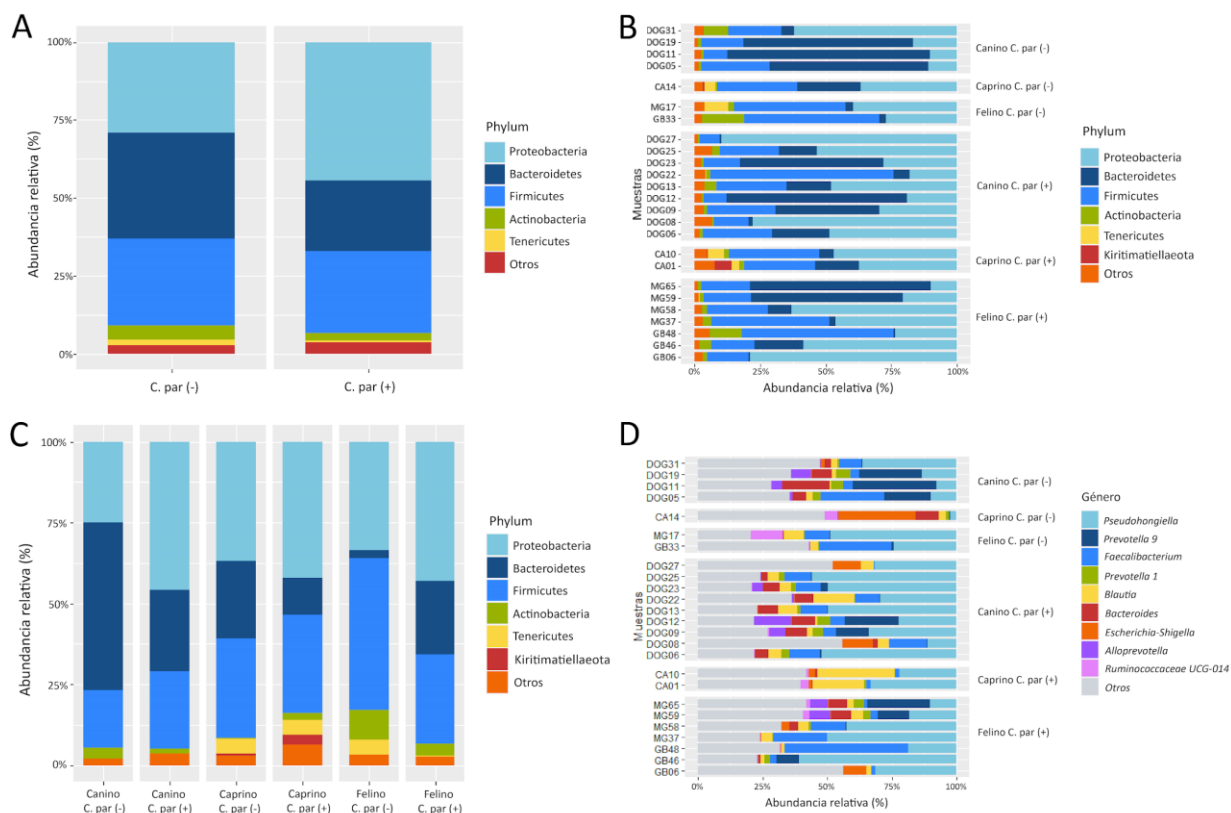


Figura 3. Abundancias relativas de los fila y géneros con mayor predominancia en las muestras. a.) Promedio de las abundancias relativas de los 5 fila con mayores abundancias relativas en las muestras totales C. par+ y C. par-. b.) Abundancias relativas de los 6 fila más abundantes en cada una de las muestras individuales. c.) Promedio de las abundancias relativas de los 6 fila con mayores abundancias relativas abundantes por cada grupo (Canino, Felino, Caprinos) C. par+ y C. par-. d.) Abundancias relativas de los 9 géneros más abundantes en cada una de las muestras individuales.

Identificación de los géneros bacterianos diferencialmente abundantes

La clasificación taxonómica de los géneros presentes en las muestras permitió identificar la presencia y la abundancia relativa de 9 potenciales géneros bacterianos diferencialmente abundantes, indicativos del estado de la microbiota por su rol de bacterias benéficas o potenciales patógenos (Vega *et al.*, 2021) (**Fig. 4**).

En caninos C. par+ la abundancia relativa de *Faecalibacterium*, *Bacteroides* y *Prevotella 1* fue mayor que en felinos y caprinos C. par+. En los caninos C. par- la abundancia relativa de *Prevotella 1* y *Prevotella 9* fue mayor que en felinos y caprinos C. par-. En los caninos C. par+ la abundancia

relativa de *Faecalibacterium* y *Bacteroides*, *Prevotella 9*, *Prevotella 1* y *Parabacteroides* fue mayor en los caninos C. par-.

Ahora bien, en felinos la abundancia relativa de *Faecalibacterium*, *Bifidobacterium* y *Ruminococcaceae UCG-14* fue mayor en felinos C. par- que en caninos y caprinos C. par-. En felinos C. par+ la abundancia relativa de *Bifidobacterium* fue mayor que los caninos y caprinos C. par+. No obstante, la abundancia relativa de *Faecalibacterium*, *Bifidobacterium* y *Ruminococcaceae UCG-* fue menor en los felinos C. par+ en comparación con los felinos C. par-, en cambio la abundancia relativa de *Escherichia-Shigella*, *Prevotella 1* y *Alistipes* fue mayor en los felinos C. par+ que en los felinos C. par-.

En cuanto a los caprinos C. par+ la abundancia relativa de *Alistipes*, *Escherichia-Shigella* y *Ruminococcaceae UCG-014* fue mayor que en caninos y felinos C. par+. En caprinos C. par- la abundancia relativa de *Bacteroides*, *Alistipes* y *Escherichia-Shigella* fue mayor que en caninos y felinos C. par-. Cabe resaltar que, la abundancia relativa de *Escherichia-Shigella*, *Bacteroides* y *Ruminococcaceae UCG-014* fue menor en los caprinos C. par+ que en los C. par-.

Además, en los animales C. par+ hubo una diferencia significativa de *Bifidobacterium* entre caninos y felinos ([Kruskal Wallis $p=0.022$], [Dunn con la corrección Benjamini–Hochberg $p=0.020$]). En los animales C. par- hubo una diferencia significativa de *Alistipes* entre caninos y caprinos ([Anova de 1 vía $p=0.007$], [Tukey $p=0.009$]), y felinos y caprinos ([Anova de 1 vía $p=0.007$], [Tukey $p=0.006$]) (**Tabla S3**).

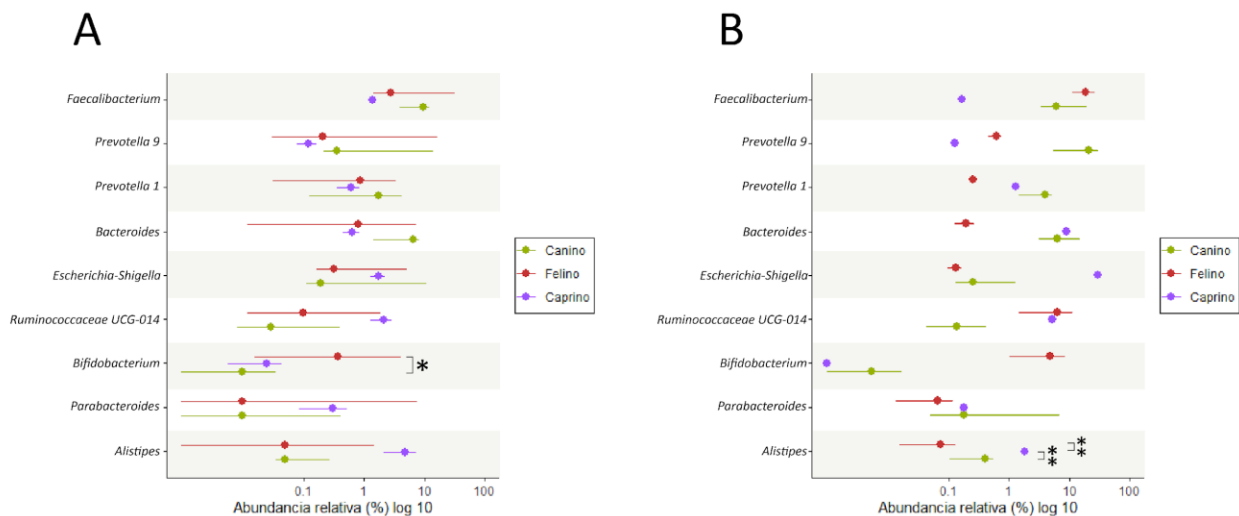


Figura 4. Abundancias relativas en escala logarítmica (log10). A) Abundancias relativas de 9 géneros bacterianos diferencialmente abundantes en las muestras de caninos, felinos y caprinos C. par+. B) Abundancias relativas de 9 géneros bacterianos diferencialmente abundantes en las muestras de caninos, felinos y caprinos C. par-.

Matriz de correlación

Las correlaciones negativas se determinaron al observar el aumento de la abundancia relativa de un género bacteriano diferencialmente abundante que se relaciona con la disminución de la abundancia relativa del otro género bacteriano diferencialmente abundante. En los animales C. par- hubo un incremento en las correlaciones negativas en comparación con los C- par+. En los animales C. par+ la mayoría de las correlaciones negativas estuvieron relacionadas entre *Escherichia-Shingella* y género bacteriano diferencialmente abundantes con potencial benéfico. En los animales C. par- las correlaciones negativas se dieron entre *Faecalibacterium* y *Bifidobacterium* con géneros bacterianos diferencialmente abundantes que pueden tener potencial patógeno o benéfico. En los animales C. par+ y C. par- hubo mayores correlaciones positivas, generalmente entre géneros bacterianos diferencialmente abundantes que se han reportado benéficas en la microbiota (**Fig. 5**).

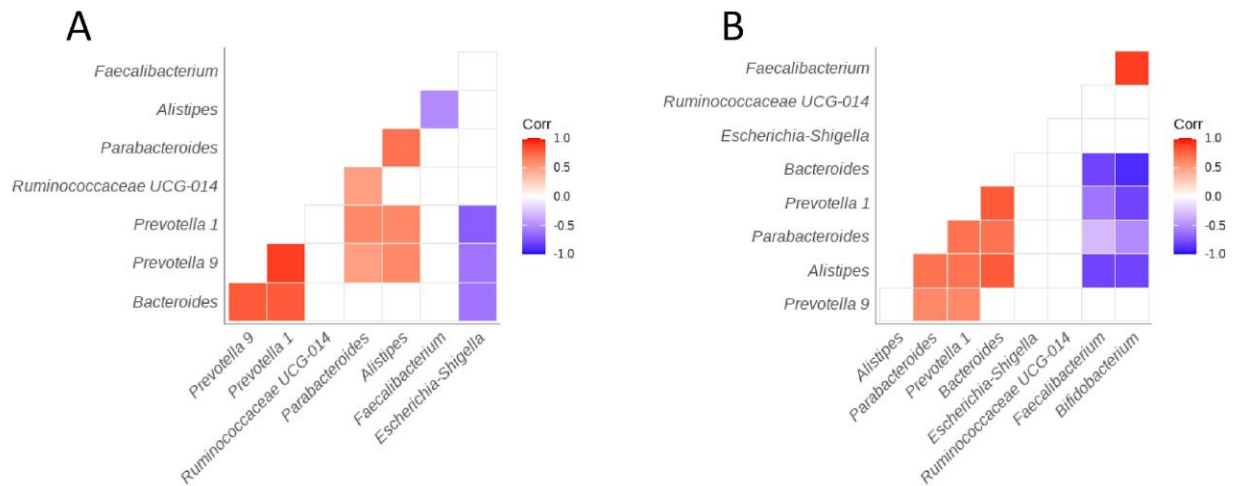


Figura 5. Correlación entre los géneros bacterianos diferencialmente abundantes. A) Matriz de correlaciones estadísticamente significativas ($p < 0.05$ [Spearman]) entre los géneros bacterianos diferencialmente abundantes de las muestras totales C. par+ B) Matriz de correlaciones estadísticamente significativas ($p < 0.05$ [Spearman]) entre las géneros bacterianos diferencialmente abundantes de las muestras totales C. par-.

4. Discusión

La frecuencia de detección en caninos y felinos fue mayor en comparación con caprinos, porcinos y bovinos. El 30% de los caninos y el 8% de los felinos fueron positivos para *C. paraputrificum*, cuyo crecimiento poblacional pudo favorecerse debido a que estos animales están expuestos a cambios en la dieta a alimentos con altas fuentes de proteína y las especies del género *Clostridium* utilizan los aminoácidos como sustrato para su metabolismo (Bermingham et al., 2017). Otro factor predisponente en una infección entérica por otros patógenos en estas muestras, ya que el hospedero puede estar inmunocomprometido (Silva & Lobato, 2015). Mientras que, en los caprinos, bovinos y porcinos la dieta puede afectar la colonización de bacterias Clostridiales puesto que los extractos enriquecidos de alcaloides y metabolitos secundarios de las plantas (ej. tatinos) poseen actividad antimicrobiana, antioxidante y antiinflamatoria que afectan la proliferación de algunos géneros bacterianos (Cipriano-Salazar et al., 2018; Dos Santos et al., 2013). En el caso particular de los rumiantes el crecimiento bacteriano se limita por la adaptación al entorno del retículo-rumen y el requerimiento de celulasas y hemicelulasas (Cholewińska et al., 2021), condiciones que posiblemente afectan el establecimiento de este Clostridial. Además, la abundancia de especies del género *Clostridium* en rumiantes disminuye en la adultez del animal por el desarrollo de las repuestas del sistema inmunológico (Nazki et al., 2017). Principalmente, la frecuencia de detección de esta bacteria en caninos y felinos tiene implicaciones importantes en términos de salud pública, ya que se desconocen las posibles vías de transmisión de este potencial patógeno y en general existe una tendencia a la exposición frecuente a los microorganismos de estos animales domésticos porque cohabitan en los mismos espacios que los humanos (Song et al., 2013).

A pesar de que no se encontraron diferencias estadísticas entre los índices de diversidad alfa de Shannon y Simpson, se observó un cambio en la distribución de los datos entre C. par+ y C. par-. En los animales C. par+ y C. par- la diversidad de especies fue baja porque se encontró una alta dominancia por pocos grupos taxonómicos en la microbiota y la comunidad bacteriana de los animales no demostró uniformidad. Sin embargo, la media de los índices en las muestras totales C. par- fue mayor que en las C. par+, lo que explica un aumento relativo en la diversidad de la composición microbiana en las muestras C. par-. En los animales C. par+ la distribución de los datos es mayor ya que son menos consistentes estos índices a lo largo de este grupo, así que hay una considerable variación de la diversidad y dominancia entre las diferentes muestras individuales

C. par+. La disminución en la diversidad relativa podría ser consecuencia de diversos factores, como modificaciones en la alimentación de los animales, uso de antibióticos o fármacos, alteraciones en la disponibilidad de nutrientes, o factores genéticos que se relacionen con desequilibrios en las comunidades microbianas o un estado de disbiosis que podría llegar a afectar la diversidad en la microbiota (Kriss *et al.*, 2018).

En el análisis de las abundancias relativas en los animales C. par+ y C. par- demostró la predominancia de Bacteroidetes y Firmicutes que corresponde con hallazgos previos reportados en la microbiota de caninos, felinos y caprinos sanos. Esto pues, el filo Bacteroidetes tiene bacterias productoras de acetato y propionato, mientras que el filo Firmicutes posee especies productoras de butirato (Duarte & Kim, 2022). En la microbiota es fundamental la producción de estos ácidos grasos de cadena corta ya que reducen el estrés oxidativo, modulan el sistema inmune, contribuyen con el crecimiento de las células del tejido intestinal y reducen la inflamación en caso de una infección (Bedford & Gong, 2017).

En rumiantes de vida silvestre y domésticos, la relación entre las abundancias relativas del filo Bacteroidetes y Firmicutes depende de la suplementación alimentaria y la capacidad digestiva de los individuos (Smoglica *et al.*, 2022). La predominancia de Bacteroidetes en rumiantes como los caprinos, se favorece por el consumo y la digestión de la fibra por las enzimas que degradan los N-glicanos vegetales (Cholewińska *et al.*, 2021). Por su parte, el filo Firmicutes es abundante en los animales que son alimentados con una alta proporción de granos. Sin embargo, el consumo excesivo de cereales y granos reduce la riqueza, diversidad y abundancia de la comunidad microbiana en el retículo-rumen. En los caprinos evaluados se logró evidenciar una mayor abundancia relativa de Firmicutes en relación con Bacteroidetes, lo cual puede ser resultado de los hábitos alimenticios mencionados y pudo influir en la diversidad de las comunidades bacterianas.

En general, en los animales C. par- las abundancias relativas de Firmicutes y Bacteroidetes fueron mayores que en los C. par+, lo cual se puede relacionar con un equilibrio en la microbiota por la producción de ácidos grasos de cadena corta que producen las especies de estos filo en los C. par-

En los animales C. par+ y C. par- demostró que uno de los filo predominantes fue Proteobacteria, sin embargo, hubo mayor abundancia relativa de Proteobacteria en los animales C. par+ en comparación con los animales C. par-. En caninos y felinos las Proteobacterias pueden estar

implicadas en la digestión de nutrientes y el metabolismo de aminoácidos y carbohidratos (Moon et al., 2018). En rumiantes, la principal función de las Proteobacterias es optimizar la degradación de la lignina y mantener las condiciones anaeróbicas del retículo-rumen por la reducción de oxígeno desde la sangre hasta el epitelio (Cholewińska et al., 2021; Smoglica et al., 2022). Sin embargo, algunas especies de este filo se pueden asociar con una disbiosis en la microbiota, lo cual puede relacionarse con el aumento de su abundancia relativa en los animales C. par+.

Aunque la presencia del filo Actinobacteria fue baja en todas las muestras, las mayores abundancias relativas se encontraron en felinos, particularmente en los C. par-. De hecho, *Bifidobacterium* y otros géneros de este filo son importantes para mantener el equilibrio de la microbiota y se consideran benéficos. Se ha demostrado que las proporciones de este filo aumentan en relación con otros filo con el consumo de dietas secas de tipo concentrado en felinos (Bermingham et al., 2013).

El filo Tenericutes está exclusivamente presente en caprinos y felinos, el rol de este filo puede ser comensal o patógeno obligado en la microbiota de animales, pero también se puede encontrar en diversos ambientes como fuentes de agua o suelo (Wang et al., 2020). Ahora bien, el filo Kiritimatiellaeota sólo se encontró en caprinos, cuyo papel en rumiantes no ha sido dilucidado, pero se sugiere que está en mayor abundancia en rumiantes con una alta producción de metano (Hagey et al., 2022).

Ahora bien, uno de los géneros predominantes en las muestras de los tres grupos de animales fue *Pseudohongiella*. Este género perteneciente al filo Proteobacterias ha sido aislado y caracterizado muy pocas veces, por lo que su relevancia y funciones biológicas no son claras. Sin embargo, es una bacteria ambiental que se encuentra en agua salina, fuentes de agua para la producción de alimentos (Surányi et al., 2023), en la rizosfera y en el suelo (Enright., 2022; Mo et al., 2023). Así que, se especula que pudo establecerse en la colecta de las muestras o puede que por ingestión en alimentos o fuentes hídricas sea un miembro de la microbiota en animales no descrito aún (Fig. 3).

En los caninos y felinos se reportó una mayor abundancia relativa de *Faecalibacterium* y *Bacteroides* en comparación con los caprinos. Estos dos géneros se consideran benéficos en las comunidades microbianas por la producción de metabolitos antiinflamatorios, la producción de butirato/ácido láctico, el enriquecimiento de la mucosa intestinal, la regulación del almacenamiento de grasas y la inducción de respuestas inmunes en los individuos en contra de patógenos (Chen et al., 2021; He et al., 2021). Además, en caninos y felinos hubo mayor abundancia de *Prevotella 1* y

Prevotella 9 en comparación con los caprinos. Se ha sugerido que este género en la microbiota se relaciona con la mejora del metabolismo de glucosa, pero puede actuar como proinflamatorio por la producción de enzimas que degradan la mucina y la producción de lipopolisacáridos (Lo Presti *et al.*, 2023).

En caprinos la abundancia relativa de *Blautia* fue mayor que en felinos y caninos. Las especies de este género pueden producir ácido butírico y ácido acético, ácidos grasos de cadena corta que promueven el metabolismo de la microbiota intestinal. Además, este género puede tener un potencial benéfico en estos rumiantes ya que permite la degradación de celulosa adquirida por la dieta a base de plantas (Liu *et al.*, 2021). Además, en caprinos hubo mayor abundancia relativa del género *Escherichia-Shigella* en comparación con los demás animales. Las bacterias de este género pueden ser especies comunes en la microbiota intestinal, no obstante, también pueden asociarse con un desequilibrio en la microbiota ya que se ha reportado que en algunos patotipos poseen factores de virulencia tales como la adhesión e invasión de las células del epitelio intestinal pueden alterar la composición microbiana e incluso causar enfermedad (Mukhopadhyaya *et al.*, 2012).

A partir del análisis de las abundancias relativas de los géneros presentes en las muestras se logró identificar los géneros diferencialmente abundantes. En los felinos C. par- se encontró una mayor abundancia de *Faecalibacterium*, *Bifidobacterium* y *Ruminococcaceae UCG-* en comparación con los felinos C. par+. En caninos C. par+ la abundancia de *Faecalibacterium* fue mayor entre los felinos y caprinos C. par+. De hecho, en caninos C. par+ fue mayor la abundancia relativa de bacterias consideradas benéficas en comparación con los caninos C. par-. La presencia de especies de este género puede inducir cambios en el equilibrio de la microbiota puesto que se consideran como potenciales probióticos (Machado *et al.*, 2022). En caprinos la abundancia relativa de *Alistipes*, *Escherichia-Shigella* y *Ruminococcaceae UCG-014* fue mayor que en caninos y felinos. El rol de *Alistipes* en la microbiota depende de los fenotipos clínicos y del modelo animal, ya que puede actuar como co-inductor en la modulación de patologías, como simbiote o como candidato a probiótico (Parker *et al.*, 2020). Las bacterias *Ruminococcaceae UCG-014* pueden producir ácidos grasos de cadena corta importantes en el metabolismo de estos animales y facilita la digestión de la fibra vegetal en el rumen mediante la producción de enzimas para degradar la celulosa y hemicelulosa (Pacífico *et al.*, 2021). En felinos y caninos C. par+ la abundancia relativa de *Escherichia-Shigella* fue mayor en comparación con los felinos y caninos C. par-, pero no es

claro si las especies de este género pueden llegar a causar un estado de disbiosis en la microbiota de estos animales. En general, estas agrupaciones entre los géneros diferencialmente abundantes y los grupos de animales se pudieron evidenciar en el PCA, en donde los caninos y los felinos tenían abundancias relativas similares de estos géneros, principalmente de mayores en bacterias con potencial benéfico en comparación con los caprinos.

En los animales C. par+ la mayoría de las correlaciones negativas estuvieron relacionadas entre *Escherichia-Shigella* y géneros bacterianos diferencialmente abundantes con potencial benéfico. Puede que la abundancia relativa de las bacterias con potencial patógeno y las bacterias con potencial benéfico tenga esta relación inversa por la producción de metabolitos o ácidos grasos de cadena corta que inhiben el crecimiento poblacional entre sí. Por su parte, en los animales C. par- las correlaciones negativas se dieron entre *Faecalibacterium* y *Bifidobacterium* con géneros bacterianos diferencialmente abundantes que pueden tener potencial patógeno o benéfico. Esto pues, en el hospedero pueden variar las abundancias relativas de grupos taxonómicos por los cambios en la actividad proinflamatoria/antiinflamatoria o la inducción de respuestas inmunes según la bacteria. Además, los factores dietarios pueden alterar el equilibrio de la composición de la comunidad microbiana, favoreciendo el crecimiento poblacional de un grupo taxonómico.

Por otra parte, las correlaciones positivas en C. par+ y C. par- fueron entre géneros bacterianos diferencialmente abundantes con potencial benéfico, esto puede ser posible debido a un aumento en conjunto de la abundancia relativa de estos géneros por una respuesta similar a las condiciones favorables en la microbiota por los factores ambientales/fisiológicos y/o por las actividades metabólicas complementarias y probióticas que favorecen la proliferación de estos géneros bacterianos diferencialmente abundantes (Stanley et al., 2016).

Las limitaciones de este estudio surgen por la escasa información que se tiene de los individuos evaluados. Aunque aparentemente los animales estaban en buenas condiciones de salud se desconoce la masa corporal, la dieta, sistema de crianza, la edad, el uso de antibióticos u otros medicamentos que pueda afectar la microbiota intestinal (metadata). Además, la exclusión de algunas muestras por las pocas lecturas obtenidas durante la secuenciación y luego de la normalización de los datos afectó el análisis de las comunidades bacterianas, principalmente en la comparación de las muestras de animales de granja C. par+ y C. par-. Otra limitación fue el tamaño

muestral de los animales C.par+ y C.par- ya que se seleccionaron con una relación 2:1, por lo que en futuros estudios se debería estandarizar el mismo tamaño entre las poblaciones en ambos grupos.

Este fue el primer reporte de la frecuencia de detección de *C. paraptrophicum* en caninos, felinos, caprinos, bovinos y porcinos en Colombia, cuya presencia en el intestino de animales era desconocida hasta el momento. Además, se identificaron cambios de la composición de comunidades microbianas y géneros bacterianos diferencialmente abundantes en los grupos C. par+ y C. par-. A partir de estos resultados, se debe profundizar el estudio de esta especie para dilucidar las vías de transmisión, el posible proceso de infección y las implicaciones en la salud pública, ecológicas y a nivel productivo agropecuario. En el futuro, es necesario incluir un mayor tamaño muestral y la información de la metadata para ampliar el panorama de la posible modulación de la composición de la comunidad microbiana por parte de este microorganismo.

5. Agradecimientos

Agradezco al Grupo de Investigaciones Microbiológicas de la Universidad del Rosario (GIMUR) por ofrecer las instalaciones y acompañamiento necesarios para el desarrollo del presente estudio.

6. Tablas suplementarias

Muestra	Número de lecturas	Calidad
GB06	349,139.0	16.4
GB46	280,577.0	16.4
GB48	170,701.0	15.9
MG58	482,830.0	15.4
MG37	223,907.0	16.6
MG59	321,942.0	15.3
MG65	191,501.0	15.0
DOG06	164,527.0	16.1
DOG08	94,689.0	16.5
DOG09	179,683.0	15.7
DOG12	269,642.0	15.5
DOG13	59,050.0	16.4
DOG22	175,983.0	17.1
DOG23	44,312.0	16.5
DOG25	87,662.0	17.2
DOG27	78,418.0	17.2
CA01	156,553.0	16.7
CA10	96,299.0	15.8
DOG31	92,174.0	16.3
DOG05	194,015.0	15.9
DOG19	121,653.0	15.8

DOG11	144,425.0	16.1
CA14	18,470.0	14.6
MG17	41,600.0	15.4
GB33	29,991.0	16.2

Tabla Suplementaria 1. Número de lecturas obtenidas y calidad de las muestras luego de la secuenciación por la plataforma MinION (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, United Kingdom).

Muestras	Animal	Departamento/Ciudad	Lugar	PCR C. par
GB06	Felino	Boyacá		Positiva
GB46	Felino	Boyacá		Positiva
GB48	Felino	Boyacá		Positiva
MG37	Felino	Bogotá		Positiva
MG58	Felino	Bogotá		Positiva
MG59	Felino	Bogotá		Positiva
MG65	Felino	Bogotá		Positiva
DOG06T	Canino	Boyacá	Fundación Duitama	Positiva
DOG08T	Canino	Boyacá	Fundación Duitama	Positiva
DOG12T	Canino	Boyacá	Fundación Duitama	Positiva
DOG13T	Canino	Boyacá	Fundación Duitama	Positiva
DOG22T	Canino	Boyacá	Fundación Duitama	Positiva
DOG23T	Canino	Boyacá	Fundación Duitama	Positiva
DOG25T	Canino	Boyacá		Positiva
DOG27T	Canino	Boyacá		Positiva
CA01	Caprino	Boyacá	Soata	Positiva
CA10	Caprino	Boyacá	Soata	Positiva
DOG31	Canino	Bogotá		Negativa
DOG05	Canino	Boyacá	Fundación Duitama	Negativa
DOG19	Canino	Bogotá		Negativa
DOG11	Canino	Boyacá	Fundación Duitama	Negativa
CA14	Caprino	Boyacá	Soata	Negativa
MG17	Felino	Bogotá		Negativa
GB33	Felino	Boyacá		Negativa

Tabla Suplementaria 2. Metadata de las muestras de animales caninos, felinos y caprinos C. par+ y C.par- utilizadas para el análisis de las comunidades microbianas.

Grupo	Prueba estadística	p-valor	Post-Hoc
Índice de diversidad de Shannon-Wiener	T-Student	$p\text{-valor} = 0.846$ $t = 0.195$	
Índice de diversidad de Simpson	U de Mann-Whitney	$p\text{-valor} = 0.389$ $W = 78$	
Diferencias significativas entre los Phylum al comparar los caninos-felinos-caprinos C. par+	Krustal Wallis y prueba de Dunn con la corrección Benjamini-Hochberg	<i>Tenericutes</i> $p\text{-valor} = 0.042$ $chi\text{-squared} = 6.296$ $df = 2$	Canino – Caprino $p\text{-valor} = 0.039$
		<i>Kiritimatiellaeota</i> $p\text{-valor} = 0.025$ $chi\text{-squared} = 7.326$ $df = 2$	Canino – Caprino $p\text{-valor} = 0.024$ Caprino – Felino $p\text{-valor} = 0.021$
Diferencias significativas entre los Phylum al comparar los caninos-felinos-caprinos C. par-	Anova de 1 vía y Tukey	<i>Firmicutes</i> $p\text{-valor} = 0.022$ $df = 2$	Felino – Canino $p\text{-valor} = 0.019$
Diferencias significativas entre los géneros de los animales C. par-	Krustal Wallis y prueba de Dunn con la corrección Benjamini-Hochberg	<i>Blautia</i> $p\text{-valor} = 0.023$ $chi\text{-squared} = 7.478$ $df = 2$	Caprino – Felino $p\text{-valor} = 0.0239$
Diferencias significativas entre los géneros bacterianos diferencialmente abundantes de los animales C. par+	Krustal Wallis y prueba de Dunn con la corrección Benjamini-Hochberg	<i>Bifidobacterium</i> $p\text{-valor} = 0.022$ $chi\text{-squared} = 7.624$ $df = 2$	Canino – Felino $p\text{-valor} = 0.020$
Diferencias significativas entre los géneros bacterianos diferencialmente abundantes de los animales C. par-	Anova de 1 vía y Tukey	<i>Alistipes</i> $p\text{-valor} = 0.007$ $df = 2$	Caprino – Canino $p\text{-valor} = 0.009$ Felino-Caprino $p\text{-valor} = 0.006$

Tabla Suplementaria 3. Análisis estadísticos realizados para determinar los valores de los índices de diversidad y las diferencias significativas de los fila y los géneros bacterianos diferencialmente abundantes en las muestras.

Referencias

- Al-Dujaili, A., Deragisch, F., Hagiescu, A., & Wong, W. F. (2012). Guppy: A GPU- like soft-core processor. In 2012 International Conference on Field-Programmable Technology (pp. 57-60). IEEE.
- Bedford, A., Yu, H., Squires, E. J., Leeson, S., & Gong, J. (2017). Effects of supplementation level and feeding schedule of butyrate glycerides on the growth performance and carcass composition of broiler chickens. *Poultry science*, 96(9), 3221-3228.
- Beloshapka, A. N., Dowd, S. E., Suchodolski, J. S., Steiner, J. M., Duclos, L., & Swanson, K. S. (2013). Fecal microbial communities of healthy adult dogs fed raw meat-based diets with or without inulin or yeast cell wall extracts as assessed by 454 pyrosequencing. *FEMS microbiology ecology*, 84(3), 532-541.

- Bermingham, E. N., Maclean, P., Thomas, D. G., Cave, N. J., & Young, W. J. P. (2017). Key bacterial families (Clostridiaceae, Erysipelotrichaceae and Bacteroidaceae) are related to the digestion of protein and energy in dogs. 5, e3019.
- Bermingham, E. N., Young, W., Kittelmann, S., Kerr, K. R., Swanson, K. S., Roy, N. C., & Thomas, D. G. (2013). Dietary format alters fecal bacterial populations in the domestic cat (*Felis catus*). *Microbiologyopen*, 2(1), 173-181.
- Breitwieser FP, Salzberg SL. 2020. Pavian: interactive analysis of metagenomics data for microbiome studies and pathogen identification. *Bioinformatics* 36:1303–1304.
- Camargo, A., Guerrero-Araya, E., Castañeda, S., Vega, L., Cardenas-Alvarez, M. X., Rodríguez, C., ... & Muñoz, M. (2022). Intra-species diversity of *Clostridium perfringens*: A diverse genetic repertoire reveals its pathogenic potential. *Frontiers in Microbiology*, 2699.
- Chen, J., Chen, X., & Ho, C. L. (2021). Recent development of probiotic *Bifidobacteria* for treating human diseases. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 1371.
- Cholewińska, P., Górnjak, W., & Wojnarowski, K. J. B. v. r. (2021). Impact of selected environmental factors on microbiome of the digestive tract of ruminants. 17(1), 1-10.
- Cipriano-Salazar, M., Rojas-Hernández, S., Olivares-Pérez, J., Jiménez-Guillén, R., Cruz-Lagunas, B., Camacho-Díaz, L. M., & Ugbogu, A. E. (2018). Antibacterial activities of tannic acid against isolated ruminal bacteria from sheep. *Microbial pathogenesis*, 117, 255-258.
- Ciuro, J., Little, T., Hiner, E., & Vakhariya, C. (2021). *Clostridium paraputrificum*: an atypical and rare case of septic arthritis mimicking an acute sickle cell crisis. *IDCases*, 23, e01031.
- Cobos, M. A., & Yokoyama, M. T. (1995). *Clostridium paraputrificum* var. *Ruminantium*: Colonisation and degradation of shrimp carapaces. In *Workshop on Rumen Ecology Research Planning*, Addis Ababa (Ethiopia), 13-18 Mar 1995. ILRI.
- De Coster W, D’Hert S, Schultz DT, Cruts M, Van Broeckhoven C. (2018). NanoPack: Visualizing and processing long-read sequencing data. *Bioinformatics*; 34(15):2666.
- Dos Santos, E. T., Pereira, M. L. A., Da Silva, C. F. P., Souza-Neta, L. C., Geris, R., Martins, D., ... & Batista, R. (2013). Antibacterial activity of the alkaloid-enriched extract

from *Prosopis juliflora* pods and its influence on in vitro ruminal digestion. International journal of molecular sciences, 14(4), 8496-8516.

- Dos Santos, H. R. M., Argolo, C. S., Argôlo-Filho, R. C., & Loguercio, L. L. (2019). A 16S rDNA PCR-based theoretical to actual delta approach on culturable mock communities revealed severe losses of diversity information. BMC microbiology, 19(1), 1-14.
- Dozmorov, M. G., Cara, L. R., Giles, C. B., & Wren, J. D. (2012). Genome runner: automating genome exploration. Bioinformatics, 28(3), 419-420.
- Duarte, M. E., & Kim, S. W. J. A. N. (2022). Intestinal microbiota and its interaction to intestinal health in nursery pigs. 8, 169-184.
- Enright, A. M. (2022). Microbiome analysis of landfill leachate samples sourced from Powerstown landfill Co. Carlow.
- F. O. (2012). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. Nucleic acids research, 41(D1), D590-D596.
- Fedor, P., & Zvaríková, M. (2019). Biodiversity indices. Encycl. Ecol, 2, 337-346.
- Hagey, J. V., Laabs, M., Maga, E. A., & DePeters, E. J. (2022). Rumen sampling methods bias bacterial communities observed. PLoS One, 17(5), e0258176.
- He, X., Zhao, S., & Li, Y. (2021). *Faecalibacterium prausnitzii*: A next-generation probiotic in gut disease improvement. Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology, 2021, 1-10.
- Huang, Z., Pan, Z., Yang, R., Bi, Y., & Xiong, X. J. G. M. (2020). The canine gastrointestinal microbiota: early studies and research frontiers. 11(4), 635-654.
- Jain, M., Olsen, H. E., Paten, B., & Akeson, M. (2016). The Oxford Nanopore MinION: delivery of nanopore sequencing to the genomics community. Genome biology, 17, 1-11.
- Kikuchi, E., Miyamoto, Y., Narushima, S., & Itoh, K. (2002). Design of Species-specific primers to identify 13 species of *Clostridium* harbored in human intestinal tracts. Microbiology and immunology, 46(5), 353-358.
- Kiu, R., Caim, S., Alcon-Giner, C., Belteki, G., Clarke, P., Pickard, D., ... & Hall, L.J. (2017). Preterm infant-associated *Clostridium tertium*, *Clostridium cadaveris*, and *Clostridium paraputrificum* strains: genomic and evolutionary insights. Genome Biology and Evolution, 9(10), 2707-2714.

- Kraimi, N., Dawkins, M., Gebhardt-Henrich, S. G., Velge, P., Rychlik, I., Volf, J., ... & Leterrier, C. (2019). Influence of the microbiota-gut-brain axis on behavior and welfare in farm animals: A review. *Physiology & behavior*, 210, 112658.
- Kriss, M., Hazleton, K. Z., Nusbacher, N. M., Martin, C. G., & Lozupone, C. A. (2018). Low diversity gut microbiota dysbiosis: drivers, functional implications and recovery. *Current opinion in microbiology*, 44, 34-40.
- Kumar, A., & Chordia, N. (2015). In silico PCR primer designing and validation. *PCR primer design*, 143-151.
- Lee, W.-J., & Hase, K. (2014). Gut microbiota-generated metabolites in animal health and disease. *Nature Chemical Biology*, 10(6), 416–424. doi:10.1038/nchembio.1535
- Levesque, C. L., Hooda, S., Swanson, K. S., & De Lange, K. (2014). Alterations in ileal mucosa bacteria related to diet complexity and growth performance in young pigs. *PLoS One*, 9(9), e108472.
- Li, H., Zhao, L., & Zhang, M. (2021). Gut microbial SNPs induced by high-fiber diet dominate nutrition metabolism and environmental adaption of *Faecalibacterium prausnitzii* in obese children. *Frontiers in Microbiology*, 12, 683714.
- Liu, X., Mao, B., Gu, J., Wu, J., Cui, S., Wang, G., ... & Chen, W. (2021). Blautia—a new functional genus with potential probiotic properties?. *Gut microbes*, 13(1), 1875796.
- Lo Presti, A., Del Chierico, F., Altomare, A., Zorzi, F., Monteleone, G., Putignani, L., ... & Ciccozzi, M. (2023). Phylogenetic analysis of *Prevotella copri* from fecal and mucosal microbiota of IBS and IBD patients. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 16, 17562848221136328.
- Lorenz, T. C. (2012). Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (63), e3998.
- Lu, J., Rincon, N., Wood, D. E., Breitwieser, F. P., Pockrandt, C., Langmead, B., ... & Steinegger, M. (2022). Metagenome analysis using the Kraken software suite. *Nature protocols*, 17(12), 2815-2839.
- Machado, D., Barbosa, J. C., Domingos, M., Almeida, D., Andrade, J. C., Freitas, A. C., & Gomes, A. M. (2022). Revealing antimicrobial resistance profile of the novel probiotic candidate *Faecalibacterium prausnitzii* DSM 17677. *International Journal of Food Microbiology*, 363, 109501.

- Mamuad, L. L., Seo, B. J., Al Faruk, M. S., Espiritu, H. M., Jin, S. J., Kim, W.-I., ... Cho, Y.-I. (2020). *Treponema spp.*, the dominant pathogen in the lesion of bovine digital dermatitis and its characterization in dairy cattle. *Veterinary Microbiology*, 108696. doi:10.1016/j.vetmic.2020.108696
- Mo, X., Song, Y., Chen, F., You, C., Li, D., & Liu, F. (2023). Replacement of plant communities altered soil bacterial diversity and structure rather than the function in similar habitats of the Yellow River Delta, China. *Ecological Indicators*, 146, 109793.
- Moon, C. D., Young, W., Maclean, P. H., Cookson, A. L., & Bermingham, E. N. (2018). Metagenomic insights into the roles of Proteobacteria in the gastrointestinal microbiomes of healthy dogs and cats. *Microbiology open*, 7(5), e00677.
- Mostel, Z., Hernandez, A., & Tatem, L. (2022). *Clostridium paraputrificum* bacteremia in a patient with presumptive complicated appendicitis: A case report. *IDCases*, 27, e01361.
- Mukhopadhyaya, I., Hansen, R., El-Omar, E. M., & Hold, G. L. (2012). IBD—what role do Proteobacteria play? *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 9(4), 219–230. doi:10.1038/nrgastro.2012.14
- Muñoz, M., Restrepo-Montoya, D., Kumar, N., Iraola, G., Herrera, G., Ríos- Chaparro, D. I., ... & Ramírez, J. D. (2019). Comparative genomics identifies potential virulence factors in *Clostridium tertium* and *C. paraputrificum*. *Virulence*, 10(1), 657-676.
- Nazki, S., Wani, S. A., Parveen, R., Ahangar, S. A., Kashoo, Z. A., Hamid, S., . . . Dar, P. A. J. V. W. (2017). Isolation, molecular characterization and prevalence of *Clostridium perfringens* in sheep and goats of Kashmir Himalayas, India. 10(12), 1501.
- Pacífico, C., Petri, R. M., Ricci, S., Mickdam, E., Wetzels, S. U., Neubauer, V., & Zebeli, Q. (2021). Unveiling the bovine epimural microbiota composition and putative function. *Microorganisms*, 9(2), 342.
- Parker, B. J., Wearsch, P. A., Veloo, A. C., & Rodriguez-Palacios, A. (2020). The genus *Alistipes*: gut bacteria with emerging implications to inflammation, cancer, and mental health. *Frontiers in immunology*, 11, 906.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., ... & Glöckner,
- R Core Team, R. (2013). R: A language and environment for statistical computing.
- Shinha, T., & Hadi, C. (2015). *Clostridium paraputrificum* bacteremia associated with colonic necrosis in a patient with AIDS. *Case Reports in Infectious Diseases*, 2015.

- Silva, R. O. S., & Lobato, F. C. F. (2015). *Clostridium perfringens*: A review of enteric diseases in dogs, cats and wild animals. *Anaerobe*, 33, 14-17.
- Smoglica, C., Angelucci, S., Farooq, M., Antonucci, A., Marsilio, F., & Di Francesco, C. E. (2022). Microbial community and antimicrobial resistance in fecal samples from wild and domestic ruminants in Maiella National Park, Italy. *One Health*, 15, 100403.
- Song, S. J., Lauber, C., Costello, E. K., Lozupone, C. A., Humphrey, G., Berg-Lyons, D., . . . Nakielny, S. J. e. (2013). Cohabiting family members share microbiota with one another and with their dogs. 2, e00458.
- Stanley, D., Hughes, R. J., Geier, M. S., & Moore, R. J. (2016). Bacteria within the gastrointestinal tract microbiota correlated with improved growth and feed conversion: challenges presented for the identification of performance enhancing probiotic bacteria. *Frontiers in microbiology*, 7, 187.
- Surányi, BB, Zwirzitz, B., Mohácsi-Farkas, C., Engelhardt, T. y Domig, KJ (2023). Comparación de la eficacia de MALDI-TOF MS y técnicas de identificación basadas en secuenciación (Sanger y NGS) para monitorear la comunidad microbiana del agua de riego. *Microorganismos*, 11 (2), 287. MDPI AG. Obtenido de <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms11020287>
- Vega, L., Herrera, G., Muñoz, M., Patarroyo, M. A., Maloney, J. G., Santín, M., & Ramírez, J. D. (2021). Gut microbiota profiles in diarrheic patients with co-occurrence of *Clostridioides difficile* and *Blastocystis*. *PLoS One*, 16(3), e0248185.
- Waligora-Dupriet, A. J., Dugay, A., Auzeil, N., Huerre, M., & Butel, M. J. (2005). Evidence for clostridial implication in necrotizing enterocolitis through bacterial fermentation in a gnotobiotic quail model. *Pediatric research*, 58(4), 629-635.
- Wang, Y., Huang, J. M., Zhou, Y. L., Almeida, A., Finn, R. D., Danchin, A., & He, L. S. (2020). Phylogenomics of expanding uncultured environmental Tenericutes provides insights into their pathogenicity and evolutionary relationship with Bacilli. *BMC genomics*, 21, 1-12.
- Weiss S, Xu ZZ, Peddada S, Amir A, Bittinger K, Gonzalez A, et al. Normalization and microbial differential abundance strategies depend upon data characteristics. *Microbiome* [Internet]. 2017 Mar 3 [cited 2023 Mar 8];5(1):1–18.

- Yue, S., Li, Z., Hu, F., & Picimbon, J. F. (2020). Curing piglets from diarrhea and preparation of a healthy microbiome with *Bacillus* treatment for industrial animal breeding. *Scientific reports*, 10(1), 19476.