



...ncipios del presente
...conjuntó los objetivos
...las Asociaciones de Médicos y
...Veterinarios Americanas.

salud pública
y medio ambiente



Este concepto se imbrica en la colaboración que debe existir entre muy diferentes profesionales de diversos ámbitos para conseguir un buen estado sanitario de nuestras comunidades. La especie humana, las especies animales y el medio ambiente, interrelacionando entre sí, hacen que biólogos, médicos, veterinarios, naturalistas, ecólogos, etc..., debemos trabajar todos juntos para solventar las amenazas sanitarias que nos rodean.

Y no solo debemos hablar del concepto de microorganismos como generadores de enfermedades, bien humanas bien animales, sino también en su papel de portadores de mecanismos de resistencia antibiótica mediante elementos móviles y traspasables entre bacterias, incluso de diferentes especies. Esto hace que una bacteria saprofitas, viviendo en la naturaleza, pueda transmitir esa característica a una especie patógena con la que conviva, y que se convierta así en una clara amenaza para la salud pública.

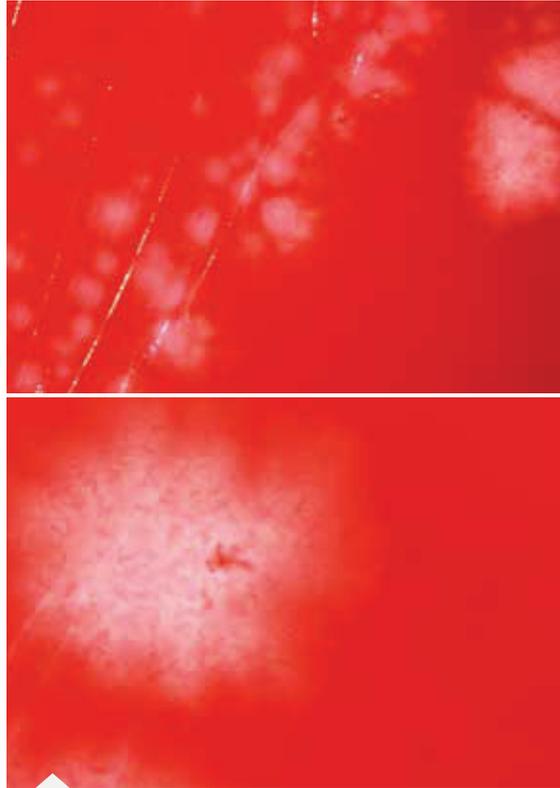


Se ha realizado también un estudio longitudinal en el que se analizaron 160 muestras fecales de porcino de raza ibérica.



Clostridium difficile es un bacilo grampositivo, esporulado y anaerobio estricto. Fue descrito por primera vez por Hall y O'Toole en 1935 bajo la denominación de *Bacillus difficilis*, en referencia a la dificultad que supone su aislamiento y cultivo, motivado, entre otras razones, por su lento crecimiento. Hasta 1978 no se asoció con ninguna patología, siendo entonces considerado responsable de la colitis pseudomembranosa humana asociada al consumo de antibióticos.

C. difficile es una bacteria de distribución ubicua en el ambiente, reconocido como un importante patógeno emergente tanto en el ser humano como en los animales. En humanos se considera actualmente la causa más importante de diarreas hospitalarias y de infecciones asociadas al consumo de antibióticos. En los últimos años se ha descrito un aumento en su incidencia, que puede estar asociado a la aparición de importantes brotes de transmisión nosocomial que afectan no sólo a las poblaciones tradicionalmente implicadas (ancianos, trasplantados e inmunodeprimidos) sino también a niños y pacientes en contacto con la asistencia sanitaria. Además, en los últimos años se ha reconocido también la importancia que *C. difficile* puede tener en la diarrea fuera del ambiente hospitalario (origen comunitario). Se estima que anualmente se producen casi 8.000 episodios de infecciones por *C. difficile* en España (incidencia de 17,1 episodios/año/10.000 altas hospitalarias) con un gasto anual para el Sistema Nacional de Salud de más de 32 millones de euros. En Europa se producen más de 125.000 infecciones al año, con al menos



Colonias de *C. difficile* creciendo sobre Agar Sangre con cicloserina y cefoxitina (Agar CLO).



Estudio de sensibilidad antibiótica de *C. difficile* frente a Metronidazol - Rifampicina (arriba) y Teicoplanina - Daptomicina (abajo) mediante el método E-test.

6.000 muertes. En Estados Unidos se cifran en más de 336.000 los casos anuales, con más de 14.000 muertes y un coste total de 5.000 millones de dólares.

También en medicina veterinaria se ha incrementado notablemente en los últimos años, la importancia atribuida a *C. difficile*, lo cual se debe tanto al papel de los animales como reservorio de este patógeno emergente y las consiguientes implicaciones zoonóticas que podrían derivarse de ello, como a la acción patógena del microorganismo sobre diferentes especies, principalmente équidos y ganado porcino. No obstante, en animales no parece tan clara la relación entre consumo de antibióticos e infección como sí sucede en medicina humana. De hecho, se han sugerido otros factores como desencadenantes de la infección por *C. difficile*, como pueda ser la dieta, condiciones ambientales, estrés y alteración de la microbiota intestinal por la acción de otros patógenos.

Los principales mecanismos de patogenicidad de *C. difficile* vienen derivados de su capacidad de síntesis de toxinas, dos principales, denominadas A (enterotoxina) y B (citotoxina), las cuales están codificadas en un locus de patogenicidad (PaLoc). Además, algunas cepas producen una tercera toxina denominada toxina binaria, también conocida como *C. difficile* transferasa (CDT), que presenta dos componentes y está codificada en una región del cromosoma bacteriano que se localiza fuera del PaLoc.

El estudio de la epidemiología molecular de *C. difficile* se basa actualmente en el ribotipado, que permite agrupar determinadas



cepas en genotipos considerados hipervirulentos, como pueden ser los ribotipos 027 y 078, que son los responsables principales de los brotes acaecidos a principios del presente siglo en medicina humana. Como veremos más adelante, el ribotipo 078 tiene una gran prevalencia en nuestro país en aislados animales, siendo además uno de los más frecuentes en medicina humana (casi el 20% de los aislados, según recientes estudios multicéntricos realizados a nivel nacional).

Dentro del campo de la veterinaria, resulta destacable la importancia creciente de *C. difficile* como agente causante de diarreas neonatales porcinas, siendo considerado en Estados Unidos como causa principal conjuntamente con *Escherichia coli* y *Clostridium perfringens*. Lo mismo sucede en Europa, donde *C. difficile* está desplazando a otros patógenos tradicionales. En el caso del perro, en

cambio, existen datos contradictorios sobre la posible asociación entre el aislamiento de *C. difficile* y la situación de diarrea, o entre el estatus toxigénico de las cepas y la ocurrencia de alguna sintomatología. Algo similar ocurre en ganado bovino, donde en algunos estudios incluso se ha encontrado una mayor prevalencia de *C. difficile* en animales no diarreicos que en animales diarreicos.

En nuestro laboratorio llevamos más de 10 años trabajando en esta bacteria, con su descripción en diferentes especies animales. Así, realizamos el que fue primer estudio en Europa comparando grupos de animales no diarreicos y diarreicos, con el análisis de 780 muestras fecales de lechones criados en régimen intensivo distribuidos en dos grupos de edad: recién nacidos (menos de una semana) y entre 1-2 meses de edad. En este segundo grupo, no se aisló *C. difficile* de ninguna de las 239

Dentro del campo de la veterinaria, resulta destacable la importancia creciente de *C. difficile* como agente causante de diarreas neonatales porcinas, siendo considerado en Estados Unidos como causa principal conjuntamente con *Escherichia coli* y *Clostridium perfringens*.

muestras analizadas. En cambio, el microorganismo se aisló de 140 muestras de las 541 obtenidas de recién nacidos (25,9%), incluyendo tanto animales diarreicos como no diarreicos. En 132 de los 140 aislados se detectaron los genes de producción de las toxinas A, B y binaria (A+B+CDT+), pertenecientes todos ellos al ribotipo hipervirulento 078. Siete de los aislados resultaron ser no toxigénicos (A-B-CDT-), y un aislado presentó el perfil A-B+CDT-. Además, 13 de los aislados fueron he-

terorresistentes a metronidazol, lo que supone un claro riesgo al ser el primer antibiótico de elección en medicina humana para tratar las infecciones por *C. difficile*. La heterorresistencia consiste en la aparición de subpoblaciones resistentes a un antibiótico, en este caso metronidazol, en el seno de una cepa considerada como sensible. Este fenómeno puede visualizarse en el método del Etest tras realizar una incubación prolongada (entre 5 y 7 días) de la placa con la tira de metronidazol y evaluar la posible aparición de colonias bacterianas de crecimiento lento dentro de un primer halo de inhibición, y en la zona donde se consideraría al fenotipo como resistente.



Arriba: kit para identificación de *C. difficile* y capacidad de producción de Toxinas (sin diferenciación del tipo A o B).

Abajo: Siembra de *C. difficile* sobre Agar Brucella para realización de estudios de sensibilidad antibiótica.



También tuvimos ocasión de realizar un estudio longitudinal en el que se analizaron 160 muestras fecales de porcino de raza ibérico, procedentes de cuatro lechones de cinco diferentes camadas (es decir, un total de 20 animales) a los que se sometía a muestreo semanal hasta los 57 días de vida. Del 90% de los lechones se aisló *C. difficile* en algún momento de la experiencia, con una prevalencia total sobre las muestras analizadas de un 25,6%. La mayoría de las muestras positivas (75,6%) procedían de animales de menos de 15 días de edad, si bien obtuvimos positivos hasta los 50 días de edad. Ningún animal presentó diarrea durante el periodo de muestreo y a ninguno le fue aplicado en ese periodo ningún tratamiento antibiótico. Todos los aislados pertenecieron al ribotipo 078, y por tanto con capacidad de síntesis de las 3 principales toxinas: A, B y CDT. Cuatro de los aislados resultaron ser heterorresistentes a metronidazol.

Como hemos indicado anteriormente, el perro no se considera susceptible a la infección por *C. difficile*, si bien existen diferentes opiniones al respecto. Lo que sí está claro es que esta mascota tan cercana a nosotros, puede ser portador de ribotipos hipervirulentos de la bacteria, que puedan desencadenar en un momento dado un problema en las personas que conviven con el animal. Es por ello que realizamos un estudio longitudinal, tomando muestras periódicas de cachorros de diferentes camadas. En dos de las camadas, *C. difficile* fue aislado de todos los cachorros en alguno de los muestreos efectuados. En la tercera camada esto solo sucedió en dos de los seis animales testados. Todos los aislamientos se produjeron en cachorros de menos de 35 días de

edad. Además, una de las madres tuvo dos muestras positivas a lo largo del muestreo. En este caso se obtuvieron solo dos aislados del ribotipo hipervirulento 078, siendo los predominantes los ribotipos 056 y 010. El ribotipo 056 presenta el perfil toxigénico A+B+CDT-, habiendo sido descrito como responsable de distintos brotes en medicina humana, tanto en España como en otros países de Europa. Por su parte, el ribotipo 010 se considera generalmente sin importancia patogénica al ser no toxigénico (A-B-CDT-). Resulta curioso que de algún cachorro fueron aislados dos ribotipos diferentes en distintos muestreos, lo que podría resultar indicativo de una infección policlonal. Sólo se detectó una cepa heterorresistente al metronidazol, perteneciente al ribotipo 078.

Finalmente, hemos realizado un muestreo en animales de zoo. Se analizaron un total de 200 muestras de 40 especies animales, si bien el 36,5% de las mismas procedían de cebras (fundamentalmente debido al creciente interés existente en el estudio de la importancia de *C. difficile* en patología equina y de especies animales cercanas). *C. difficile* fue aislado de siete muestras (3,5% del total), procedentes de las siguientes especies animales: chimpancé, cabra enana y cabra hispánica (una muestra positiva cada una), y cebras (cuatro muestras positivas procedentes de tres individuos diferentes). Cuatro de los siete aislados pertenecían al ribotipo hipervirulento 078 (A+B+CDT+). Uno de estos aislados mostró una resistencia inicial al metronidazol, característica que perdió como consecuencia de subcultivos en medios no selectivos.