



MEMORIA DEL TRABAJO DE FINAL DE MÁSTER

TÍTULO:

**PREVALENCIA DE *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* Y OTRAS
ENTEROBACTERIAS ZONÓTICAS EN FAUNA SALVAJE DE
CATALUÑA.**

MÁSTER UNIVERSITARIO EN ZONOSIS Y UNA SOLA SALUD

CURSO 2016-2017

AUTORA: ALBA CASADO GONZÁLEZ

DIRECTORA: LAILA DARWICH SOLIVA

EN BELLATERRA, SEPTIEMBRE DE 2017

MEMORIA DEL TRABAJO DE FINAL DE MÁSTER

TÍTULO:

PREVALENCIA DE *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* Y OTRAS ENTEROBACTERIAS ZONÓTICAS EN FAUNA SALVAJE DE CATALUÑA.

MÁSTER UNIVERSITARIO EN ZONOSIS Y UNA SOLA SALUD

CURSO 2016-2017

AUTORA: ALBA CASADO GONZÁLEZ

DIRECTORA: LAILA DARWICH SOLIVA

EN BELLATERRA, SEPTIEMBRE DE 2017

Autora.

Directora.

ÍNDICE

1. Resumen	1
2. Introducción	2
2.1. Zoonosis en el contexto One Health	2
2.2. Patógenos entéricos en la fauna salvaje	3
2.3. <i>Clostridium difficile</i>	4
2.3.1. Características generales	5
2.3.2. Patogenicidad	6
2.3.3. Relevancia de la infección	7
2.3.3.1. Relevancia en la salud pública	7
2.3.3.2. Relevancia en sanidad animal	9
2.3.3.3. Relevancia en la fauna salvaje	10
3. Justificación y objetivos	11
4. Materiales y Métodos	12
4.1. Diseño del estudio	12
4.2. Diagnóstico microbiológico	12
4.3. Diagnóstico microbiológico selectivo para <i>Clostridium difficile</i>	13
4.4. Diagnóstico molecular	13
4.5. Pruebas de sensibilidad antimicrobiana	15
5. Resultados	16
5.1. Diagnóstico microbiológico	16
5.2. Prevalencia de <i>Clostridium difficile</i>	17
5.3. Perfil de sensibilidad antimicrobiana	18
6. Discusión	22
7. Conclusiones	28
8. Bibliografía	29

1. RESUMEN

Clostridium difficile es un importante patógeno bacteriano en el ser humano y en algunas especies animales, donde puede causar problemas en la salud significativos. Sin embargo, el papel de la fauna salvaje como reservorio de este y otros agentes microbianos multirresistentes a los antibióticos, no está definido. La fauna salvaje podría tener un rol clave en la diseminación y transmisión de bacterias potencialmente zoonóticas en el medio ambiente. Los objetivos de este trabajo son: establecer la presencia de *C. difficile* en la fauna salvaje de Cataluña, determinar la presencia de otras enterobacterias patógenas multirresistentes a los antimicrobianos en la fauna salvaje, e identificar las especies salvajes que pueden actuar como diseminadoras de estas cepas en el medio ambiente. A partir de muestras fecales de diferentes especies salvajes se realizó un diagnóstico microbiológico y pruebas de sensibilidad antimicrobiana para determinar la presencia enterobacterias multirresistentes. Paralelamente se realizó el análisis microbiológico y molecular para el aislamiento de *C. difficile* en las mismas muestras. Se obtuvieron aislados puros de diferentes microorganismos zoonóticos siendo *Escherichia coli* el patógeno aislado más común (61,3%). Tan sólo en el estudio molecular por PCR para *C. difficile* se detectaron dos resultados positivos (1,2%): un gavián común positivo a la toxina A y una gaviota reidora positiva a la toxina B. Las cepas sometidas a pruebas de sensibilidad antimicrobiana correspondieron a *E. coli* (12/14) y *K. pneumoniae* (2/14). Fueron aisladas principalmente de erizos europeos (2,5%) y jabalíes (1,3%) y, el 85,7% de ellas, presentó un perfil de resistencia múltiple, a tres o más antimicrobianos. La detección de *C. difficile* y otras enterobacterias multirresistentes a los antimicrobianos con potencial zoonótico en la fauna salvaje, pone en relieve el rol que estas especies desempeñan en la diseminación de los patógenos entre los ecosistemas humano, animal y ambiental, poniendo en riesgo la salud pública desde un punto de vista "One Health".

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Zoonosis en el contexto One Health

En los últimos años, la creciente aparición de nuevas enfermedades infecciosas en el ámbito sanitario tanto humano como animal (VIH, Ébola, Influenza A o el síndrome respiratorio agudo severo (SARS)), han puesto en alerta a las autoridades sanitarias a nivel mundial (WHO, 2006).

Desafortunadamente, la mayoría de los esfuerzos de investigación se han centrado tradicionalmente en abordar enfermedades infecciosas que repercuten en el ser humano o en especies económicamente relevantes como los animales de compañía o de producción y poco se ha tenido en cuenta el papel de la fauna salvaje en la epidemiología de estas enfermedades (Cunningham, Daszak, & Wood, 2017).

Las nuevas investigaciones han reflejado que muchas de las amenazas actuales tienen su origen en la fauna salvaje: Ébola y Marburg virus, Nipah virus, *Borrelia burgdorferi*, West Nile virus, el síndrome respiratorio del Medio Oriente (MERS) y otros (Cunningham et al., 2017). Gracias a ello, se ha puesto en relieve la importancia de conocer como interaccionan las diferentes interfaces humana, animal y ambiental con la fauna salvaje en particular, para así determinar el papel que ésta juega en la epidemiología de las enfermedades de origen zoonótico (Cunningham et al., 2017).

De la misma manera, algunas zoonosis de origen humano o de los animales domésticos pueden causar enfermedad en hospedadores de vida silvestre (Cunningham et al., 2017). Estas pueden ser responsables de la regulación de poblaciones silvestres o incluso de la extinción de ciertas especies (Cunningham & Daszak, 1998). Conocer cuáles son los patógenos que les afectan o de los que son portadores, puede ayudar a la conservación y bienestar de estas especies (Johnson & Thielges, 2010).

Desde hace un tiempo, la interacción entre la población humana, la fauna salvaje y la fauna doméstica se ha ido haciendo cada vez más frecuente y estrecha, probablemente por causas multifactoriales que tienen que ver con cambios ecológicos, demográficos y socioeconómicos (Soler-Tovar, Hernández-rodriíguez, Pabón, Isabel, & Morales, 2013). La convergencia de hábitats potencia la diseminación de microorganismos zoonóticos (virus, bacterias multirresistentes y parásitos) entre los diferentes ecosistemas

subrayando la necesidad de abordar estos temas desde un punto de vista interdisciplinar, en el contexto de One Health o Una sola salud (Daszak, Cunningham, & Alex, 2000).

2.2 Patógenos entéricos en la fauna salvaje

La flora intestinal normal está compuesta por bacterias gram-positivas en su mayoría. Cuando se compromete el estado inmunitario del individuo, las especies gram negativas o los hongos pueden multiplicarse en exceso, o bien las bacterias entéricas saprófitas pueden volverse patógenas. Este proceso puede afectar tanto a los animales como a las personas (Vidal, Baldomà, Molina-López, Martin, & Darwich, 2017).

De esta manera, una amplia gama de patógenos procedentes de los animales silvestres son diseminados al medio ambiente por excreción fecal u otras rutas. Algunos de ellos, producen enfermedades graves en el ser humano (*Salmonella spp*, *Campylobacter coli*, o *E. coli O157*), y otros actúan como patógenos oportunistas (*K. pneumoniae*, *S. aureus*, *C. perfringens*...) (García-Migura et al., 2012; Molina-Lopez et al., 2011; Molina-López, Vidal, Obón, Martín, & Darwich, 2015; Vidal et al., 2017). Un ejemplo de posible transmisión zoonótica de origen silvestre son los brotes de salmonelosis en el ser humano asociados al contacto directo con reptiles como tortugas y otros (Chomel, Belotto, & Meslin, 2007). En Estados Unidos se han descrito en el año 2014, 166 casos de salmonelosis en pacientes asociados al contacto con dragones barbudos capturados de hábitats naturales por el tráfico ilegal, según datos del Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) (CDC, 2014).

Otra de las preocupaciones emergentes respecto a la salud pública es la adquisición de resistencias frente a los antimicrobianos de uso convencional en medicina humana y veterinaria. Los animales salvajes en contacto con fuentes antropogénicas de antibióticos pueden convertirse en reservorios de bacterias multirresistentes (MDR) (Osterblad, Norrdahl, Korpimaki, & Huovinen, 2001). También puede ocurrir que los animales salvajes no tengan contacto directo con ambientes contaminados con antimicrobianos o bacterias MDR, pero que la transmisión genética horizontal de estos genes resistentes a otras bacterias haya contribuido a la expansión de las resistencias a diferentes nichos ecológicos (O'Brien, 2002). De hecho, la transmisión interespecie de bacterias MDR ha sido demostrada en una cepa de *E. coli ST410* entre aves salvajes, individuos humanos, un perro y el medio ambiente (Schaufler et al., 2016).

Existe otro patógeno entérico con un relevante perfil MDR: *Clostridium difficile* (CD). Se trata de una de las bacterias nosocomiales emergentes más importantes en el mundo con un gran impacto en la salud pública y cada vez más en el sector porcino. Ha sido aislada tanto en personas, como en animales domésticos y salvajes y otras fuentes ambientales. Sin embargo, los factores asociados a su ecología no están del todo claros y el rol que desempeña la fauna salvaje sigue por esclarecerse (Alderete, 2011).

2.3 *Clostridium difficile*

Clostridium difficile (CD) es una de las bacterias nosocomiales emergentes más importantes para salud pública en Europa y en Norte América (Davies et al., 2014). Esta bacteria es considerada la mayor causa de diarrea nosocomial asociada al uso de antibióticos en países industrializados. Los síntomas en humanos y en algunos animales puede ocasionar desde una leve diarrea hasta colitis pseudomembranosa y fallecimiento por megacolon tóxico (Alderete, 2011).

En la última década, se ha reportado un incremento de la incidencia y la severidad de CD en el ser humano atribuido al surgimiento de nuevas cepas hipervirulentas (Moono et al., 2016).

Según datos del CDC en Estados Unidos, CD es responsable de la infección de 250.000 pacientes y de aproximadamente 14.000 muertes anuales (CDC, 2012). Aunque inicialmente los brotes estaban restringidos a EE. UU y Canadá, el patógeno se ha distribuido en todo el mundo. Según un estudio llevado a cabo en 2011 por la ECDC (Centro europeo de prevención y control de enfermedades), la incidencia en Europa es de 4,1 por cada 10.000 pacientes (Bauer et al., 2011). Esto supone un impacto económico de alrededor de 3000 millones de euros anuales en Europa y un gasto de entre 8.911\$ y 30.049\$ por paciente hospitalizado en Estados Unidos (Rodriguez et al., 2016)

Tradicionalmente, la infección por *Clostridium difficile* (CDI) estaba confinada prácticamente a ambientes hospitalarios. Sin embargo, se han incrementado la frecuencia y la intensidad de brotes comunitarios, es decir, en la población sana no hospitalizada (Eyre et al., 2013).

C. difficile también ha sido aislado en animales domésticos, en alimentos, en suelos y en agua (Saif & Brazier, 1996). Curiosamente muchos de los ribotipos hallados son

idénticos a los encontrados en humanos (Debast et al., 2009). Existe una gran preocupación por la posibilidad de que animales de producción puedan servir como reservorio de cepas epidémicas para las personas, pero se desconoce si realmente existe el riesgo de transmisión zoonótica (Avbersek et al., 2009).

Debido al potencial emergente de CD como patógeno asociado a la comunidad y su importancia como causante de enfermedad (Eyre et al., 2013), hace necesario examinar otras posibles fuentes de infección. La fauna salvaje podría tener un papel clave en este aspecto.

2.3.1 Características generales

Clostridium difficile es un bacilo gram positivo, anaerobio estricto, resistente a múltiples antibióticos, y puede habitar el tracto intestinal del hombre y de otros animales (Alderete, 2011).

Las colonias de CD en agar sangre tienen un diámetro de 2-5 mm, siendo circulares o rizoides, entre planas y poco convexas, de color grisáceo y superficie mate o algo satinada, y no hemolíticas (Hafiz & Oakley, 1976) (Figura 1).



Figura 1. Aspecto de las colonias de CD en medio selectivo (imagen propia).

Sus células vegetativas son capaces de formar esporas que pueden persistir en el ambiente largos periodos de tiempo, haciendo más fácil su transmisión (Roberts et al., 2008). Según Kramer (2006), las esporas pueden sobrevivir aproximadamente 5 meses en superficies contaminadas (Kramer, Schwebke, & Kampf, 2006). Resisten el calentamiento, la deshidratación y muchos agentes químicos, incluyendo los desinfectantes. El único compuesto químico capaz de eliminar las esporas son el hipoclorito de sodio y el peróxido de hidrógeno (Hacek, Ogle, Fisher, Robicsek, & Peterson, 2010).

2.3.2 Patogenicidad

La ruta de contagio es feco-oral, a través de la ingestión de esporas excretadas por las heces de individuos infectados, enfermos o portadores asintomáticos. Existen alrededor de 400 cepas diferentes de CD, de las cuales, sólo aquellas con capacidad para producir toxinas (cepas toxigénicas) son capaces de producir enfermedad y por tanto las relevantes para la salud pública (Keessen, Gaastra, & Lipman, 2011).

Para producir enfermedad se necesitan tres factores clave:

- La ingestión de esporas de CD y la persistencia de CD en el tracto intestinal.
- La proliferación de CD y la producción de toxinas en el intestino que dañan la pared.
- Un huésped inmunológicamente susceptible con una flora intestinal alterada o desequilibrada (disbiosis) (Rodríguez-Palacios, Borgmann, Kline, & LeJeune, 2013).

Puede cursar de manera asintomática en un 3% de adultos sanos, y hasta en el 80% de los neonatos. Los elementos más comunes que provocan disrupción en la flora intestinal son los antibióticos, aunque también se sospecha de los inhibidores de la bomba de protones. Otros factores asociados a la infección son la susceptibilidad del huésped, la virulencia de la cepa y el espectro del antimicrobiano (Alderete, 2011).

Las cepas toxigénicas de CD producen principalmente dos exotoxinas: TcdA y TcdB codificadas por los genes *tcdA* y *tcdB*. Presentan una estructura funcional y una secuencia de aminoácidos muy parecida, diferenciándose únicamente en los receptores celulares (Alderete, 2011).

TcdA ha sido descrita como una enterotoxina por causar colitis exudativa. TcdB es citotóxica y causa el colapso de las células epiteliales, apoptosis y muerte celular. Ambas pueden actuar independientemente, al contrario de como se pensaba hasta ahora. Las diferentes especies animales varían en el tipo de receptores de toxinas presentes en el intestino (Keel & Songer, 2006), pero esto no se correlaciona con la gravedad de la enfermedad. Todos los estudios realizados para conocer cómo actúan las toxinas están basados en modelos animales, y por ahora, la única diferencia hallada entre ellas es que la TcdA ha causado acumulación de fluidos en varios modelos animales mientras que la TcdB no (Borriello, 1998). No todas las cepas toxigénicas de CD producen las dos toxinas. (Keessen et al., 2011).

La toxina binaria o CDT, descrita por Popoff en 1988 (Popoff, Rubin, Gill, & Boquet, 1988), es una toxina adicional que sintetizan ciertas cepas de *CD* como la cepa epidémica NAP1/ribotipo 027 y particularmente cepas asociadas al ganado (Moono et al., 2016). CDT está formada por dos subunidades, ambas imprescindibles para ejercer el efecto tóxico, CDTa y CDTb y esta codificada por los genes *cdtA* y *cdtB*. Aquellas cepas que sintetizan la CDT no tienen por qué sintetizar también la toxina A y la toxina B, por lo que esta toxina es un factor de virulencia adicional (Keessen et al., 2011).

2.3.3 Relevancia de la infección por Clostridium difficile

2.3.3.1 Salud pública

La infección por *CD* representa a nivel mundial un 25% de los casos de diarrea asociada al uso prolongado de antibióticos (Walk & Young, 2008). Los países que llevan a cabo planes de vigilancia reflejan un aumento de la incidencia desde principios de siglo que se ha atribuido a la aparición de nuevas cepas: 001, 017, 027 y 078 (Rupnik, 2007).

Los más trascendentes son el ribotipo 027 y el 078. Ambos presentan los tres tipos de toxinas. El ribotipo 027 es el más relacionado con el incremento de la mortalidad en personas (un 400% más desde el año 2000 hasta el 2007 en Estados Unidos según datos del CDC (CDC, 2014). Se ha descrito también en animales domésticos y en alimentos y produce 16 veces más toxina A y 23 veces más toxina B que las cepas toxigénicas que habían sido descritas hasta el momento (Debast et al., 2009). El ribotipo 078 es uno de los más prevalentes en los episodios de infección por *CD* tanto en humanos como en cerdos (Bauer et al., 2011).

En el ser humano, el principal modo de transmisión de *CD* son las manos de personal hospitalario que actúan como vectores mecánicos. De hecho, la estancia en hospitales se considera un factor de riesgo para contraer la enfermedad. Otros factores de riesgo son la exposición a antimicrobianos, enfermedades del colon, procesos quirúrgicos abdominales, una inadecuada respuesta inmunitaria y la edad (mayores de 65 años). Aunque este grupo de pacientes sigue siendo el más afectado, junto con el de enfermeras que trabajan a domicilio (Kyne, Warny, Qamar, & Kelly, 2000), están aumentando los casos entre adultos jóvenes y embarazadas y en niños mayores de 2 años (Rodríguez-Palacios et al., 2013). No obstante, la idea de infección nosocomial

podría estar quedando obsoleta. Según un estudio llevado a cabo en 2013, tan solo el 35% de las infecciones estudiadas guardaban relación con un caso anterior del mismo hospital, lo que sugiere que las infecciones comunitarias son más frecuentes de lo que se creía (Eyre et al., 2013).

La incidencia de Diarrea Asociada a CD (CDAD) en España es de 41,2 por cada 100.000 alta, similar a la estimación de incidencia europea (Soler, Nogareda, & Cano, 2008). Sin embargo, otro estudio muestra una incidencia de 12,2 por cada 10.000 pacientes (Asensio et al., 2008). Esta diferencia de rangos podría deberse a diagnósticos erróneos hasta en 40.000 pacientes anuales en Europa (Davies et al., 2014).

La preocupación por la emergencia de cepas virulentas de CD viene ligada también al desarrollo de MDR a los antimicrobianos. El patógeno se encuentra en la lista elaborada por el CDC de las 18 principales amenazas resistentes a los medicamentos, en la categoría de urgente, el nivel más alto de preocupación (CDC, 2013). Presenta genes que le infieren una resistencia natural a muchos antibióticos. Sólo la Vancomicina, el Metronidazol y la Fidaxomicina han sido aprobados para el tratamiento de las infecciones de CD (Alderete, 2011). Por desgracia, las nuevas cepas emergentes, muestran perfiles MDR. Álvarez Pérez (2014) relata el hallazgo de una cepa procedente de un potro de cebra de un zoo de Madrid resistente al metronidazol (Alvarez-Perez et al., 2014).

2.3.3.2 Salud animal

CD se ha encontrado en un amplio número de hospedadores, mamíferos la mayoría (Keessen et al., 2011).

En el sector ganadero, se considera una patología emergente que va ganando importancia, especialmente en el porcino. Desde el año 2000, la enfermedad asociada a CD (CDAD) se ha convertido en la causa más diagnosticada de diarreas neonatales de lechones en las áreas de mayor producción porcina de los Estados Unidos (Songer, 2004). Afecta sobre todo a lechones entre 1-7 días de vida (Moono et al., 2016). A diferencia de lo que ocurre en humana, los tratamientos antibióticos no se han asociado como un factor de riesgo de la enfermedad (Arruda et al., 2013).

Otros animales en las que también se ha descrito CD son perros con una prevalencia de hasta un 40%, gatos y caballos, rumiantes (22,9% en heces de terneros diarreicos positivos a cepa toxigénica) y aves de granja (29%) (Keessen et al., 2011). Excepto en el caballo, se desconoce si CD es causa de enfermedad en estas especies y por el

momento no se ha relacionado con el uso de antimicrobianos (Salf & Brazier, 1996). En general, la prevalencia es mayor en jóvenes (en caballos también en adultos) (Keessen et al., 2011), y aunque hay estudios que muestran aislamientos en animales que presentan diarrea muchos animales son asintomáticos, en el caso de los neonatos probablemente debido a inmunidad calostrada adquirida (Moono et al., 2016). Los ribotipos aislados en los animales coinciden en muchas ocasiones con los hallados en pacientes humanos, lo que propone a los animales como reservorios potenciales de CD (Debast et al., 2009).

La carne de venta al público, los productos cárnicos y las canales también han sido objeto de estudio. Se han aislado cepas en carne de cerdo, vacuno y pollo. Los ribotipos más prevalentes detectados en carne son el 078 y el 027 en Norte América y las canales de animales más jóvenes son las que reportan más aislados. Sin embargo, no existe ningún caso reportado de CDI transmitida por alimentos (Keessen et al., 2011).

2.3.3.3 Fauna salvaje

Los estudios en la fauna salvaje son escasos. La mayor parte de los estudios realizados que encontramos se centran en animales salvajes cercanos a núcleos urbanos o a granjas. Estos se refieren a los considerados como plagas: ratas, ratones, mapaches o musarañas y aves como palomas y gorriones (Andres-Lasheras et al., 2017; Himsworth et al., 2014; Jardine, Reid-Smith, Rousseau, & Weese, 2013). En el resto de trabajos en los que se aísla este microorganismo en animales salvajes, las muestras procedían de cebra, chimpancé, cabra pirenaica, elefantes, focas, nutrias de mar, coatíes y otros. Todos vinculados a ambientes antropogénicos como zoológicos o parques urbanos (Alvarez-Perez et al., 2014; Anderson et al., 2015; Bojesen, Olsen, & Bertelsen, 2006; Miller et al., 2010; Silva et al., 2014). De esta manera, se ha propuesto que la fauna salvaje en contacto estrecho con animales de renta y con el ser humano podría actuar como reservorio de CD y dado el potencial zoonótico de transmisión, esto supondría un riesgo para la salud global.

Los estudios en fauna salvaje en libertad con mínimo contacto con el ser humano y su actividad son muy eventuales. La primera referencia que existe es la de un artículo que aísla *CD* del intestino de un león marino en el año 1960 (McBee, 1960). Sin embargo, más de medio siglo después, no han aparecido demasiados estudios nuevos y aún queda mucho por esclarecer. Así, son necesarias investigaciones más profundas determinar el rol de la fauna salvaje en la ecología de este patógeno.

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

En este estudio se ha evaluado la presencia de enteropatógenos en muestras recogidas de animales salvajes procedentes de un centro de recuperación de fauna salvaje en la provincia de Barcelona, España. Se trata de animales de vida libre sin relación previa conocida con el ser humano que llegan al centro por motivos de diversa índole. La relevancia del estudio radica en la ausencia de investigaciones similares conocidas hasta el momento respecto a *CD*. Sólo se conocen dos estudios parecidos que evalúen la presencia del agente en animales salvajes. El primero, en animales del Parque Nacional de Doñana (España) (n=10) y el segundo, en aves passeriformes migratorias en Eslovenia (n=465). Ambos reportan una prevalencia cero (Alderete, 2011; Bandelj et al., 2011). Dadas las similitudes entre nuestro estudio y los anteriores respecto a los animales muestreados y a la metodología, el resultado que se espera encontrar es el de una prevalencia semejante, negativa o muy baja de *CD*.

También se desarrolla paralelamente el estudio microbiológico de las muestras y un estudio de susceptibilidad antimicrobiana, con el fin de establecer la presencia de agentes entéricos potencialmente causantes de enfermedad. Existe un estudio retrospectivo de muestras microbiológicas en rapaces procedentes del mismo centro de recuperación. Destacan unos resultados mayoritarios para *E. coli* (Vidal et al., 2017). Por esta razón, se espera encontrar una alta prevalencia de este patógeno en aves. Para el resto de especies bacterianas, se esperan prevalencias y perfiles de resistencia variables.

Los objetivos del estudio son:

- Establecer la prevalencia de cepas toxigénicas de *C. difficile* (*tcdA* y *tcdB*) en la fauna salvaje de Cataluña.
- Determinar la presencia de otras enterobacterias patógenas con potencial zoonótico en la fauna salvaje de Cataluña y su perfil de resistencia antimicrobiana.
- Identificar las especies de animales salvajes que pueden actuar de reservorios de cepas toxigénicas de *C. difficile* y enterobacterias zoonóticas MDR y actuar de diseminadores de estas cepas al medio ambiente.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Diseño del estudio

Se realiza un estudio longitudinal descriptivo a partir de muestras procedentes de animales salvajes ingresados en el Centro de Recuperación de Fauna Salvaje de Torreferrusa (CRF-TF), situado en Santa Perpètua de Mogoda, en la comarca del Vallés Oriental, Barcelona (España), dependiente del “Departament d’Agricultura, Pesca, Alimnectació i Medi Natural” de la “Generalitat de Catalunya”.

La obtención de muestras ha dependido de la aleatoriedad de entrada al CRF-TF en el periodo comprendido entre noviembre de 2016 y mayo de 2017. La recolección de muestras se realizó el mismo día de ingreso. Ninguno de los animales fue tratado con agentes antimicrobianos antes del muestreo.

Los animales salvajes incluidos en el estudio pertenecen a diferentes especies de mamíferos (14), réptiles (4) y aves (47). Se recogieron muestras cloacales o anales, mediante hisopos estériles. Cuando fue posible, se recogieron muestras de heces e intestino en tubos eppendorf. En un periodo de 24-48 horas todas las muestras eran recibidas y procesadas en los laboratorios del departamento de Sanidad y Anatomía Animal de la Universidad Autónoma de Barcelona.

4.2 Análisis microbiológico

Se realizó el cultivo microbiológico de 237 muestras. El protocolo seguido se detalla a continuación:

- 1) Se realizó la siembra de los hisopos o de parte de la muestra en los siguientes medios de cultivo: Agar Sangre (*DIFCO*), Agar MacConkey (*Oxoid*) y medio selectivo XLT4 para *Salmonella spp* (*DIFCO*); seguidamente se cultivaron en aerobiosis a 37°C durante 24 horas. Las muestras se conservaron a -80°C para posteriores diagnósticos. En el caso de los hisopos se conservaron en una solución tampón fosfato salino. Una vez transcurrido ese tiempo, se procedió a evaluar el crecimiento.
- 2) Aquellos cultivos microbiológicos con crecimiento puro (un único agente bacteriano en la muestra), o mixtos (dos o más bacterias se aislaron en la misma muestra) con una población homogénea mayoritaria en la placa (70%) se sembraron en un medio no selectivo (Agar Sangre o Agar TSA) para su identificación. Para ello, se

realizaron las pruebas de la oxidasa y catalasa, una tinción de gram, pruebas bioquímicas para enterobacterias (TSI, SIM, citrato, fenilalanina, urea y rojo metilo) y en caso necesario, se utilizó el sistema de identificación bacteriana API Biomérieux: API- 20E (para enterobacterias) o API-Ne (no enterobacterias).

4.3 Análisis microbiológico selectivo para *Clostridium difficile*.

Se realizó el análisis de 237 muestras para el aislamiento de *Clostridium difficile*. Se siguió un protocolo que promueve la germinación de las esporas y un mayor éxito en el aislamiento (Janezic, Potocnik, Zidaric, & Rupnik, 2016).

- 1) Se alicuotaron 0,2g de las muestras de heces o intestinos machados previamente y se diluyeron en una solución tampón fosfato (1:1). En el caso de los hisopos, se hicieron alícuotas de 0,2ml a partir del PBS contenido en el eppendorf del hisopo original y se diluyeron con tampón fosfato (1:1).
- 2) Se realizó un choque térmico de 20 minutos a 70°C (Janezic et al., 2016). Se centrifugaron a 13000 rpm durante 10 minutos. A partir del pellet obtenido se realizó una siembra en un medio selectivo para *Clostridium difficile* (Condalab) en condiciones de anaerobiosis estricta a 37°C durante 48 horas.

4.4 Diagnóstico molecular

Se realizó el diagnóstico molecular de n=166 muestras, con los siguientes pasos:

A. Extracción de DNA.

Se utilizó un kit de extracción “*QIAamp DNA Stoll Mini Kit*” (Qiagen) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Como control positivo se empleó una muestra positiva de porcino y como control negativo se empleó agua destilada estéril.

B. Polymerase chain reaction (PCR):

Se llevó a cabo la amplificación de los genes que codifican las toxinas *tcdA* y *tcdB*, siguiendo el protocolo previamente descrito por Persson et al (2008) con algunas modificaciones.

Para ello, se realizó una mix a partir de 2,5 µl del DNA extraído de cada muestra, agua y los reactivos que se detallan en la **Tabla 1**. Además, se incluyeron un control positivo (*C. difficile toxA+toxB+*) y un control negativo (agua destilada estéril).

Tabla 1. Composición de la mix de la PCR realizada para las Toxina A y B de *C. difficile*.

Reactivos	Concentración	Volumen (μL)
Agua	-	15,9
Buffer	1xPCR	2,5
dNTPs	1,2 μM	0,3
MgCl ₂	5 mM	1,5
Primers (F y R)*	1 μM	1
AmpliTaq	1,5 U	0,3
DNA polimerasa		
DNA muestra	-	2.5
Final mix	-	25

*Toxinas A y B de *C difficile*. F, Forward, R, Reverse

Los primers empleados (secuencia 5' \square 3) fueron los siguientes (Persson, Torpdahl, & Olsen, 2008):

- CD-TcdA F: GCATGATAAGGCAACTTCAGTGGTA.
- CD-TcdA R: AGTTCCTCCTGCTCCATCAAATG
- CD-TcdB F: CCAAAGTGGAGTGTTACAAACAGGTG
- CD-TcdB R: GCATTTCTCCGTTTTTCAGCAAAGTA

La reacción de amplificación de la PCR se realiza bajo las siguientes condiciones: ciclo de inicio de 10 minutos a 94°C, seguido de 30 ciclos con una fase de desnaturalización de 50 segundos a 94°C, fase de hibridación de 40 segundos a 54°C y una fase de elongación de 50 segundos a 72°C. Finalmente, la PCR termina con un ciclo de 3 minutos a 72°C.

C. Electroforesis en gel de Agarosa

- *Elaboración del gel:*

Se prepararon diluciones de agarosa al 2% en un búfer tamponado (TBE) y se sometieron a tratamiento térmico hasta conseguir una solución homogénea. Se vertió la solución obtenida en un recipiente con peines y se dejó reposar unos 15 minutos hasta solidificar.

- *Electroforesis:*

Los productos de la PCR se distribuyeron en el gel de agarosa y se sometieron a una electroforesis a 100V durante 30 minutos. Los primers de la toxina A y de la toxina

B tenían un peso molecular de 624pb y 409pb respectivamente. Después, se tiñó el gel con bromuro de etidio y se observó bajo luz UV.

4.5 Pruebas de sensibilidad antimicrobiana

Todas las muestras fecales fueron paralelamente cultivadas en medio de cultivo selectivo para Ceftriaxona (MacConkey con Ceftriaxona) a fin de detectar cepas con resistencia a cefalosporinas de 3º generación. Las colonias que crecieron en este medio y eran compatibles con una enterobacteria, fueron finalmente identificadas y sometidas a estudio de sensibilidad antimicrobiana.

La técnica para determinar la susceptibilidad antimicrobiana fue mediante difusión en disco o Kirby-Bauer (Bauer et al., 1966). El diámetro de la inhibición del crecimiento bacteriano se midió y se designó como resistente, intermedio o sensible sobre la base de los estándares de laboratorio clínico (National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS). El protocolo seguido se describe a continuación:

- Se prepararon soluciones con 5ml de agua destilada a una concentración de 0,5 Mcfarland. Sobre la superficie de una placa de agar Müller-Hinton se inoculó cada una de las soluciones preparadas con un hisopo y se colocaron discos de papel de filtro impregnados con concentraciones conocidas de los antibióticos descritos a continuación: Colistina, Ceftiofur, Apramicina, Enrofloxacin, Trimetoprim-Sulfametoxazol (SxT), Amoxicilina-Clavulánico, Gentamicina, Cloranfenicol, Neomicina, Ampicilina, Ácido nalidíxico, Cefalexina, Doxiciclina, Tetraciclina, Flumequina, Lincopectin, Tobramicina y Ciprofloxacina.
- Se dejó a 37°C durante 24 horas y se procedió a medir el diámetro del disco en mm.

5. RESULTADOS

5.1 Diagnóstico microbiológico

Los resultados microbiológicos mostraron en un 26,16% (n=62) de las muestras crecimiento puro. Teniendo en cuenta el origen de las muestras presentadas, el 53,2% (n=33) provenían de especies de aves, el 41% (n=26) de mamíferos y el 48% de reptiles (n=3).

El patógeno más frecuentemente aislado fue *Escherichia coli*, con un total de 38 aislamientos puros, representando un 61,3% (38/62) del total de las bacterias aisladas, y un 16% del total de muestras analizadas (38/237). En segundo lugar, *Proteus spp.* representó un 9,7% de los aislamientos bacterianos y en tercer lugar *Klebsiella pneumoniae* un 6,4%. *Enterobacter cancerogenus*, *Staphylococcus spp.* y *Salmonella spp.* representaron un 3,2% (n=2 de cada spp) sobre el total de bacterias aisladas. Otras bacterias como *Bacillus spp.*, *Clostridium sordeli*, *Citrobacter braaki*, *Enterobacter asburiae*, *Pseudomona aeruginosa*, *Raoultella ornitholytica* y *Vibrio fluvialis* fueron puntualmente aisladas (1,6%) (Tabla 2).

Tabla 2. Clasificación de cada muestra fecal sometida a diagnóstico microbiológico, proveniente de fauna salvaje ingresados en el Centro de Rehabilitación de Torreferrosa (España), con la especie animal a la que pertenece, su nombre en latín y el patógeno aislado de esa muestra por cultivo microbiológico.

Especie animal	Nombre latín	Tipo de animal	Agente aislado
Gorrion común	Passer domesticus	Ave	<i>Bacillus spp.</i>
Erizo	Erinaceus europeus	Mamífero	<i>Citrobacter braaki</i>
Azor rapaz	Accipiter gentilis	Ave	<i>Citrobacter spp.</i>
Lechuza	Buteo buteo	Ave	<i>Clostridium sordeli</i>
Jabali	Sus scrofa	Mamífero	<i>E. Coli</i>
Águila ratonera	Buteo buteo	Ave	<i>E. Coli</i>
Gorrion común	Passer domesticus	Ave	<i>E. Coli</i>
Erizo	Erinaceus europeus	Mamífero	<i>E. Coli</i>
Gineta	Genetta genetta	Mamífero	<i>E. Coli</i>
Lechuza	Tyto alba	Ave	<i>E. Coli</i>
Águila ratonera	Buteo buteo	Ave	<i>E. Coli</i>
Ganso	Anser anser	Ave	<i>E. Coli</i>
Zorzal pajarito	Turdus philomelos	Ave	<i>E. Coli</i>
Vison	Mustela vison	Mamífero	<i>E. Coli</i>
Jilguero	Carduelis carduelis	Ave	<i>E. Coli</i>
Jilguero	Carduelis carduelis	Ave	<i>E. Coli</i>
Jilguero	Carduelis carduelis	Ave	<i>E. Coli</i>
Cernicalo vulgar	Falco tinnunculus	Ave	<i>E. Coli</i>
Mirlo	Turdus merula	Ave	<i>E. Coli</i>
Vison	Mustela vison	Mamífero	<i>E. Coli</i>
Vison	Mustela vison	Mamífero	<i>E. Coli</i>
Vison	Mustela vison	Mamífero	<i>E. Coli</i>
Mirlo	Turdus merula	Ave	<i>E. Coli</i>
Gaviota mediterranea	Larus fuscus	Ave	<i>E. Coli</i>

Erizo	Erinaceus europeus	Mamífero	<i>E. Coli</i>
Vencejo real	Apus melba	Ave	<i>E. Coli</i>
Azor rapaz	Accipiter gentilis	Ave	<i>E. Coli</i>
Azor rapaz	Accipiter gentilis	Ave	<i>E. Coli</i>
Erizo	Erinaceus europeus	Mamífero	<i>E. Coli</i>
Zorro	Vulpes vulpes	Mamífero	<i>E. Coli</i>
Curruca cabecinegra	Sylvia melanocephala	Ave	<i>E. Coli</i>
Gineta	Genetta genetta	Mamífero	<i>E. Coli</i>
Mirlo	Turdus merula	Ave	<i>E. Coli</i>
Vencejo real	Mustela vison	Ave	<i>E. Coli</i>
Erizo	Erinaceus europeus	Mamífero	<i>E. Coli</i>
Jabali	Sus scrofa	Mamífero	<i>E. Coli</i>
Tejón	Meles meles	Mamífero	<i>E. Coli</i>
Erizo	Erinaceus europeus	Mamífero	<i>E. Coli</i>
Erizo moruno	Aetechinus algeris	Mamífero	<i>E. Coli</i>
Erizo	Erinaceus europeus	Mamífero	<i>E. Coli</i>
Halcón peregrino	Falco peregrinus	Ave	<i>E. Coli</i>
Mirlo	Turdus merula	Ave	<i>E. Coli</i>
Tortuga	Trachemys scripta	Reptil	<i>Enterobacter asburiae</i>
			<i>Enterobacter</i>
Colirrojo	Phoenicurus ochruros	Ave	<i>cancerogenes</i>
			<i>Enterobacter</i>
Gorrion común	Passer domesticus	Ave	<i>cancerogenus</i>
Erizo	Erinaceus europeus	Mamífero	<i>K. pneumoniae</i>
Gato montés	Felis silvestris	Mamífero	<i>K. pneumoniae</i>
Erizo	Erinaceus europeus	Mamífero	<i>K. pneumoniae</i>
Carabu	Strix aluco	Ave	<i>K. pneumoniae</i>
Cernicalo vulgar	Falco tinnunculus	Ave	<i>Proteus spp.</i>
Vison	Mustela vison	Mamífero	<i>Proteus spp.</i>
Patito	Tachibaptus ruficollis	Ave	<i>Proteus spp.</i>
Verderó pajarito	Carduelis choris	Ave	<i>Proteus spp.</i>
Tortuga	Trachemys scripta	Reptil	<i>Proteus spp.</i>
Vison	Mustela vison	Mamífero	<i>Proteus spp.</i>
			<i>Pseudomona</i>
Lechucica carabu	Strix aluco	Ave	<i>aeruginosa</i>
			<i>Raoultella</i>
Gaviota reidora	Larus ridibundus	Ave	<i>ornithinolytica</i>
Vison	Mustela vison	Mamífero	<i>Salmonella spp.</i>
Erizo	Erinaceus europeus	Mamífero	<i>Salmonella spp.</i>
Erizo	Erinaceus europeus	Mamífero	<i>Staphylococcus spp.</i>
Buho chco	Asio otus	Ave	<i>Staphylococcus spp.</i>
Galapago leproso	Mauremys leprosa	Reptil	<i>Vibrio fluvialis</i>

5.2 Prevalencia de *Clostridium difficile*.

En los cultivos microbiológicos de *C. difficile* no se obtuvieron crecimientos compatibles en ninguna de las 237 muestras sembradas. Sin embargo, se aisló otras bacterias gram positivas como *Clostridium sordeli* en una muestra de ratonero (*Buteo buteo*) y *Bacillus spp.* de un gorrion doméstico (*Passer domesticus*).

En el estudio molecular, de las 166 muestras analizadas, dos fueron positivas (1,2%): una hembra de gaviolán común (*Accipiter nisus*) positiva para el gen que codifica la toxina A (*tcdA*) y una gaviota reidora (*Larus ridibundus*) positiva al gen que codifica la

toxina B (*tcdB*). Esto representó una prevalencia del 100% de las muestras de gavilanes y del 100% de gaviotas reidoras analizadas (Figura 2).

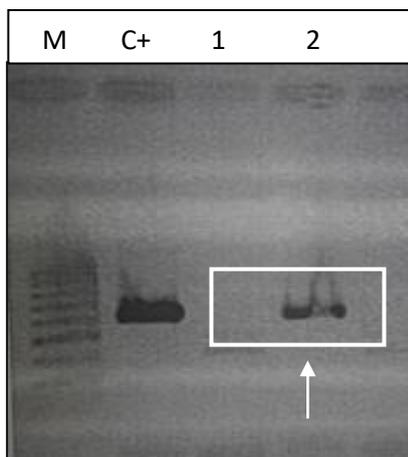


Figura 2. Gel de agarosa de una PCR para *Clostridium difficile* con una muestra positiva a la toxina A correspondiente a un gavilán común (*Accipiter nisus*). M: marcador de peso moléculas; 1 y 2 muestras del estudio; C+, control positivo; Muestra positiva indicada con flecha.

5.3 Perfil de sensibilidad antimicrobiana.

De las 237 muestras cultivadas en medio selectivo (MacConkey con Ceftriaxona) se aislaron un total de 14 cepas resistentes: 12 *E. coli* (5,06%) y 2 *Klebsiella pneumoniae* (0,8%). Estas cepas fueron aisladas principalmente de erizos (2,5%) y jabalíes (1,3%). Otras spp como visón, zorzal, mirlo, zorro o erizo moruno, resultaron positivos con un asilado (Tabla 3).

Entre las cepas de *E. coli*, el 83% presentaron un perfil de resistencia a múltiples fármacos (MDR), es decir, resistentes a 3 o más fármacos. Además, ninguna de ellas presentó sensibilidad a todos los antibióticos utilizados al igual que las cepas de *K. pneumoniae*. Las cepas de *K. pneumoniae* aisladas de erizos europeos también presentaron perfil MDR (Tabla 3).

De las cepas de *E. coli*, las más resistentes pertenecían a un erizo europeo y a un erizo moruno. Sólo presentaron sensibilidad a Apramicina y en el caso del erizo moruno, también a Neomicina (Tabla 3).

Tabla 3. Perfil de resistencias antimicrobianas de las muestras aisladas incluyendo la especie, el número de animales positivos de esa especie, las cepas aisladas y las resistencias a los antibióticos.

ESPECIE ANIMAL	ANIMALES POSITIVOS N (% TOTAL INTRA- SPP)	CEPAS AISLADAS Medio Mackonkey + Ceftriaxona	PERFIL DE ANTIBIO- RESISTENCIA
JABALÍ (<i>Sus scrofa</i>)	3 (12,5%)	<i>E. coli</i> *	FLU, LIN.
		<i>E. coli</i>	COL, AMP, CEFA.
		<i>E. coli</i>	COL, ENRO, AMP, NAL, CEFA, DOX, TETR, FLU, LIN, CIP.
VISÓN (<i>Mustela vison</i>)	1 (7,6%)	<i>E. coli</i>	COL, AMP, CEFA.
MIRLO (<i>Turdus merula</i>)	1 (12,5%)	<i>E. coli</i>	A-CLAV, AMP, NAL, CEFA, DOX, FLU.
ZORRO (<i>Vulpes vulpes</i>)	1 (100%)	<i>E. coli</i>	COL, CEFT, A-CLAV, NEO, AMP, NAL, CEFA, TETR.
ZORZAL (<i>Turdus philomelos</i>)	1 (100%)	<i>E. coli</i> *	A-CLAV, AMP.
ERIZO EUROPEO (<i>Erinaceus europeus</i>)	6 (15,4%)	<i>E. coli</i>	COL, CEFT, ENRO, A-CLAV, GENT, AMP, CEFA, TETR, FLU.
		<i>E. coli</i>	CEFT, ENRO, SxT, A-CLAV, GENT, AMP, NAL, CEFA, DOX, TETR, FLU, TOB, CIP.
		<i>E. coli</i>	CEFT, A-CLAV, AMP, CEFA, TETR.
		<i>E. coli</i>	CEFT, A-CLAV, AMP, CEFA, TETR.
		<i>K. pneumoniae</i>	ENRO, SxT, A-CLAV, NEO, AMP, NAL, CEFA, FLU, LIN, CIP.
ERIZO MORUNO (<i>Aeetechinus algirus</i>)	1 (50%)	<i>K. pneumoniae</i>	COL, ENRO, SxT, AMP, NAL, CEFA, DOX, TETR, FLU, LIN, CIP.
		<i>E. coli</i>	ENRO, A-CLAV, GENT, CLOR, AMP, NAL, CEFA, TETR, FLU, LIN, TOB, CIP.

AMP: Ampicilina; CEFA: Cefalexina; A-CLAV: Amoxicilina-clavulánico; TETR: Tetraciclina; COL: Colistina; CEFT: Cefotiofur; NAL: Ácido Nalidixico; FLU: Flumequina; ENRO: Enrofloxacin; GENT: Gentamicina; DOX: Doxiciclina; LIN: Lincoespectín, CIP: Ciprofloxacina, TOB: Tobramicina, SxT: Trimetoprin-Sulfametoxazol; CLOR: Cloranfenicol; NEO: Neomicina; AP: Apramicina

*Cepas aisladas en medio no selectivo.

Más del 50% de los aislamientos (de 2 especies diferentes: *E. coli* y *K. pneumoniae*) presentaron resistencia a Ampicilina (92.9%), Cefalexina (85.7%), Amoxicilina-clavulánico (57.1%), y Tetraciclina (57.1%) (Figura 3).

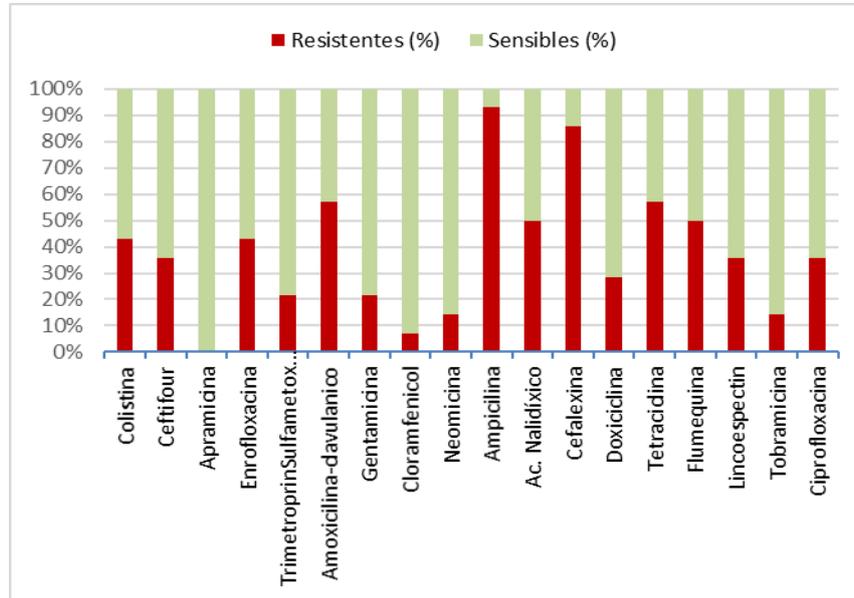


Figura 3. Porcentajes de resistencias a los diferentes antibióticos de todas las cepas aisladas en medio Mackonkey+Ceftriaxona a partir de muestras fecales de fauna salvaje ingresada en el Centro de Rehabilitación de Fauna Salvaje de Torreferrusa (España).

Los antibióticos a los que las cepas de *E. coli* presentaron mayor resistencia fueron a Ampicilina (91,66% de las cepas resistentes) y Cefalexina (83.3%). Por el contrario, los porcentajes de mayor sensibilidad fueron frente a Apramicina (100%) y a Cloranfenicol, Neomicina y Trimetropin-Sulfametoxazol (92,9%). Entre las cepas de *K. pneumoniae*, solamente Ceftiofur, Gentamicina, Tobramicina y Apramicina fueron los antibióticos a los que ambas cepas fueron sensibles presentando resistencias al 55,5% y al 61,1% de los antibióticos respectivamente (Tabla 4).

Tabla 4. Número y porcentaje de cepas resistentes por antibiótico empleado provenientes de muestras fecales de fauna salvaje del Centro de Rehabilitación de Torreferrusa (España).

AGENTE ANTIMICROBIANO	E. COLI (N=12)	N (%)	K. PNEUMONIAE (N=2)	N (%)	TOTAL RESISTENCIAS %
AMPICILINA	11	91,7	2	100	92,9
CEFALEXINA	10	83,3	2	100	85,7
AMOXICILINA-CLAVULÁNICO	7	58,3	1	50	57,1
TETRACICLINA	7	58,3	1	50	57,1
COLISTINA	5	41,7	1	50	42,9
CEFTIOFUR	5	41,7	0	0	35,7
ÁCIDO NALIDIXICO	5	41,7	2	100	50,0
FLUMEQUIN	5	41,7	2	100	50,0
ENROFLOXACINA	4	33,3	2	100	42,9
GENTAMICINA	3	25,0	0	0	21,4
DOXICICLINA	3	25,0	1	50	28,6
LINCOESPECTÍN	3	25,0	2	100	35,7
CIPROFLOXACINA	3	25,0	2	100	35,7
TOBRAMICINA	2	16,7	0	0	14,3
TRIMETROPRINSULFAMETOXAZOL	1	8,3	2	100	21,4
CLORANFENICOL	1	8,3	1	50	14,3
NEOMICINA	1	8,3	1	50	14,3
APRAMICINA	0	0,0	0	0	0

6. DISCUSIÓN

Desde que la infección por *Clostridium difficile* adquirió un carácter emergente entre la población humana y animal ha sido sobre todo estudiada en animales de producción. Desde entonces, se ha demostrado su presencia en el tracto gastrointestinal de especies domésticas: porcinos y bovinos, caballos, perros y gatos, aves de granja (Keessen et al., 2011; Moono et al., 2016); también en animales de laboratorio como hámsters, conejos y cobayas (Keel & Songer, 2006); y en algunos animales salvajes donde también se ha detectado la enfermedad asociada a esta infección. Las prevalencias varían entre palomas (12,5%), ratas (19,2%), focas (26,3%), nutrias marinas (4-8%), coatíes (6,5%) (Anderson et al., 2015; Andres-Lasheras et al., 2017; Himsworth et al., 2014; Miller et al., 2010; Silva et al., 2014) y ocasionalmente en otras especies animales como un potro de cebra, una cabra pirenaica, un chimpancé, avestruces, liebres, perros de la pradera, y un oso Kodiak (Alvarez-Perez et al., 2014; Keel & Songer, 2006). Sin embargo, los animales descritos en estos estudios tenían algún tipo de contacto con el ser humano ya sea por compartir el hábitat o por ser animales de zoológicos en cautiverio. Por ejemplo, un estudio canadiense sobre la prevalencia de CD en mamíferos salvajes en las inmediaciones de granjas y zoológicos encontró un valor del 4,6% para mapaches (*Procyon lotor*) y musarañas (*Blarina brevicauda*) (Jardine et al., 2013); en ratas urbanas de Noruega se encontró un 13,1% de prevalencia (95/724) de CD toxigénicos (Himsworth et al., 2014).

En lo referente a la fauna salvaje en libertad, sin antecedentes de contacto humano conocido, este es el primer estudio realizado que describe la presencia de CD en aves salvajes en España. El resultado de dos muestras positivas (2/166) halladas por diagnóstico molecular, en un gavilán común y una gaviota, demuestra la presencia de cepas toxigénicas de CD en fauna salvaje de vida libre. Es cierto que la prevalencia es muy baja (1,2%) por lo que no podemos decir que CDI se encuentra ampliamente establecida entre la vida silvestre autóctona de Cataluña (pero sí que pueden existir huéspedes accidentales o transitorios de esta infección. Por otra parte, es evidente que la carga bacteriana de CD que puedan tener estos animales salvajes es baja, sólo detectable mediante técnica muy sensibles como la PCR. De hecho, no se pudieron obtener aislados de CD de las muestras positivas mediante cultivo microbiológico selectivo ni tras aplicar un choque térmico para facilitar la germinación de esporas.

Así pues, el hecho de que las dos muestras positivas no hayan dado crecimientos compatibles pone de manifiesto las posibles limitaciones del diagnóstico microbiológico. En los últimos años, han sido grandes los esfuerzos por desarrollar diagnósticos para la rápida detección de CD y muchos autores coinciden en que la complejidad de cultivo de CD y la inestabilidad de las toxinas contribuye a que muchos casos no sean diagnosticados o se encuentren prevalencias menores a las reales. Blanco et al. (2013) indica en un estudio comparativo que el mismo método que se emplea en este trabajo podría dejar más del 22% de falsos negativos (Blanco, Álvarez-Pérez, & García, 2013).

En todo caso, no es sorprendente la prevalencia obtenida. Aunque las publicaciones son escasas para poder establecer comparativas, encontramos otros trabajos cuyos resultados se asemejan. Entre ellos está un estudio realizado en passeriformes en Eslovenia donde la prevalencia de CD estimada en 465 aves migratorias resultó ser cero (Bandelj et al., 2011). En otras dos publicaciones se confirman el aislamiento positivo de CD asociado a un cuadro clínico de CDAD en la cría de un alce (Arroyo, Rousseau, Staempfli, & Weese, 2005) y en un ocelote salvaje (Silva et al., 2013) en centros de rehabilitación en Canadá y en Brasil respectivamente. La diferencia esencial entre ambos casos es que tan sólo el ocelote fue sometido a tratamiento antibiótico previo por una rotura de tibia que presentaba antes del desarrollo de CDAD (Arroyo et al., 2005; Silva et al., 2013).

La administración de antibiótico es un factor de riesgo asociado a CDAD en el ser humano y en algunos animales domésticos (Debast et al., 2009). En animales salvajes no está clara la relación entre uso de antimicrobianos y aparición de CDAD. Un estudio llevado cabo en Dinamarca, relata la aparición de un brote de enterocolitis causada por CD en un grupo de elefantes asiáticos cautivos en un zoo del país. Dos de los tres animales que presentaron síntomas tuvieron un desenlace repentino fatal. Finalmente, se obtuvieron aislamientos de CD de los tres individuos. En ningún caso se había administrado antibióticos. Sin embargo, los autores atribuyen el brote a las grandes cantidades de brócoli con las que se les alimentó los días previos, ya que este tiene un alto poder antimicrobiano (Bojesen et al., 2006).

En nuestro estudio, no existe relación previa de los animales positivos con tratamientos antimicrobianos puesto que proceden del medio ambiente. El primer aislamiento tiene su origen en una muestra cloacal de una hembra de gavián común (*Accipiter nisus*) que resultó positiva mediante PCR para el gen de la toxina A (*tcdA*). Este animal proviene

del Maresme (Cataluña) y entró en el centro de recuperación por una electrocución leve. *Accipiter nisus* es una de las rapaces más pequeñas de España que habita en zonas boscosas con escasa presencia de actividad urbana. El segundo aislado positivo corresponde a la muestra cloacal de una gaviota reidora (*Larus ridibundus*) positiva a la toxina B (*tcdB*). Es habitual encontrar ejemplares de esta especie en zonas húmedas del litoral o del interior, tanto de agua salada como dulce. Buscan alimento en arrozales, salinas, puertos pesqueros, tierras agrícolas o vertederos. Ambas especies se hallan bien distribuidas en la península Ibérica que acoge cada año muchos ejemplares en su paso migratorio en busca de zonas cálidas (SEO BirdLife, 2008a, 2008b).

Es muy difícil determinar la fuente concreta de infección de estos animales, sin embargo, tener en cuenta su hábitat y el tipo de alimentación nos puede ayudar a realizar conjeturas. La gaviota reidora, oportunista y carroñera, es capaz de ingerir una amplia variedad de alimentos, desde invertebrados marinos y restos de peces hasta lombrices o pequeños mamíferos. El gavilán común se declara ornitófago, pero también puede llegar a comer ratoncillos u otros roedores (SEO BirdLife, 2008a, 2008b). Muchos de estos animales que ingieren, cohabitan en las inmediaciones de granjas u espacios urbanos poco salubres, y se ha demostrado que participan en la transmisión de cepas toxigénicas de CD. Se han notificado altas prevalencias en ratas (19,2%), ratones (13.2%), palomas (12.5%), gorriones (66%) e incluso moscas (55,7%) y gusanos (100%) del entorno de instalaciones ganaderas positivas de diferentes ribotipos, algunos de ellos preocupantes para la salud pública por su potencial zoonótico (RT078, RT126 y RT005) (Andres-Lasheras et al., 2017; Burt, Siemeling, Kuijper, & Lipman, 2012). Otras fuentes ambientales de infección como el agua (Salf & Brazier, 1996) o el compost porcino (Usui et al., 2017), podrían también ser significativas en la transmisión. Así pues, nuestras dos aves positivas podrían haber adquirido la infección por vía alimentaria, pero también podrían corresponder a dos animales portadores asintomáticos de CD, puesto que esta bacteria se halla de forma saprófita en el tracto digestivo de muchos animales sin provocar problemas al estar en equilibrio con la microbiota. Sólo si se produce disbiosis puede provocar problemas en la salud de animales o personas (Rodríguez-Palacios et al., 2013). De esta manera, las distintas especies de mamíferos o de aves salvajes podrían contribuir al mantenimiento y a la circulación del patógeno entre diferentes ecosistemas. Son necesarias investigaciones

adicionales para determinar el role epidemiológico de estas spp salvajes en la diseminación y trasmisión de CD en el medio ambiente.

Por otro lado, la fauna salvaje también puede actuar como reservorios de otros agentes potencialmente zoonóticos (Molina-López et al., 2015). En el presente estudio, se analizaron las muestras de 237 animales salvajes mediante cultivo microbiológico. En el 26,2% de las muestras se aisló y se logró la identificación microbiológica de una spp bacteriana de relevancia sanitaria (62 muestras de 33 aves, 26 mamíferos y 3 reptiles). Es importante entender que la detección de agentes microbianos no tiene porqué implicar patogenicidad en su hospedador. En este estudio el criterio de selección para los animales muestreados fue el ingreso en el centro, con lo que la mayoría de ellos no presentaban cuadro infeccioso primario. Además, se conoce que los ingresos en el centro de recuperación por enfermedades primarias presentan una baja prevalencia, siendo las causas más comunes las traumáticas por disparos entre otras (Molina-López, Casal, & Darwich, 2011).

De los 237 cultivos microbiológicos realizados, prácticamente 1 de cada 6 aislados fueron *E. coli*. Además, la mayoría de las especies positivas a *E. coli* eran aves (21/38). Es muy frecuente el aislamiento de esta bacteria de muestras cloacales por lo que no es de extrañar prevalencias tan altas como las reportadas de un 39,9% en loros de comercio ilegal de Brasil (Wanderley Hidasi et al., 2013) o de un 53% en aves rapaces en Italia (Giacopello et al., 2016).

La prevalencia de los otros patógenos aislados no es elevada, pero dado que se consideran bacterias MDR, suponen una valiosa información para estudiar la presencia de bacterias multirresistentes en el ambiente.

Existen muchos artículos que describen la presencia de agentes MDR en animales silvestres. Por ejemplo, un estudio llevado a cabo en aves rapaces del mismo centro de rehabilitación describió una prevalencia de 10% de *Salmonella spp* multirresistentes, encontrándose entre ellas *S. enteritidis* y *S. typhimurium*, las más preocupantes para el ser humano (Molina-Lopez et al., 2011). También se han descrito cepas MDR de *Staphylococcus spp* en zorros de Escocia (Carson et al., 2012) o de *K. pneumoniae* en ratones en Kenia (Gakuya, Kyule, Gathura, & Kariuki, 2001).

Teniendo en cuenta el potencial zoonótico de la amplia gama de patógenos detectados, su diagnóstico en este estudio refuerza la teoría de que la fauna salvaje está implicada

en la dispersión y diseminación de patógenos que pueden llegar a comprometer la salud pública.

Finalmente, las cepas aisladas sometidas a examen de susceptibilidad antimicrobiana presentan un alto porcentaje de resistencias a los antimicrobianos empleados. Debido a su origen, aislamiento en medio de cultivo con Ceftriaxona, no son de extrañar los altos porcentajes de resistencia a los antimicrobianos de la misma familia de las Cefalosporinas. Los mayores porcentajes de resistencia los presentaron fármacos de la familia de los betalactámicos (Amoxicilina, Ampicilina, Cefalexina). El uso sin medida de estos fármacos en los últimos años ha favorecido la aparición de cepas de *E. coli* MDR que exhiben la acción de estos por la producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE). Al igual que *E. coli*, *K. pneumoniae* también es productora de BLEE y ambas han sido descritas ya en animales salvajes (Vidal et al., 2017). Así pues, no es de extrañar que las cepas de *K. pneumoniae* de nuestro estudio también presentaran perfil MDR.

En un principio, la fauna salvaje no tiene contacto con los antibióticos, por lo que no parece lógico haber encontrado porcentajes tan altos de bacterias MDR en nuestro estudio. Sin embargo, se conoce que los animales cercanos a fuentes antropogénicas de antimicrobianos tienen niveles más altos de bacterias multirresistentes que aquellos más alejados (Osterblad et al., 2001). La región a la que pertenecen los animales de estudio cuenta con una alta cabaña de explotaciones ganaderas. El uso de antimicrobianos en la producción intensiva es una práctica común que permite la aparición de bacterias MDR y su difusión al ecosistema, facilitando la infección de especies de vida silvestre. Además de la diseminación clonal de bacterias MRD, otro factor importante en la aparición de cepas MRD en la fauna salvaje es el papel de la transmisión de plásmidos y otros elementos genéticos móviles (MGE) entre bacterias en el medio ambiente (agua, suelo...). Esta transmisión horizontal favorece la adquisición de genes MDR en bacterias que no los poseían y la aparición de bacterias MRD en ambientes no influenciados por las actividades humanas, así como en la fauna salvaje (Rios et al., 2016).

Por último, cabe destacar la importancia de estos estudios en el ámbito One Health, Como hemos visto, la fauna salvaje juega un papel clave. Puede albergar diversidad de bacterias entéricas multirresistentes, viéndose afectadas por ellas, o actuando como

reservorio de las mismas, y su potencial zoonótico pone en relieve el gran reto al que se enfrentan la medicina humana y animal en el contexto One Health.

7. CONCLUSIONES

- En el presente estudio se confirma la presencia de cepas toxigénicas de *C. difficile* en un gavián común (100%) positivo al gen que codifica la toxina A (*tcbA*), y en una gaviota reidora (100%) positivo a la toxina B (*tcbB*).
- El erizo común (15,4%) y el jabalí (12,5%) además de otras especies de animales salvajes como el zorzal, el mirlo, el zorro, el visón o el erizo moruno, pueden actuar de reservorios de enterobacterias zoonóticas MDR.
- Se confirma la presencia de enterobacterias MDR, principalmente *E. coli* y *K. pneumoniae* y *C difficile*, en fauna salvaje autóctona de Cataluña, la cual puede llegar a representar un riesgo para la diseminación de estas cepas al medio ambiente.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Alderete, P. A. (2011). “*Clostridium Difficile*”: Prevalencia e importancia ecológica en animales domésticos y fauna salvaje. Universidad Complutense de Madrid.
- Alvarez-Perez, S., Blanco, J. L., Martinez-Navado, E., Pelez, T., Harmanus, C., Kuijper, E., & Garcia, M. E. (2014). Shedding of *Clostridium difficile* PCR ribotype 078 by zoo animals, and report of an unstable metronidazole-resistant isolate from a zebra foal (*Equus quagga burchellii*). *Veterinary Microbiology*, 169(3–4), 218–222.
- Anderson, C.E, Haulena M., Zabek E., Habing G., Raverty S. (2015). Clinical and epidemiologic considerations of *Clostridium Difficile* in harbor seals (*Phoca Vitulina*) at a marine mammal rehabilitation center. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 46(2), 191–197.
- Andres-Lasheras, S., Bolea, R., Mainar-Jaime, R. C., Kuijper, E., Sevilla, E., Martin-Burriel, I., & Chirino-Trejo, M. (2017). Presence of *Clostridium difficile* in pig faecal samples and wild animal species associated with pig farms. *Journal of Applied Microbiology*, 122(2), 462–472.
- Arroyo, L. G., Rousseau, J. D., Staempfli, H. R., & Weese, J. S. (2005). Suspected clostridium difficile-associated hemorrhagic diarrhea in a 1-week-old elk calf. *Canadian Veterinary Journal*, 46(12), 1130–1131.
- Arruda, P. H. E., Madson, D. M., Ramirez, A., Rowe, E., Lizer, J. T., & Songer, J. G. (2013). Effect of age, dose and antibiotic therapy on the development of *Clostridium difficile* infection in neonatal piglets. *Anaerobe*, 22, 104–110.
- Asensio, A., Vaque-Rafart, J., Calbo-Torrecillas, F., Gestal-Otero, J.J., López-Fernández, F., Trilla-García, A., & Canton, R. (2008). Increasing rates in *Clostridium difficile* infection (CDI) among hospitalised patients, Spain 1999-2007. *Euro Surveillance*, 13(31).
- Avbersek, J., Janezic, S., Pate, M., Rupnik, M., Zidaric, V., Logar, K., Vengust, M., Zemljic, M., Pirs, T., & Ocepek, M. (2009). Diversity of *Clostridium difficile* in pigs and other animals in Slovenia. *Anaerobe*, 15(6), 252–255.
- Bandelj, P., Trilar, T., Racnik, J., Zadavec, M., Pirš, T., Avbersek, J., Micunovic, J., Ocepek, M., & Vengust, M. (2011). Zero prevalence of *Clostridium difficile* in wild passerine birds in Europe. *FEMS Microbiology Letters*, 321(2), 183–185.
- Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C., & Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45(4), 493–6.
- Bauer, M. P., Notermans, D. W., Van Benthem, B. H., Brazier, J. S., Wilcox, M. H., Rupnik, M., Monnet, D.L., van Dissel, J.T. & Kuijper, E. J. (2011). *Clostridium difficile* infection in Europe: A hospital-based survey. *The Lancet*, 377(9759), 63–73.
- Blanco, J. L., Álvarez-Pérez, S., & García, M. E. (2013). Is the prevalence of *Clostridium difficile* in animals underestimated? *Veterinary Journal*, 197(3), 694–698.
- Bojesen, A. M., Olsen, K. E. P., & Bertelsen, M. F. (2006). Fatal enterocolitis in Asian elephants (*Elephas maximus*) caused by *Clostridium difficile*. *Veterinary Microbiology*, 116(4), 329–335.
- Bonedahl, J., Hernandez, J., Stedt, J., Waldenström, J., Olsen, B., & Drobni, M. (2014). Extended-spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Gulls, Alaska, USA. *Emerging Infectious Diseases*, 20(5), 897–9.
- Borriello, S. P. (1998). Pathogenesis of *Clostridium difficile* infection. *Journal of Antimicrobial*

Chemotherapy, 41(suppl_3), 13–19.

- Burt, S. A., Siemeling, L., Kuijper, E. J., & Lipman, L. J. A. (2012). Vermin on pig farms are vectors for *Clostridium difficile* PCR ribotypes 078 and 045. *Veterinary Microbiology*, 160(1–2), 256–258
- Carson, M., Meredith, A. L., Shaw, D. J., Giotis, E. S., Lloyd, D. H., & Loeffler, A. (2012). Foxes as a potential wildlife reservoir for *meca* -positive staphylococci. *Vector-borne and zoonotic diseases*, 12(7), 583–587.
- CDC. (2012). Making health care safer: stopping *C. difficile* infections. *CDC Vital Signs*, March 2012, 1–4. Retrieved August 3, 2017, from <https://www.cdc.gov/VitalSigns/Hai/StoppingCdifficile/>
- CDC. (2013). Biggest threats. Retrieved August 3, 2017, from https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest_threats.html
- CDC. (2014). Multistate Outbreak of Human Salmonella Cotham and Salmonella Kisarawe Infections Linked to Contact with Pet Bearded Dragons (Final Update) | Salmonella Cotham and Salmonella Kisarawe Infections Linked to Pet Bearded Dragons | Salmonella | CDC. Retrieved August 3, 2017, from <https://www.cdc.gov/salmonella/cotham-04-14/index.html>
- Chomel, B. B., Belotto, A., & Meslin, F. X. (2007). Wildlife, exotic pets, and emerging zoonoses. *Emerging Infectious Diseases*, 13(1), 6–11.
- Cunningham, A. A., & Daszak, P. (1998). Extinction of a species of land snail due to infection with a microsporidian parasite. *Conservation Biology*, 12(5), 1139–1141.
- Cunningham, A. A., Daszak, P., & Wood, J. L. N. (2017). One Health , emerging infectious diseases and wildlife: two decades of progress? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372, 1–8.
- Daszak, P., Cunningham, A., & Alex, H. (2000). Emerging Infectious Diseases of Wildlife--Threats to Biodiversity and Human Health. *Science*, 287(5452), 443–449.
- Davies, K. A., Longshaw, C. M., Davis, G. L., Bouza, E., Barbut, F., Barna, Z., Delmee, M., Fitzpatrick, F., Ivanova, K., Kuijper, E., Macovei, I., Mentula, S., Mastrantonio, P., Von Miller, L., Oleastro, M., Petinaki, E., Pituch, H., Noren, T., Novakova, E., Nyc, O., Rupnik, M., Schmid, D., Wilcox, M. H. (2014). Underdiagnosis of *Clostridium difficile* across Europe: The European, multicentre, prospective, biannual, point-prevalence study of *Clostridium difficile* infection in hospitalised patients with diarrhoea (EUCLID). *The Lancet Infectious Diseases*, 14(12), 1208–1219.
- Debast, S. B., Van Leengoed, L. A. M. G., Goorhuis, A., Harmanus, C., Kuijper, E. J., & Bergwerff, A. A. (2009). *Clostridium difficile* PCR ribotype 078 toxinotype V found in diarrhoeal pigs identical to isolates from affected humans. *Environmental Microbiology*, 11(2), 505–511.
- Eyre, D. W., Cule, M. L., Wilson, D. J., Griffiths, D., Vaughan, A., O'Connor, L., Camilla L.C., Golubchik, T., Batty, E. M., Finney, J. M., Wyllie, D. H., Didelot, X., Piazza, P., Bowden, R., Dingle, K. E., Harding, R. M., Crook, D. W., Wilcox, M. H., Peto, T. E.A., Walker, A. S. (2013). Diverse Sources of *C. difficile* Infection Identified on Whole-Genome Sequencing. *New England Journal of Medicine*, 369(13), 1195–1205.
- Gakuya, F. M., Kyule, M. N., Gathura, P. B., & Kariuki, S. (2001). Antimicrobial resistance of bacterial organisms isolated from rats. *East African Medical Journal*, 78(12), 646–649.

- Gakuya, F. M., Kyule, M. N., Gathura, P. B., & Kariuki, S. (2001). Antimicrobial resistance of bacterial organisms isolated from rats. *East African Medical Journal*, 78(12), 646–649. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12199446>
- Garcia-Migura, L., Sunde, M., Karlsmose, S., Veldman, K., Schroeter, A., Guerra, B., Granier, S.A., Perrin-Guyomard, A., Bruneau, M., Franco, A. Englund, S., Teale, C., Heiska, H., Clemente, L., Boerlin, P., Moreno, M. A., Daignault, D., Mevius, D., Hendriksen, R.S., Aarestrup, F. M. (2012). Establishing streptomycin epidemiological cut-off values for *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*, 18(1), 88–93.
- Giacopello, C., Foti, M., Mascetti, A., Grosso, F., Ricciardi, D., Fisichella, V., & Lo Piccolo, F. (2016). Antimicrobial resistance patterns of *Enterobacteriaceae* in European wild bird species admitted in a wildlife rescue centre. *Veterinaria Italiana*, 52(2), 139–144.
- Hacek, D. M., Ogle, A. M., Fisher, A., Robicsek, A., & Peterson, L. R. (2010). Significant impact of terminal room cleaning with bleach on reducing nosocomial *Clostridium difficile*. *American Journal of Infection Control*, 38(5), 350–353.
- Hafiz, S., & Oakley, C. L. (1976). *Clostridium difficile*: isolation and characteristics. *Journal of Medical Microbiology*, 9, 129–136.
- Himsworth, C. G., Patrick, D. M., Mak, S., Jardine, C. M., Tang, P., & Scott Weese, J. (2014). Carriage of *Clostridium difficile* by wild urban Norway rats (*Rattus norvegicus*) and black rats (*Rattus rattus*). *Applied and Environmental Microbiology*, 80(4), 1299–1305.
- Janezic, S., Potocnik, M., Zidaric, V., & Rupnik, M. (2016). Highly Divergent *Clostridium difficile* Strains Isolated from the Environment. *Plos one*, 11(11).
- Jardine, C. M., Reid-Smith, R. J., Rousseau, J., & Weese, J. S. (2013). Detection of *Clostridium difficile* in small and medium-sized wild Mammals in Southern Ontario, Canada. *Journal of Wildlife Diseases*, 49(2), 418–21.
- Johnson, P. T. J., & Thielges, D. W. (2010). Diversity, decoys and the dilution effect: how ecological communities affect disease risk. *The Journal of Experimental Biology*, 213(6), 961-970.
- Keel, M. K., & Songer, J. G. (2006). The comparative pathology of *Clostridium difficile*-associated disease. *Veterinary Pathology*, 43(3), 225–40.
- Keessen, E. C., Gaastra, W., & Lipman, L. J. A. (2011). *Clostridium difficile* infection in humans and animals, differences and similarities. *Veterinary Microbiology*, 153(3–4), 205–217.
- Kramer, A., Schwebke, I., & Kampf, G. (2006). How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infectious Diseases*, 6(1), 130.
- Kyne, L., Warny, M., Qamar, A., & Kelly, C. P. (2000). Asymptomatic Carriage of *Clostridium difficile* and Serum Levels of IgG Antibody against Toxin A. *New England Journal of Medicine*, 342(6), 390–397.
- McBee, R. H. (1960). Intestinal flora of some Antarctica birds and mammals. *Journal of Bacteriology*, 79(2), 311–312.
- Miller, M. A., Byrne, B. A., Jang, S. S., Dodd, E. M., Dorfmeier, E., Harris, M. D., Ames, J., Paradies, D., Worcester, K., Jessup, D. A., Miller, W. A. (2010). Enteric bacterial

- pathogen detection in southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*) is associated with coastal urbanization and freshwater runoff. *Veterinary Research*, 41(1).
- Molina-López, R. A., Casal, J., & Darwich, L. (2011). Causes of morbidity in wild raptor populations admitted at a wildlife rehabilitation centre in Spain from 1995-2007: A long term retrospective study. *Plos one*, 6(9).
- Molina-Lopez, R. A., Valverdu, N., Martin, M., Mateu, E., Obon, E., Cerda-Cuellar, M., & Darwich, L. (2011). Wild raptors as carriers of antimicrobial-resistant *Salmonella* and *Campylobacter* strains. *Veterinary Record*, 168(21), 565–565.
- Molina-López, R. A., Vidal, A., Obón, E., Martín, M., & Darwich, L. (2015). Multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar typhimurium monophasic variant 4,12:i:- isolated from asymptomatic wildlife in a Catalanian wildlife rehabilitation center, Spain. *Journal of Wildlife Diseases*, 51(3), 759–763.
- Moono, P., Foster, N. F., Hampson, D. J., Knight, D. R., Bloomfield, L. E., & Riley, T. V. (2016). *Clostridium difficile* Infection in Production Animals and Avian Species: A Review. *Foodborne Pathogens and Disease*, 13(12), 647–655.
- O'Brien, T. F. (2002). Emergence, Spread, and Environmental Effect of Antimicrobial Resistance: How Use of an Antimicrobial Anywhere Can Increase Resistance to Any Antimicrobial Anywhere else. *Clinical Infectious Diseases*, 34(Supplement_3), S78–S84.
- Osterblad, M., Norrdahl, K., Korpimäki, E., & Huovinen, P. (2001). Antibiotic resistance: How wild are wild mammals? *Nature*, 409(6816), 37–38.
- Persson, S., Torpdahl, M., & Olsen, K. E. P. (2008). New multiplex PCR method for the detection of *Clostridium difficile* toxin A (tcdA) and toxin B (tcdB) and the binary toxin (cdtA/cdtB) genes applied to a Danish strain collection. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(11), 1057–1064.
- Popoff, M. R., Rubin, E. J., Gill, D. M., & Boquet, P. (1988). Actin-specific ADP-ribosyltransferase produced by a *Clostridium difficile* strain. *Infection and Immunity*, 56(9), 2299–2306.
- Rios, A. C., Moutinho, C. G., Pinto, F. C., Del Fiol, F. S., Jozala, A., Chaud, M. V., Vila, M. M. D. C., Teixeira, J. A., Balcão, V. M. (2016). Alternatives to overcoming bacterial resistances: State-of-the-art. *Microbiological Research*, 191, 51–80
- Roberts, K., Smith, C. F., Snelling, A. M., Kerr, K. G., Banfield, K. R., Sleigh, P. A., & Beggs, C. B. (2008). Aerial Dissemination of *Clostridium difficile* spores. *BMC Infectious Diseases*, 8(1), 7.
- Rodriguez-Palacios, A., Borgmann, S., Kline, T. R., & LeJeune, J. T. (2013). *Clostridium difficile* in foods and animals: history and measures to reduce exposure. *Animal Health Research Reviews*, 14(1), 11–29.
- Rodriguez, C., Fernandez, J., Van Broeck, J., Taminiau, B., Avesani, V., Boga, J. A., Vazquez, F., Delmee, M., Daube, G. (2016). *Clostridium difficile* presence in Spanish and Belgian hospitals. *Microbial Pathogenesis*, 100, 141–148.
- Rupnik, M. (2007). Is *Clostridium difficile*-associated infection a potentially zoonotic and foodborne disease? *Clinical Microbiology and Infection*, 13(5), 457–459.
- Salf, N. Al, & Brazier, J. S. (1996). The distribution of *Clostridium difficile* in the environment of South Wales. *J. Med Microbiol*, 45(1996), 133–137.

- Schaufler, K., Semmler, T., Wieler, L. H., Wöhrmann, M., Baddam, R., Ahmed, N., Müller, K., Kola, A., Fruth, A., Ewers, C Guenther, S. (2016). Clonal spread and interspecies transmission of clinically relevant ESBL-producing *Escherichia coli* of ST410—another successful pandemic clone? *FEMS Microbiology Ecology*, 92(1), 155-155.
- SEO BirdLife. (2008a). Gavilán común. Retrieved August 15, 2017, from <https://www.seo.org/ave/gavilan-comun/>
- SEO BirdLife. (2008b). Gaviota reidora. Retrieved August 15, 2017, from <https://www.seo.org/ave/gaviota-reidora/>
- Silva, R. O. S., D'elia, M. L., De Magalhães Soares, D. F., Cavalcanti, Álvaro R., Leal, R. C., Cavalcanti, G., Leal, R. C., Cavalcanti, G., Pereira, P. L. L., Lobato, F. C. F. (2013). *Clostridium difficile*-associated diarrhea in an ocelot (*Leopardus pardalis*). *Anaerobe*, 20, 82–84.
- Silva, R. O. S., de Almeida, L. R., Junior, C. A. O., de Magalhães Soares, D. F., Pereira, P. L. L., Rupnik, M., & Lobato, F. C. F. (2014). Carriage of *Clostridium difficile* in free-living South American coati (*Nasua nasua*) in Brazil. *Anaerobe*, 30, 99–101.
- Soler-tovar, D., Hernández-rodríguez, P., Pabón, L. C., Isabel, A., & Morales, T. (2013). Pérdida de biodiversidad: un factor determinante en el aumento de enfermedades infecciosas compartidas entre humanos y animales. *Biodiversidad Colombia*, (2), 53–62.
- Soler, P., Nogareda, F., & Cano, R. (2008). Rates of *Clostridium difficile* Infection in Patients Discharged From Spanish Hospitals, 1997-2005. *Infection Control Hospital Epidemiology*, 29(9), 886–889. Songer, J. G. (2004). The emergence of *Clostridium difficile* as a pathogen of food animals. *Animal Health Research Reviews*, 5(2), 321–326.
- Usui, M., Kawakura, M., Yoshizawa, N., San, L. L., Nakajima, C., Suzuki, Y., & Tamura, Y. (2017). Survival and prevalence of *Clostridium difficile* in manure compost derived from pigs. *Anaerobe*, 43, 15–20.
- Vidal, A., Baldomà, L., Molina-López, R. A., Martin, M., & Darwich, L. (2017). Microbiological diagnosis and antimicrobial sensitivity profiles in diseased free-living raptors. *Avian Pathology*, 9457(March), 1–9.
- Walk, S. T., & Young, V. B. (2008). Emerging Insights into Antibiotic-Associated Diarrhea and *Clostridium difficile* Infection through the Lens of Microbial Ecology. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2008, 125081.
- Wanderley Hidasí, H., Hidasí Neto, J., Cardoso Moraes, M. D., Fontgallad Coelho Linhares, G., de Sá Jayme, V. De, & Auxiliadora Andrade, M. (2013). Enterobacterial Detection and *Escherichia Coli* Antimicrobial Resistance in Parrots Seized From the Illegal Wildlife Trade. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 44(1), 1–7.
- WHO. (2006). *The Control of Neglected Zoonotic Diseases A route to poverty alleviation. The control of neglected zoonotic diseases, route to poverty alleviation: report of a joint WHO/DFID-AHP meeting.* Génova. Retrieved from www.who.int/zoonoses/Report_Sept06.pdf.