



MEMORIA DEL TRABAJO DE FINAL DE MÁSTER

TÍTULO:

***CLOSTRIDIUM DIFFICILE* Y OTROS PATÓGENOS ZONÓTICOS
EN ANIMALES DE COMPAÑÍA**

AUTORA:

BALMA BARREDA PRADES

MÁSTER UNIVERSITARIO EN ZONOSIS Y UNA SOLA SALUD
Curso 2016-2017

DIRECTOR:

MARGARITA MARTIN

FECHA:

EN BELLATERRA, SEPTIEMBRE DE 2017



MEMORIA DEL TRABAJO DE FINAL DE MÁSTER

TÍTULO:

***CLOSTRIDIUM DIFFICILE* Y OTROS PATÓGENOS ZOONÓTICOS
EN ANIMALES DE COMPAÑÍA**

AUTORA:

BALMA BARREDA PRADES

MÁSTER UNIVERSITARIO EN ZOONOSIS Y UNA SOLA SALUD
Curso 2016-2017

DIRECTOR:

MARGARITA MARTIN

FECHA:

EN BELLATERRA, SEPTIEMBRE DE 2017

ÍNDICE

1. Resumen	4
2. Introducción	5
3. Clostridium difficile	5
3.1. Descripción y patogenia de Clostridium difficile	6
3.2. Presentación clínica de Clostridium difficile	8
3.3. Epidemiología	8
3.3.1. Prevalencia	8
3.3.2. Transmisión interespecie y factores de riesgo.....	9
3.5. Diagnóstico	10
3.5.1. Tipo de muestra, transporte y almacenamiento.....	10
3.5.2. Aislamiento microbiológico: Cultivo	11
3.5.3. Detección por métodos moleculares	12
3.5.4. Técnicas inmunológicas	13
3.6. Tratamiento	13
3.7. Clostridium difficile y el uso de antibióticos	14
4. Objetivos	15
5. Material y métodos	16
5.1. Población muestreada	16
5.2. Muestras	16
5.3. Aislamiento microbiológico	16
5.4. Diagnóstico molecular	17
6. Resultados	19
6.1. Prevalencia de Clostridium difficile	19
6.2. Prevalencia de otras bacterias de interés zoonótico	19
7. Discusión	21
8. Conclusiones	24
9. Bibliografía	25
10. Anexo 1	29

1. Resumen

Clostridium difficile es la causa más común de diarrea asociada a hospitales y antimicrobianos en los seres humanos, sin embargo, el papel de *C. difficile* en perros diarreicos no está definido. Los objetivos del presente trabajo son: Determinar la prevalencia de *C. difficile* en perros con y sin diarrea y comparar si hay diferencias entre perros hospitalizados y sanos. Analizar si la infección por *C. difficile* está relacionada con el uso de antibióticos u otros fármacos en perros y determinar la presencia de otros agentes zoonóticos en perros hospitalizados y sanos y su perfil de antibioresistencia. Para realizar este estudio se obtuvieron muestras fecales con un hisopo estéril o bien de heces de 25 perros hospitalizados y 25 perros sanos. Posteriormente las muestras fueron procesadas para realizar diagnóstico microbiológico y diagnóstico molecular. En el aislamiento microbiológico en medio selectivo no se obtuvo ningún aislado de *C. difficile* en perros hospitalizados ni en perros sanos. Y a partir de la PCR, los resultados fueron negativos en todas las muestras para el gen que codifica la toxina A (tcdA) y el gen que codifica la toxina B (tcdB). Se obtuvieron aislados puros de otros microorganismos zoonóticos (*Escherichia coli*) y se realizaron antibiogramas para obtener un perfil de resistencia. Se concluye que la prevalencia de colonización de *C. difficile* es más baja de la esperada, ya que no se ha obtenido ningún resultado positivo de *C. difficile* ni por aislamiento microbiológico específico ni por detección por PCR de las toxinas tcdA y tcdB. Se ha detectado la presencia de cepas de *E. coli* multirresistentes en la población canina de la región geográfica estudiada, incluyendo antimicrobianos de uso generalizado en veterinaria y en humana lo que podría suponer un riesgo para la salud pública.

2. Introducción

La enteritis es un problema de salud común en perros y gatos. La microflora intestinal de estos animales es compleja y poco conocida (39). Los microorganismos comúnmente asociados a la presencia de diarrea en perros son *Salmonella* spp, *Escherichia coli*, *Campylobacter* spp, *Clostridium perringens* y *Clostridium difficile* (6, 12).

La mayoría de ellos, como por ejemplo *Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli* (*E.coli*) o *Clostridium difficile* (*C.difficile*) también suponen un problema de salud pública, ya que se trata de agentes infecciosos que se pueden transmitir entre animales y humanos. Como se comentará posteriormente la gran mayoría de estudios están centrados en humanos y animales de producción, pero recientemente se ha intentado determinar si los animales domésticos juegan un papel en la transmisión de animales a humanos.

C. difficile es una de las bacterias nosocomiales emergentes más importantes en salud pública en Europa y Norte América (11). La infección puede causar colitis y en casos más graves muerte por megacolon tóxico y colitis pseudomembranosa. Según las últimas publicaciones del Centro de Control y Prevención de Enfermedades Infecciosas (CDC) de los EEUU esta infección produce un total de 250.000 infecciones y 14.000 muertes al año, representando para la salud pública americana un gasto anual de 1 billón de dólares.

Aunque *C. difficile* es considerado un patógeno nosocomial, actualmente se está produciendo un aumento muy significativo de la frecuencia e intensidad de estas infecciones en población general sana no hospitalizada, es decir brotes comunitarios, lo que hace necesario investigar acerca de otras fuentes de infección que puedan existir para el ser humano. Los últimos estudios demuestran que los animales domésticos podrían ser la fuente principal (2, 32).

3. Clostridium difficile

Los primeros datos de *C. difficile* son del año 1935, cuando Ivan C. Hall y Elizabeth O'Toole aíslan por primera vez un nuevo bacilo anaerobio a partir de heces de niños sanos recién nacidos (1, 17, 23, 30, 31). El nombre de la especie *Bacillus difficilis* fue elegido por su morfología bacilar, por ser anaerobio y formar esporas y, sobre todo, por la dificultad que supuso su cultivo y aislamiento (30).

En 1938, *Bacillus difficilis* es rebautizado como *C. difficile*, por Prévot (ICSB, 1976) y por tanto, trasladado al género *Clostridium* (1, 31). Durante las posteriores décadas *C. difficile* aparece en la literatura de forma esporádica en diferentes estudios sobre la especie humana pero no hubo evidencia de que *C. difficile* fuera patogénico (31).

Desde el comienzo del siglo XXI, ha habido un aumento de la incidencia y la gravedad de infección por *C. difficile* en humanos en todo el mundo (17). En estas últimas décadas *C. difficile* se ha convertido en la principal causa nosocomial de morbilidad, mortalidad y aumento de costes médicos (23).

C. difficile en animales se describió por primera vez y sin saberlo en 1968, cuando Small JD informó de un caso de enteritis en hámsteres de laboratorio después de la administración de antibióticos. Desde entonces, los hámsteres se han utilizado como modelo animal para probar la asociación de *C. difficile* con la colitis pseudomembranosa en los seres humanos. A partir de la década de los 70 se empiezan a publicar artículos relacionando *C. difficile* con diferentes especies de animales, la mayoría se han centrado en animales de producción (14, 43).

Posteriormente, *C. difficile* ha sido aislado en casi todos los mamíferos, incluyendo vacas, caballos, cerdos, perros, elefantes, aves y primates no humanos. En la actualidad existe cierto contraste con la investigación médica humana, donde los estudios se centran principalmente en el papel de *C. difficile* como causa de enfermedad, en cambio en animales se concentran en la presencia de la bacteria en animales sanos que pueden actuar como reservorios (14).

3.1. Descripción y patogenia de *Clostridium difficile*

C. difficile es un bacilo Gram positivo, anaerobio estricto y que mide aproximadamente 0'5x6µm. Puede habitar en el tracto digestivo y causar enfermedad gastrointestinal en muchas especies incluyendo humanos, caballos, cerdos, perros, gatos y animales de laboratorio (7, 12, 17, 20, 23). Una de sus características más importante es la formación de esporas, que le otorga resistencia frente a condiciones adversas (19) y le permite permanecer durante largos períodos de tiempo en el ambiente (29).

Se conocen más de 400 cepas de *C. difficile* pero solo aquellas que producen toxinas causan enfermedad (2, 17, 37). Se han descrito y caracterizado 3 toxinas: toxina A, toxina B y la toxina binaria (12, 13). La secreción de toxinas ha sido el factor de patogenicidad más estudiado.

Los ribotipos toxigénicos de *C. difficile* producen dos toxinas principales toxina A (enterotoxina) y toxina B (citotoxina), pero puede haber cepas que solo produzcan una de ellas o ninguna (17, 39).

Las toxinas A y B están codificadas por los genes *tcdA* y *tcdB*, respectivamente (12, 18). La toxina A altera la unión de las células de la mucosa con la membrana basal del colon y daña las vellosidades. La toxina B entra en la célula mediante endocitosis e induce la apoptosis. La toxina B es 1000 veces más potente citotóxicamente que la toxina A (37). Ambas estimulan los monocitos y los macrófagos, que a su vez liberan la interleucina 8, dando lugar a una infiltración con neutrófilos en el tejido. Sin embargo, la infección que producen las cepas toxigénicas de *C. difficile* puede ser asintomática, lo que implica que otros factores, incluyendo el ambiente dentro del intestino, sean importantes (2, 33).

A parte de estas dos toxinas mencionadas, algunas cepas de *C. difficile* producen la toxina binaria (CDT), como por ejemplo los ribotipos 027 y 078 (17, 39), que no está relacionada genética ni estructuralmente con las toxinas A y B (13). CDT está codificada por dos genes separados (*cdtA* y *cdtB*) que se encuentran fuera de la isla de patogenicidad cromosómica (fracción del ADN genómico de un microorganismo patógeno que le confiere como virulento) (13, 17, 18, 37). La relevancia clínica de esta toxina se está investigando pero se ha demostrado que favorece la colonización del microorganismo (37).

C. difficile causa enfermedad por la colonización de la mucosa intestinal y la producción de toxinas (40). Se requieren múltiples pasos para que la enfermedad se desarrolle (37). El hospedador tiene que ingerir las esporas que germinarán para dar lugar a las formas vegetativas, a continuación se tiene que producir la alteración de la microbiota intestinal normal, usualmente por antibióticos (23), ya que *C. difficile* no es capaz de multiplicarse si la flora intestinal está normal (33). Por último se producirá la colonización de la mucosa y la producción de toxinas (2).

3.2. Presentación clínica de *Clostridium difficile*

La infección por *C. difficile* es una enfermedad intestinal mediada por toxinas y las manifestaciones extraintestinales son raras. Los signos clínicos que provoca *C. difficile* son muy variables (17). La presentación en humanos puede variar desde asintomática hasta diarrea leve y síndromes de enfermedades más graves, incluyendo dolor abdominal, fiebre y leucocitosis. También se pueden apreciar lesiones inflamatorias y la formación de pseudomembranas en el colon, megacolon o perforación intestinal, sepsis, shock y muerte (33, 39).

El rol de *C. difficile* en las enfermedades gastrointestinales de los perros no está bien definido (43). La enfermedad más común asociada a *Clostridium* spp en perros es la colitis aguda o crónica (6). También se ha descrito la presencia de toxinas producidas por *C. difficile* asociada a diarrea (6, 17, 21) o diarrea hemorrágica (6, 12).

3.3. Epidemiología

3.3.1. Prevalencia

La prevalencia de *C. difficile* es muy heterogénea, ya que su papel asociado a diarrea canina no está claro. Clooten *et al.* (7) realizaron en 2007 un estudio cuyos objetivos eran determinar la prevalencia de la colonización intestinal de *C. difficile* en perros y gatos hospitalizados. En este estudio se reflejó que la tasa de detección de *C. difficile* en perros sanos, tanto de cepas toxigénicas como no toxigénicas, oscila entre 0 a 10%. En perros ingresados en hospitales veterinarios es del 18-40 % y en perros que visitan hospitales humanos alcanza un 58%.

Otro estudio realizado por Weese *et al.* (40) en 2009 para evaluar la presencia de *C. difficile* en perros y en el ambiente doméstico indicó que el 10% de los perros estaban colonizados por la bacteria y que el 31% de los hogares estaban contaminados con sus esporas, lo que sugiere que la exposición a este patógeno puede ser común.

Murphy *et al.* (25) describieron una proporción importante de hospitales veterinarios con hisopos ambientales positivos para *C. difficile*, aunque la relevancia de la bacteria en las pequeñas clínicas veterinarias es incierta.

3.3.2. Transmisión interespecie y factores de riesgo

La mayoría de estudios sobre *C. difficile* se basan en los seres humanos, pero esta bacteria también se ha descrito como comensal o patógeno en numerosas especies de animales. Se ha cuestionado cuál puede ser la fuente de exposición para los humanos, aparte de los hospitales, y se ha determinado que podría ser el contacto directo o indirecto con animales (14).

Muchos de los ribotipos de *C. difficile* aislados en perros y gatos son indistinguibles de los encontrados en seres humanos, por eso ha aumentado la preocupación sobre la transmisión zoonótica (40). Arroyo *et al.* (2) aislaron *C. difficile* a partir de muestras de perro (n=92), caballo (n=21) y humano (n=20), y mediante PCR se identificaron 23 ribotipos diferentes. De estos ribotipos, se identificaron 9 en perros, 12 en caballos y 7 en humanos de los cuales el 25% eran indistinguibles entre especies.

La variación de la prevalencia de cepas con el gen CDT podría ser una indicación adicional de superposición de ribotipos de *C. difficile* entre humanos y animales. En los primeros estudios sobre CDT, la prevalencia de cepas positivas para esta toxina en aislados humanos fue relativamente baja (entre 1,6% y 10%). Por el contrario, la prevalencia de cepas CDT positivas entre los animales fue mucho mayor, oscilando entre el 23% y el 100%, con una menor prevalencia en caballos (hasta el 43%), seguido por los lechones (hasta el 83%), y por el ganado (hasta el 100%). Originalmente, parecía que eran dos poblaciones más bien separadas de *C. difficile* y que las cepas CDT positivas eran más propensas a estar asociadas con los animales que con los seres humanos. Sin embargo, en los últimos años, la proporción de cepas CDT positivas en la población humana ha aumentado gradualmente (32).

Para poder explicar la importancia de *C. difficile* en la comunidad se han determinado cuatro fuentes de transmisión: el medio ambiente, el contacto con personas, el contacto con animales infectados o portadores y los alimentos (14, 26). Una de las habilidades de *C. difficile* es la formación de esporas que pueden sobrevivir en el medio ambiente durante meses (14). En ciertos ambientes se sabe que la presencia de esporas ya está establecida como son los hospitales de humana o las explotaciones agrícolas de cerdos. La prevalencia de *C. difficile* en heces de lechones recién nacidos puede ser del 100%, pero no hay pruebas que demuestren la transmisión vertical en cerdos lo que hace pensar que estos animales se infectan por la presencia de esporas en el ambiente que son capaces de transportarse por vía aerógena o por el personal de la granja (14).

Si los animales son de hecho una fuente potencial de infección de *C. difficile* para los humanos, los alimentos también podrían ser una de las vías de transmisión (32). *C. difficile* ha sido aislado a partir de animales vivos, pero también se ha demostrado su presencia en alimentos, lo que supone un factor de riesgo en la transmisión de animales a humanos. En los últimos años se han publicado diferentes estudios sobre la presencia de *C. difficile* en carne, pescado o vegetales. De los estudios realizados en Europa, la prevalencias son bajas, en carne se detectó *C. difficile* en un 3% de las muestras. Pero en Estados Unidos y Canadá el porcentaje de muestras infectadas asciende hasta el 42% en algunos estudios (14). Por otro lado se ha demostrado que aproximadamente el 20% de las muestras de carne molida al por menor u otros productos cárnicos contienen *C. difficile* (32).

3.5. Diagnóstico

Como en todas las patologías, ante un caso de diarrea es preciso diferenciar el diagnóstico clínico del diagnóstico en laboratorio. Como ya se ha comentado anteriormente el diagnóstico clínico de *C. difficile* en perros es complicado debido a que la sintomatología no está claramente determinada. Por otro lado, el diagnóstico de laboratorio de *C. difficile* se basa en la detección de toxinas o en el aislamiento de cepas toxigénicas a partir de muestras de heces. Sin embargo, estos resultados deben combinarse con los hallazgos clínicos para diagnosticar la enfermedad (1, 9). El diagnóstico diferencial de *C. difficile* debe considerarse en cualquier animal diarreico, pero la información objetiva sobre métodos óptimos para el diagnóstico de esta bacteria en perros y gatos es limitada (39).

3.5.1. Tipo de muestra, transporte y almacenamiento

Para poder realizar un correcto diagnóstico, sólo se deberían procesar las heces no formadas y frescas. La actividad citotóxica se pierde muy rápidamente, lo que significa que si el análisis de muestras frescas no es posible deben almacenarse a 4°C o menos (9, 31). Algunos autores afirman que tras la congelación no se observa una pérdida de esporas, lo que permite almacenar las muestras más tiempo hasta su procesamiento (11).

Una guía publicada recientemente sobre el uso de la microbiología para el diagnóstico de enfermedades infecciosas (3) pone de relieve la importancia de la recogida, la temperatura y el tiempo de transporte, ya que la interpretación de los resultados dependerá de la calidad de

los especímenes recibidos para el análisis. En concreto, con respecto a *C. difficile*, se recomienda que las muestras de heces se reciban en recipientes estériles cerrados y se mantengan a temperatura ambiente durante un máximo de 2 horas, sobre todo si el objetivo es detectar toxinas ya que éstas son muy lábiles (3).

3.5.2. Aislamiento microbiológico: Cultivo

El cultivo microbiológico se reconoce como el método más sensible para la detección de *C. difficile*, pero su especificidad es baja debido a que la tasa de transporte asintomático de *C. difficile* en perros, igual que en humanos, puede ser elevada (9, 31). Además el cultivo es un método de diagnóstico relativamente fácil para los laboratorios que dispongan de personal con la experiencia adecuada y con instalaciones para el cultivo anaeróbico (39).

El aislamiento de *C. difficile* supone una serie de retos debido a su escasa capacidad de competencia frente a otros organismos de la flora intestinal. Las soluciones propuestas son: por un lado favorecer el crecimiento de *C. difficile* mediante medios selectivos o de enriquecimiento y, por otro, eliminar la flora acompañante aprovechando la capacidad de formación de esporas de este microorganismo (31)

El primer medio selectivo utilizado para el aislamiento de *C. difficile* fue diseñado por George *et al.* en 1979, el agar cicloserina-cefoxitina fructosa (CCF). Este medio de cultivo se basa en la capacidad de la cicloserina y cefoxitina de inhibir el crecimiento de la flora acompañante (1, 31). Las colonias de *C. difficile* se reconocen fácilmente en este medio cuando se observan bajo el microscopio. Tienen una apariencia similar al vidrio molido, liberan un olor similar al estiércol de caballo y revelan una fluorescencia amarillo-verde bajo iluminación ultravioleta (39).

La formulación original del medio CCF ha sido ampliamente modificada, incluida la sustitución de la yema de huevo por la sangre (9). También se ha demostrado que la adición de 1 g de taurocolato, desoxicolato o colato al medio CCF induce la germinación de esporas de *C. difficile* (11, 15).

La segunda estrategia se basa en eliminar la flora competidora, dado que *C. difficile* tiene una alta capacidad de supervivencia de la forma de resistencia (esporas). Los métodos descritos son el choque térmico y el choque de etanol (1).

Delmée *et al.* (9) y Marler *et al.* (22) concluyen que un pretratamiento de las muestras con choque de etanol o de calor se ha asociado con un aumento de la sensibilidad. Pero en otros casos se considera que lo que mejora la sensibilidad del método es un aumento en el tiempo de enriquecimiento (34). También hay quien apunta que el uso de ambos métodos aumenta la recuperación de *C. difficile* hasta un 96% (22).

El papel principal del cultivo en el diagnóstico es descartar *C. difficile*, ya que un resultado negativo de una muestra de heces correctamente recogida, manipulada y procesada por un laboratorio experimentado tiene un excelente valor predictivo negativo. Los resultados del cultivo positivo pueden ser útiles como una prueba complementaria para proporcionar mayor confianza en los ensayos positivos de la toxina fecal. El cultivo es muy útil para estudios epidemiológicos (39).

3.5.3. Detección por métodos moleculares

En las últimas décadas ha aumentado el desarrollo de métodos basados en la biología molecular para identificar este microorganismo. La principal ventaja es su alta especificidad y sensibilidad en humanos (1). Estos métodos se basan principalmente en reacciones de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) en las que se amplifica un fragmento concreto de un gen diana específico del microorganismo. Se han descrito múltiples reacciones para estudiar los genes que codifican las cepas de *C. difficile* (12).

Esta técnica está muy desarrollada en humanos, pero en animales tiene limitaciones. Actualmente no hay pruebas de PCR validadas para *C. difficile* en animales y ninguna evidencia de que estas pruebas sean útiles clínicamente como pruebas únicas. El uso de PCR directa para el diagnóstico de *C. difficile* en perros y gatos no se recomienda (17).

La PCR puede ser útil conjuntamente con el cultivo. La prueba en aislados de *C. difficile* para genes de toxina puede diferenciar entre cepas toxigénicas y no toxigénicas, mejorando así la

especificidad del cultivo pero teniendo aún las limitaciones en especificidad asociadas con la presencia de cepas toxigénicas en las heces de un pequeño porcentaje de individuos sanos (2, 12).

3.5.4. Técnicas inmunológicas

Se dispone de técnicas inmunológicas comerciales para la detección de la toxina A y/o B, para la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH) y también para combinaciones de ambas (toxinas y GDH) (31).

Actualmente encontramos en el mercado muchos ELISA disponibles comercialmente para la detección de toxinas A o toxinas A y/o B en heces. Los ELISA son rápidos, tienen buena sensibilidad y especificidad cuando se usan con especímenes humanos (88% - 97% y hasta 100%), sin embargo, el rendimiento en perros es mucho menor. A pesar de esta limitación, los ELISA se utilizan comúnmente para el diagnóstico de *C. difficile* en perros y gatos, debido a su disponibilidad, facilidad, coste y falta de otras opciones. Los resultados positivos de ELISA, particularmente cuando se combinan con un antígeno común positivo o un cultivo positivo, son sugestivos de *C. difficile*, sin embargo, la baja sensibilidad de algunos ensayos significa que el valor predictivo negativo de ELISA es marginal (31, 39).

3.6. Tratamiento

No hay información objetiva sobre el tratamiento para enteritis por *C. difficile* en perros o gatos. En general, se trata de forma similar a cualquier otra enfermedad diarreica con terapia de apoyo. Si la diarrea está asociada a la terapia antimicrobiana, puede ser suficiente con el cese de la administración (39, 40).

El tratamiento antimicrobiano específico dirigido contra el *C. difficile* entérico se administra habitualmente, aunque no está claro si se necesita o no en todos los casos y muchas infecciones pueden ser autolimitantes. El metronidazol (perros: 10-15 mg / kg por vía oral cada 8-12 horas durante 5 días, gatos: 62,5 mg cada 12 horas durante 5 días) tiende a ser el fármaco de elección. Se puede utilizar metronidazol intravenoso (15 mg / kg cada 12 horas durante 5 días) si la terapia oral no es una opción (39).

En humanos, también se utiliza metronidazol o vancomicina oral. Sin embargo, algunos estudios consideran que esta última es inapropiada en perros y gatos debido a la falta de evidencia de necesidad o eficacia en animales. Otras opciones de tratamiento utilizadas por algunos veterinarios incluyen adsorbentes intestinales, probióticos y cambios en la dieta (17, 23, 37).

El tratamiento de perros y gatos aparentemente sanos no está indicado, ya que no hay evidencia de que el tratamiento en estos animales pueda eliminar la colonización de la bacteria (39).

El tratamiento de las mascotas en los hogares donde los seres humanos están infectados por *C. difficile* tampoco está indicado. Si hay alguna sospecha de que las mascotas pueden estar involucradas en la transmisión, los esfuerzos están mejor enfocados en las prácticas de control de la infección. La duración del tratamiento debe depender de la respuesta clínica, no de los resultados de laboratorio, y no hay indicación de repetir las pruebas como base para determinar la duración del tratamiento (39).

3.7. *Clostridium difficile* y el uso de antibióticos

La relación que hay entre el uso de antibióticos y la colonización intestinal de *C. difficile* no está claramente determinada en todas las especies. En el caso de los humanos, siempre se ha relacionado *C. difficile* con el uso de antibióticos pero en perros no hay conclusiones claras (33).

En humanos, la susceptibilidad antibiótica de *C. difficile* está cambiando. Históricamente la mayoría de los ribotipos que afectaban a humanos eran resistentes a clindamicina pero actualmente se han encontrado cepas que además han desarrollado una resistencia adquirida a las fluoroquinolonas. Se han aislado cepas del ribotipo 027 con estas características en tres países europeos (Francia, Irlanda y Suiza). En relación a los antibióticos que se utilizan actualmente para tratar *C. difficile* (metronidazol y vancomicina) la reducción de la respuesta clínica al tratamiento no se ha atribuido a la resistencia al fármaco sino a un aumento de la concentración mínima inhibitoria (33)

En el mundo de la veterinaria hay múltiples artículos publicados con informaciones contradictorias respecto a la asociación de la infección con el uso de antibióticos. Un estudio realizado en 2007 por Clooten *et al.* (7) identificaron que la administración de antimicrobianos antes del ingreso en un hospital, o la administración de fármacos inmunosupresores durante la hospitalización, son factores de riesgo para la colonización hospitalaria de *C. difficile*. Por el contrario los estudios publicados por Rodriguez *et al.* (31) y Weese *et al.* (40) describieron que la infección de *C. difficile* en perros no está tan asociada a los hospitales o a la terapia antimicrobiana como en el caso de los humanos.

Riley *et al.* 1991 (28) realizaron un estudio con perros que acudían al veterinario y determinaron que existía una diferencia estadísticamente significativa en las tasas de aislamiento de *C. difficile* entre los animales que habían recibido la terapia con antibióticos y los que no lo hicieron. La tasa de aislamiento de *C. difficile* de los animales que recibieron antibióticos (más comúnmente una combinación de penicilina y estreptomicina) fue el doble que en los animales que no recibieron antibióticos. Por lo tanto, en este estudio la situación en animales parece ser análoga a la situación en seres humanos, donde la terapia con antibióticos es el principal factor que predispone a la colonización o infección por *C. difficile*.

4. Objetivos

- Determinar la prevalencia de *C. difficile* en perros con y sin diarrea y comparar si hay diferencias entre perros hospitalizados y sanos.
- Analizar si la infección por *C. difficile* está relacionada con el uso de antibióticos u otros fármacos en perros.
- Determinar la presencia de otros agentes zoonóticos en perros hospitalizados y sanos y su perfil de antibioresistencia.

5. Material y métodos

5.1. Población muestreada

Para la realización de este estudio experimental se obtuvieron muestras a partir de perros hospitalizados en el Hospital Clínic Veterinari de la Universidad Autónoma de Barcelona situado en Bellaterra (Barcelona) y a partir de perros sanos de Barcelona y alrededores seleccionados aleatoriamente.

Se recogieron un total de 25 muestras de animales hospitalizados que sufrían un cuadro diarreico. En el caso de los perros sanos también se muestrearon un total de 25 animales y como criterios de inclusión se tuvo en cuenta la ausencia de enfermedad y que no hubieran sido tratados con antibiótico durante el último mes.

Los animales hospitalizados tenían edades de entre 2 meses a 15 años y los animales sanos de 4 meses a 11 años. Las muestras se recogieron por un periodo de tiempo comprendido entre febrero y mayo.

5.2. Muestras

Todas las muestras se obtuvieron del recto con un hisopo estéril o bien de heces cuando fue posible. En el momento de la obtención de la muestra, se rellenó un cuestionario con información sobre el individuo (anexo 1).

Todas las muestras fueron conservadas en refrigeración inmediatamente después de su recogida y fueron procesadas en el laboratorio en menos de 24 horas.

5.3. Aislamiento microbiológico

El número total de muestras sometidas al aislamiento microbiológico fue de 50. Se realizó aislamiento en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis.

El aislamiento microbiológico general consistió en sembrar la muestra en Agar Sangre (*Difco*) y Agar MacConkey (*Oxoid*) en condiciones de aerobiosis a 37°C durante 24 horas. El medio Agar Sangre es un medio no selectivo, en cambio el Agar MacConkey es un medio selectivo diferencial utilizado para el aislamiento y diferenciación de bacilos Gram negativo

fermentadores y no fermentadores de lactosa. Las muestras que dieron un resultado microbiológico puro fueron sembradas en medios no selectivos (Agar sangre o Agar TSA) para realizar posteriormente diferentes pruebas para su identificación: tinción de Gram, oxidasa y catalasa y otras pruebas bioquímicas convencionales (SIM, TSI, citrato, fenilalanina, urea y rojo metilo). Las colonias puras aisladas en cultivo puro se congelaron a -80°C en un medio de glicerol al 1% y el hisopo original se conservó en una solución de tampón fosfato salino a -80°C para su posterior procesamiento para diagnóstico molecular.

En este estudio también se realizó aislamiento microbiológico selectivo para *C. difficile* (medio base Cat. 1447 + suplemento Cat. 6061, Lab. Conda) en anaerobiosis estricta (BD GasPak™ EZ Container Systems, BD Diagnostics) a 37°C durante 48 horas. Previamente al cultivo en medio selectivo, se planteó realizar un choque térmico siguiendo el protocolo descrito por Janezic *et al.* 2016 (15), para conseguir la germinación de la esporas. A partir de las muestras de hisopos se hicieron alícuotas de 0,2 ml del PBS y se impregnó el hisopo original diluyéndolo también con tampón fosfato (1:1). A continuación se inició el choque térmico a 70°C durante 20 minutos y se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos para recuperar el pellet. Al realizar este protocolo a partir de hisopos rectales cantidad de materia sólida era pequeña y la recuperación del pellet no siempre se podía realizar, además no siempre fue posible obtener dos hisopos (uno para diagnóstico microbiológico y otro para diagnóstico molecular). Por ello se procedió a la siembra de la muestra sin la aplicación del tratamiento.

5.4. Diagnóstico molecular

El número total de muestras sometidas al diagnóstico molecular fue de 50 y el proceso constó de tres fases, explicadas a continuación:

La primera parte del proceso consistió en la extracción de ADN a partir de los hisopos originales conservados en PBS a -80°C, mediante el “*QIAamp DNA Stool Mini Kit*” siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Como control positivo de la extracción se utilizó una muestra positiva de *C. difficile* aislado de porcino, proporcionada por el laboratorio de diagnóstico de enfermedades infecciosas de la Universidad Autónoma de Barcelona, y como control negativo agua destilada estéril.

La siguiente parte del proceso fue la PCR (*Polymerase chain reaction*), que se llevó a cabo para la amplificación de los genes que codifican las toxina A (*tcdA*) y la toxina B (*tcdB*) de *C. difficile*. La PCR se llevó a cabo siguiendo el protocolo previamente descrito por Persson *et al.* (27), con algunas modificaciones de las cantidades y puesta a punto previamente por el departamento de Enfermedades Infecciosas de la Universidad Autónoma de Barcelona.

A partir de la solución obtenida de la extracción de ADN se tomaron 2,5 µl de DNA problema y se completó con un volumen de 22,5 µl de la Mix de la PCR por muestra (buffers, dNTPs, MgCl₂, Primers (F y R), AmpliTaq DNA polimerasa) y agua destilada, el volumen total es de 25µl. Las cantidades de cada reactivo se describen en la tabla 1, éstas se multiplicaban por el número de muestras añadiendo una extra como margen de error de pipeteo.

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

Reactivos	Concentración	Volumen (µl)
H ₂ O	-	15,9
Buffer	1xPCR	2,5
dNTPs	1,2µM	0,3
MgCl ₂	5mM	1,5
Primer (F y R)*	1,5 µM	1
AmpliTaq DNA polimerasa	1,5U	0,3
DNA	-	2,5
Total	-	25

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

Los primers usados (Secuencia 5' → 3') fueron (27):

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

La reacción de amplificación seguida fue:

1. Desnaturalización 10 minutos a 94°C
2. Amplificación 30 ciclos 50 segundo a 94°C
3. 40 segundos a 54°C
4. 50 segundos a 72 °C
5. 3 minutos a 72 °C

La última etapa fue la electroforesis en gel de agarosa al 2% en un tampón TrisBorato EDTA (TBE). Los resultados de la amplificación se observaron tras someterlos a una electroforesis a 100V durante 30 minutos. Los fragmentos de amplificación se tiñeron durante 10 minutos con bromuro de etidio y se observaron bajo luz UV.

6. Resultados

6.1. Prevalencia de *Clostridium difficile*

En este estudio los dos métodos utilizados para conocer la prevalencia de *C. difficile* fueron el aislamiento microbiológico y la PCR aplicados a 25 muestras de perros hospitalizados con diarrea y 25 perros sanos.

En el aislamiento microbiológico en medio selectivo no se obtuvo ningún aislado de *C. difficile*. Asimismo, a partir de la PCR los resultados fueron negativos en todas las muestras para el gen que codifica la toxina A (tcdA) y el gen que codifica la toxina B (tcdB) de *C. difficile*.

6.2. Prevalencia de otras bacterias de interés zoonótico

A partir de los medios de cultivo sembrados en condiciones aerobiosis se obtuvieron aislados de otras bacterias y se procesaron aquellos cultivos que presentaban un crecimiento puro o una población homogénea mayoritaria en la placa.

A partir de las 25 muestra rectales de los perros hospitalizados, en medio no selectivo (Agar Sangre) se obtuvieron un 8% de cultivos puros (n=2), un 68% de cultivos mixtos (2 o más colonias no identificadas y morfológicamente diferentes) (n=17) y un 24% sin crecimiento (n=6). En el medio selectivo MacConkey los resultados fueron un 52% de cultivos puros (n=13), un 8% de cultivos mixtos (n=2) y un 40% de cultivos sin crecimiento. El microorganismo más frecuente fue *Escherichia coli* con un total de 8 cultivos puros en medio selectivo, un 32% del total de muestras de perros hospitalizados. En el resto de cultivos puros se aisló *Proteus spp* y *Klebsiella pneumoniae*.

El resultado de las 25 muestras rectales de perros sanos en medio de cultivo selectivo fueron 80% en cultivo mixto (n=20), 20% sin crecimiento (n=5) y no se obtuvo ningún cultivo puro. En medio selectivo se obtuvo un 56% de cultivos puros (n=14), un 20% de cultivo mixto (n=5) y un 24% sin crecimiento (n=6). Como en el caso anterior, el microorganismo más frecuente en medio selectivo fue *Escherichia coli* en un total de 13 cultivos, un 52% del total de las muestras obtenidas a partir de perros sanos. En el cultivo puro restante se aisló *Proteus spp.*

Debido al mayor número de aislados de *Escherichia coli* que se obtuvieron respecto a otros microorganismos se decidió valorar el perfil de resistencia antimicrobiana de esta bacteria. Para ello se utilizó el método de difusión en agar según Kirby Bauer, consistente en la inoculación de una suspensión 0,5 McFarland de cada una de las cepas en una placa de Mueller Hinton. En cada antibiograma se incluyeron los siguientes antibióticos: ampicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, cefalexina, ceftiofur, enrofloxacino, marbofloxacino, ciprofloxacino, trimetoprim-sulfametoxazol, gentamicina, tobramicina, amikacina, tetraciclina y doxiciclina.

En perros hospitalizados el perfil de resistencia antimicrobiana mostró que el 100% de las 8 cepas de *E.coli* obtenidas en cultivo puro eran resistentes a 3 o más antimicrobianos. Los mayores porcentajes de resistencia se encontraron en la ampicilina (100%), el trimetoprim-sulfametoxazol (75%) y en tercer lugar la cefalexina (62,5%) (Figura 1).

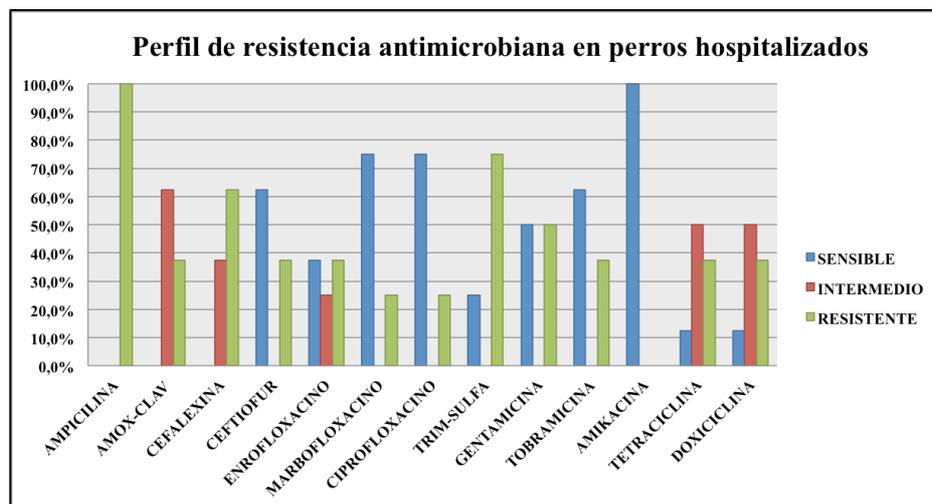


Figura 1. Perfil de sensibilidad de los antibiogramas de los *E. coli* aislados en cultivo puro (n=8) a partir de las muestras de perros hospitalizados.

En perros sanos el perfil de resistencia observado fue muy diferente ya que solo el 15,4% (2/13) de los *E. coli* aislados en cultivo puro eran resistentes a 3 o más antimicrobianos. Sin embargo en una de las cepas se observó resistencia a todos los antimicrobianos excepto a la amikacina. Los mayores porcentajes de resistencia se encontraron en la ampicilina (100%), la amoxicilina- ácido clavulánico (82,4%) y la tetraciclina (15,4%) (Figura 2).

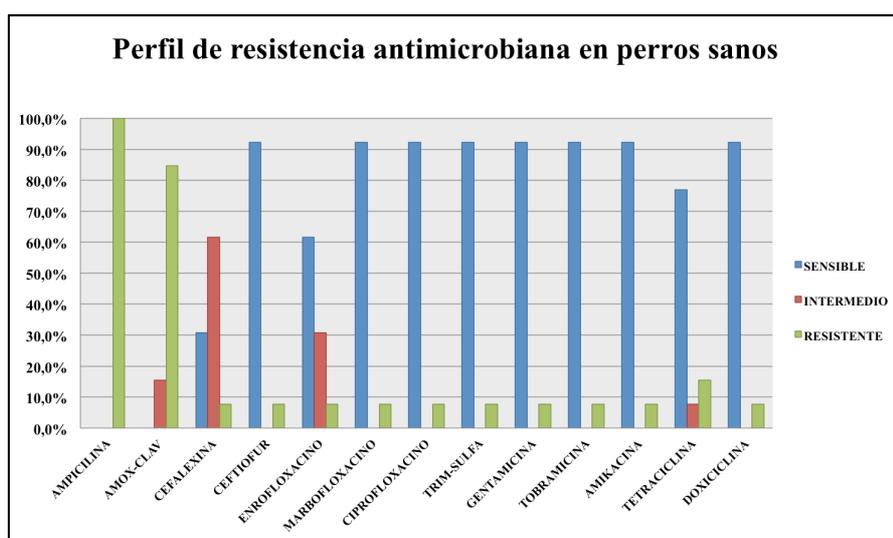


Figura 2. Perfil de sensibilidad de los antibiogramas de los *E. coli* aislados en cultivo puro (n=13) a partir de las muestras de perros sanos.

7. Discusión

Como se ha demostrado en diferentes estudios *C. difficile* coloniza el tracto digestivo de un elevado número de especies: humanos, cerdos, bóvidos, caballos, perros, aves o roedores (7, 12, 17, 20, 23). El principal objetivo de este estudio eran determinar la prevalencia de *C. difficile* en perros hospitalizados y en perros sanos y realizar una comparación a partir de los resultados obtenidos, aunque en ambos casos la prevalencia obtenida fue del 0%. En estudios previos se la descrito de forma generalizada una prevalencia para perros sanos era del 0-10% (7, 8, 41, 42) y en perros hospitalizados entre el 18-40% (7, 28). El amplio rango de prevalencia en perros hospitalizados cuestiona si la hospitalización es un factor de riesgo para la colonización de *C. difficile* en perros, tal y como se ha demostrado en humanos.

En humanos la incidencia intrahospitalaria en Europa es muy variable entre países y la información sobre la incidencia de *C. difficile* es limitada. Una encuesta europea realizada en 212 hospitales por el *European Study Group of C. difficile (ESGCD)* en el Reino Unido, Francia, Bélgica, Dinamarca, Alemania, Italia y España (4) mostró que la incidencia variaba considerablemente, dependiendo de las estrategias del estudio y de las pruebas diagnósticas utilizadas. La incidencia fue de 11 casos por cada 10.000 ingresos. Por el contrario, los datos de estudios en los Estados Unidos mostraron que la incidencia entre los pacientes hospitalizados es más alta, oscilando entre 10 y 200 por cada 10.000 ingresos (29).

En el caso de hospitales veterinarios encontramos pocos estudios realizados en Europa, se destaca un estudio comparativo entre humanos y animales de Koene et al. (18) en el que se muestra una prevalencia intrahospitalaria del 25% en perros diarreicos hospitalizados en el Hospital Veterinario de Utrecht (Holanda).

En Estados Unidos, en un estudio realizado por Clooten *et al.* (7) en Ontario se aisló *C. difficile* en 73/402 (18%) animales, de los cuales 3/42 (7,1%) en gatos y 70/360 (19%) en perros. Las tasas de colonización se fueron incrementando progresivamente con la duración de la hospitalización. En este estudio se observó un elevado porcentaje de perros colonizados por *C. difficile* en el momento de la admisión en el hospital, esto podría ser debido al papel de los perros como reservorio y por ello podrían ser una posible fuente de infección importante para la especie humana.

La terapia antimicrobiana no ha sido identificada como un factor de riesgo en perros, en contraste con los humanos donde encontramos diferentes estudios que demuestran que es un fuerte factor de riesgo para la colonización de *C. difficile* (5). En el presente estudio también se pretendía analizar si había relación entre la terapia antimicrobiana y la colonización de *C. difficile* en perros pero no ha sido posible determinar, debido a que 96% de los perros hospitalizados estaban en tratamiento antimicrobiano y el 100% de los perros sanos no habían estado en los últimos meses y los resultados fueron negativos para ambos grupos.

Otro factor de riesgo que favorece la colonización de *C. difficile* es la edad. En un estudio realizado en 2016 por Hussain *et al.* (15) se demostró que las mayores prevalencias de *C. difficile* se encontraban en cerdos de 4 a 8 días, en terneros de 5 a 30 días y pollos de 1 a 2 semanas. Estos resultados muestran que el factor de riesgo en animales está en aquellos de

menor edad, al contrario que en la especie humana donde las mayores prevalencias se encuentran en personas de edad avanzada (23). En nuestro estudio se incluyeron animales de todas las edades en los dos grupos (perros hospitalizados y perros sanos) con el objetivo de comprobar si este podría ser un factor de riesgo, aunque la ausencia de aislamiento de *C. difficile* no ha permitido determinarlo.

Actualmente no está claro si *C. difficile* causa signos clínicos en perros, por ello uno de los objetivos era determinar si *C. difficile* estaba relacionado con cuadros de diarrea. Para ello sólo se tomaron muestras de perros hospitalizados con diarrea. En un estudio realizado en Suecia por Wetterwik *et al* en 2013 (43), se comparó la colonización de *C. difficile* en animales sanos y en animales con diarrea. Se obtuvieron muestras de 50 perros sanos y 20 perros con diarrea. El protocolo de diagnóstico fue muy semejante al seguido en este estudio y se consiguió aislar *C. difficile* en 2/50 (4%) muestras de perros sanos y en 2/20 (10%) muestras de perros enfermos. En perros diarreicos el ribotipo aislado fue 014 y en perros sanos el ribotipo 010 y el 009. Aunque el tamaño de la muestra de este estudio es semejante al nuestro, el tiempo de incubación de cultivo microbiológico en anaerobiosis fue de 10 días mientras que en nuestro caso se limitó a 48 horas, lo cual puede haber sido un condicionante para nuestros resultados.

Como ya se ha comentado anteriormente el diagnóstico de *C. difficile* es complejo y se necesita un choque térmico previo al cultivo y una incubación en condiciones de anaerobiosis y durante un periodo de tiempo que varía de 48h a 10 días dependiendo de los estudios (7, 15, 18, 40, 43). El choque térmico es un proceso sencillo si las muestras obtenidas son heces pero a partir de hisopos rectales el procedimiento es complejo, además los materiales e infraestructuras disponibles para realizar el presente estudio no permitía periodos de incubación superiores a 48 horas.

Finalmente, cabe destacar la elevada prevalencia de bacterias multirresistentes (MR), concretamente *Escherichia coli* en perros hospitalizados. De los *E. coli* obtenidos en cultivo puro (13/25), todos fueron resistentes a 3 o más antimicrobianos. En un estudio publicado por Wedley *et al.* (38) en 2017, también demostraron que es frecuente aislar *E. coli* MR en perros que visitan hospitales veterinarios y que los mayores porcentajes de resistencia se muestran en ampicilina, tetraciclinas y trimetropin-sulfametoxazol. Estos resultados pueden atribuirse a numerosos determinantes responsables de crear nuevas resistencias, entre ellos el elevado uso

que se hace de estos fármacos y la facilidad de transmisión de genes de resistencia a otra flora comensal, ya sea del ambiente o en el propio organismo.

Los resultados que encontramos en animales sanos son menos alarmantes, aun así el 15,4% de los *E. coli* aislados eran MR. En 2015 Schmidt *et al.* (35) realizaron un estudio para determinar la prevalencia de resistencia antimicrobiana en *E. coli* en perros de raza Labradores sanos, y examinar la asociación con los factores de riesgo. La prevalencia de *E. coli* MR aislados fue de 30% (n=73). Esta elevada prevalencia se relacionó con el estrecho contacto con otros perros o con humanos, y por lo tanto la fácil transmisión de resistencias antimicrobianas, y también con el consumo de carne cruda, principalmente de ave.

En el presente estudio ha sido complicado determinar las vías de transmisión de estas resistencias. Hay que destacar que unos de los perros sanos mostró un perfil de resistencia a todos los antimicrobianos analizados excepto a la amikacina y este perro en concreto visitaba a diario un hospital veterinario pero sin recibir tratamiento. La adquisición de estas resistencias antimicrobianas podría deberse al ambiente o a la transmisión entre hospedadores.

El incremento de bacterias MR a antimicrobianos de uso convencional es uno de los mayores problemas a los que se enfrenta la salud pública y animal (42). Los perros son un importante reservorio de bacterias MR y el conocimiento de los factores de riesgo asociados a la transmisión de estas resistencias permitirá un mejor manejo. Es importante que los veterinarios informen a los propietarios sobre el correcto uso de los antimicrobianos y de otros posibles factores como por ejemplo la alimentación con carne cruda.

8. Conclusiones

1. No se ha obtenido ningún resultado positivo de *C. difficile* en la población canina de la región geográfica estudiada ni por aislamiento microbiológico específico ni por detección por PCR de las toxinas tcdA y tcdB.
2. Se observa un prevalencia de colonización de *C. difficile* más baja de la esperada en la población canina de la región geográfica estudiada, esto puede ser debido al tamaño de la muestra, el tipo de muestra obtenido o el método de diagnóstico realizado.

3. Se ha detectado la presencia de cepas de *E. coli* multirresistentes en la población canina de la región geográfica estudiada, incluyendo antimicrobianos de uso generalizado en veterinaria y en humana lo que podría suponer un riesgo para la salud pública.
4. La prevalencia de cepas de *E. coli* multirresistentes en perros hospitalizados ha sido del 100% mientras que en perros sanos ha resultado ser del 15% en la región geográfica estudiada. Estas diferencias pueden estar relacionadas con un mayor uso de antimicrobianos entre la población de perros con diarrea.

9. Bibliografía

1. Alderete A (2011). "*Clostridium difficile*": prevalencia e importancia ecológica en animales domésticos y fauna salvaje. Universidad Complutense de Madrid.
2. Arroyo LG, Kruth SA, Willey BM, Staempfli HR, Low DE, Weese JS (2005). PCR ribotyping of *Clostridium difficile* isolates originating from human and animal sources. *Journal of Medical Microbiology*, 55: 163-165.
3. Baron EJ, Miller JM, Weinstein MP, Richter SS, Gilligan PH, Thomson RB Jr, Bourbeau P, Carroll KC, Kehl SC, Dunne WM, Robinson-Dunn B, Schwartzman JD, Chapin KC, Snyder JW, Forbes BA, Patel R, Rosenblatt JE, Pritt BS (2013). A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 213 recommendations by the Infectious Disease Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM). *Clinical Microbiology and Infection*. 57: e22- e121.
4. Bauer MP, Notermans DW, van Benthem BHB, Brazier JS, Wilcox MH, Rupnik M, Monnet DL, van Dissel JT, Kuijper ET (2011). *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey. *Lancet*. 377: 63–73.
5. Bignardi GE (1998). Risk factors for *Clostridium difficile* infection. *Journal of Hospital Infection*. 40: 1–15.
6. Cave NJ, Marks SL, Kass PH, Melli AC, Brophy MA (2002). Evaluation of a routine diagnostic fecal panel for dogs with diarrhea. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 221: 52-59.

7. Clooten J, Kruth S, Arroyo L, Weese JS (2007). Prevalence and risk factors for *Clostridium difficile* colonization in dogs and cats hospitalized in a intensive care unit. *Veterinary Microbiology*. 129: 209-214.
8. Dahms C, Hübner N-O, Wilke F, Kramer A (2014). Mini-review: Epidemiology and zoonotic potential of multiresistant bacteria and *Clostridium difficile* in livestock and food. *GMS Hygiene and Infection*. 9: 1-16
9. Delmée M (2001). Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* disease. *Clinical Microbiology and Infection*. 7: 411-416.
10. Freeman J, Bauer MP, Baines SD, Corver J, Fawley WN, Goorhuis B, Kuijper EJ, Wilcox MH (2010). The changing epidemiology of *Clostridium difficile* infections. *Journal of Clinical Microbiology*. 23: 529–549.
11. Freeman J, Wilcox MH (2003). The effects of storage conditions on viability of *Clostridium difficile* vegetative cells and spores and toxin activity in human faeces. *Journal of clinical pathology*. 56: 126-128.
12. Ghavidel M, Salari Sedigh H, Razmyar, J (2016). Isolation of *Clostridium difficile* and molecular detection of binary and A/B toxins in faeces of dogs. *Iranian Journal of Veterinary Research*. 57: 273-276.
13. Gonçalves C, Decré D, Barbut F, Burghoffer B, Petit JC (2004). Prevalence and characterization of a binary toxin (actin-specific ADP- ribosyltransferase) from *Clostridium difficile*. *Journal of Clinical Microbiology*. 42: 1933–1939.
14. Hensgens MPM, Keessen EC, Squire MM, Riley TV, Koene MGJ, de Boer E, Lipman LJA and Kuijper EJ (2012). *Clostridium difficile* infection in the community: a zoonotic disease? *Clinical Microbiology and Infection*, 18: 635-645.
15. Hussain I, Borah P, Sharma RK, Rajkhowa S, Rupnik M, Saikia DP, Hasin D, Hussain I, Deka NK, Barkalita LM, Nishikawa Y, Ramamurthy T (2016). Molecular characteristics of *Clostridium difficile* isolates from human and animals in the North Eastern region of India. *Molecular and Cellular Probes*. 30: 306-311.
16. Janezic S, Potocnik M, Zidaric V, Rupnik M (2016). Highly Divergent *Clostridium difficile* Strains Isolated from the Environment. *Plos One*. 11.
17. Keessen EC, Gaastra W, Lipman LJA (2011). *Clostridium difficile* infection in humans and animals, differences and similarities. *Veterinary Microbiology*. 153: 205–217.
18. Koene MGJ, Mevius D, Wagenaar JA, Harmanus C, Hensgens MPM, Meetsma AM, Putirulan FF, Van Bergen MAP, Kuijper EJ (2011). *Clostridium difficile* in Dutch animals: their presence, characteristics and similarities with human isolates. *Clinical Microbiology and Infection*. 18: 778-784.
19. Kuijper EJ, Coignard B, Tüll P (2006). Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 12 (Suppl. 6): 2–18.

20. Madewell BR, Bea JK, Kraegel SA, Winthrop M, Tang YJ, Silva J Jr (1999). *Clostridium difficile*: a survey of fecal carriage in cats in a veterinary medical teaching hospital. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 11: 50-54.
21. Marks SL, Kather EJ, Kass PH, Melli AC (2002). Genotypic and Phenotypic Characterization of *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* in Diarrheic and Healthy Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 16: 533-540.
22. Marler LM, Siders JA, Wolters LC, Pettigrew Y, Skitt BL, Allen SD (1991). Comparison of Five Cultural Procedures for Isolation of *Clostridium difficile* from Stools. *Journal of Clinical Microbiology*. 30: 514-516.
23. McCollum DL, Rodriguez JM (2012). Detection, Treatment, and Prevention of *Clostridium difficile* Infection. *Clinical gastroenterology and hepatology*. 10: 581–592.
24. McDonald LC, Killgore GE, Thompson A, Owens RC Jr, Kazakova SV, Sambol SP, Johnson S, Gerding DN. An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. *The New England Journal of Medicine*. 353: 2433–2441.
25. Murphy CP, Reid-Smith RJ, Boerlin P, Weese JS, Prescott JF, Janecko N, Hassard L, McEwen SA (2010). *Escherichia coli* and selected veterinary and zoonotic pathogens isolated from environmental sites in companion animal veterinary hospitals in southern Ontario. *The Canadian veterinary journal*. 51: 963-972.
26. Otten AM, Reid-smith RJ, Fazil A, Weese JS (2010). Disease transmission model for community-associated *Clostridium difficile* infection. *Epidemiology and Infection*. 138: 907–914.
27. Persson S, Torpdahl M, Olsen KEP (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: 1057–64.
28. Riley TV, Adams JE, O'Neill GL, Bowman RA (1991). Gastrointestinal carriage of *Clostridium difficile* in cats and dogs attending veterinary clinics. *Epidemiology and Infection*. 107: 659-665.
29. Roberts K, Smith CF, Snelling AM, Kerr KG, Banfield KB, Sleight PA and Beggs CB (2008). Aerial Dissemination of *Clostridium difficile* spores. *BioMed Central Infectious Disease*. 8:7
30. Rodriguez C, Taminiau B, Van Broeck J, Delmée M, Daube G (2016). *Clostridium difficile* in Food and Animals: A Comprehensive Review. *Advances experimental medicine biology*. 4: 65-92.
31. Rodriguez C, Van Broeck J, Taminiau B, Delmée M, Daube G (2016). *Clostridium difficile* infection: Early history, diagnosis and molecular strain typing methods. *Microbial Pathogenesis*. 97: 59-78.

32. Rupnik M (2007). Is *Clostridium difficile*-associated infection a potentially zoonotic and foodborne disease?. *Clinical Microbiology and Infection*, 13: 457-459.
33. Rupnik M, Wilcox MH, Gerding DN (2009). *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. *Nature*. 7: 526-536.
34. Schneeberg A, Rupnik M, Neubauer H, Seyboldt C (2012). Prevalence and distribution of *Clostridium difficile* PCR ribotypes in cats and dogs from animal shelters in Thuringia, Germany. *Anaerobe*. 18: 484-488.
35. Schmidt VM, Nuttall T, Pinchbeck GL, McEwan N, Dawson S, Williams NJ (2015). Antimicrobial resistance risk factors and characterisation of faecal *E. coli* isolated from healthy Labrador retrievers in the United Kingdom. *Preventive Veterinary Medicine*. 119: 31-40.
36. Small JD (1968). Fatal enterocolitis in hamsters given lincomycin hydrochloride. *Laboratory Animal Care*. 4: 411-20.
37. Tonna I, Welsby PD (2005). Pathogenesis and treatment of *Clostridium difficile* infection. *Postgraduate Medical Journal*, 81: 367-369.
38. Wedley AL, Dawson S, Maddox TW, Coynea KP, Pinchbeck GL, Clegg P, Nuttall T, Kirchnere M, Williams NJ (2017). Carriage of antimicrobial resistant *Escherichia coli* in dogs: Prevalence, associated risk factors and molecular characteristics. *Veterinary microbiology*. 199: 23-30.
39. Weese JS (2011). Bacterial enteritis in dogs and cats: diagnosis, therapy, and zoonotic potential. *Veterinary Clinics Small Animal*. 41: 287–309.
40. Weese JS, Armstrong J (2003). Outbreak of *Clostridium difficile*-Associated Disease in a Small Animal Veterinary Teaching Hospital. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 17: 813–816.
41. Weese JS, Finley R, Reid-smith RR, Janecko N, Rousseau J (2009). Evaluation of *Clostridium difficile* in dogs and the household environment. *Epidemiology and Infection*, 138: 1100-1104.
42. Weese JS, Staempfli HR, Prescott JF, Kruth SA, Greenwood SJ, Weese HE (2001). The Roles of *Clostridium difficile* and Enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in Diarrhea in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 15: 374–378
43. Wetterwik KJ, Trowald-Wigh G, Fernström LL, Krovacek K (2013). *Clostridium difficile* in faeces from healthy dogs and dogs with diarrhea. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 55: 23.
44. Wilson KH (1983). Efficiency of various bile salt preparations for stimulation of *Clostridium difficile* spore germination. *Journal of Clinical Microbiology*. 18: 1017-1019.

10. Anexo 1

ANIMAL:

INFORMACIÓN GENERAL

FECHA:

Nº DE MUESTRA:

DÍAS HOSPITALIZADO:

EDAD:

SEXO:

RAZA:

PESO:

CAUSA DE HOSPITALIZACIÓN:

TRATAMIENTOS

ANTIBIÓTICOS:	SI	NO	NOMBRE:
INICIO:	FIN:	PAUTA:	
ANTIÁCIDOS:	SI	NO	NOMBRE:
INICIO:	FIN:	PAUTA:	
IMMUNOSUPRESORES:	SI	NO	NOMBRE:
INICIO:	FIN:	PAUTA:	

OTROS:

MUESTRA:

DIARREA:	SI	NO	
CONSISTENCIA:			COLOR:
FRECUENCIA:			OLOR:

OTROS

CIRUGÍA:	SI	NO
ANESTESIA:	SI	NO