

Clostridium difficile:

estudio de su prevalencia en caballos

Máster Oficial en Zoonosis y Una Sola Salud (One Health)

Curso 2016-2017

Estudiante: Gisela García Casajuana

Directora: Laila Darwich Soliva

Trabajo de fin de máster: “***Clostridium difficile*: estudio de su prevalencia en caballos.**”

Máster Oficial en Zoonosis y Una Sola Salud (One Health)

Curso 2016-2017

Estudiante: Gisela García Casajuana

Directora: Laila Darwich Soliva

Firma estudiante:

Firma directora:

ÍNDICE

0. Abstract	2
1. Introducción: relevancia de la infección por <i>Clostridium difficile</i>	3
1.1. Características generales	4
1.2. Clasificación genética	4
1.3. Patogenia de la infección por <i>C. difficile</i>	6
1.4. Relevancia de <i>C. difficile</i> en salud pública	7
1.5. Relevancia de <i>C. difficile</i> en sanidad animal	8
1.6. <i>C. difficile</i> en caballos	9
2. Hipótesis y objetivos del estudio	10
3. Materiales y métodos	10
3.1. Diseño del estudio	10
3.2. Procesado de las muestras	11
3.3. Técnicas utilizadas	12
4. Resultados	14
5. Discusión	16
6. Conclusiones	17
7. Bibliografía	18
8. Anexo: glosario	20

0. ABSTRACT

Clostridium difficile (CD) es una bacteria de importancia en salud pública que causa enfermedad tanto en humanos como en distintas especies animales. La patología asociada a CD es debido a la infección por cepas toxigénicas productoras de toxinas que afectan al epitelio intestinal. El hecho de aislar cepas similares de esta bacteria en personas, animales y en productos alimentarios de origen animal ha hecho sugerir que pueda tratarse de una enfermedad de origen zoonótico, aunque la transmisión directa entre animal-persona no ha sido todavía demostrada. Existen varios trabajos publicados sobre la prevalencia de esta infección en distintas especies de animales, sobretodo en animales de consumo como el porcino, bovino y aviar, y en menor medida en animales de compañía. En el caballo hay pocos estudios epidemiológicos realizados y ninguno en Cataluña, cuya prevalencia de *C. difficile* oscila entre el 0 y el 20% de los animales testados. El objetivo de estudio ha sido determinar la prevalencia de cepas toxigénicas de *C. difficile* a partir de heces de caballos que ingresaban en el hospital clínico veterinario de la Universidad Autónoma de Barcelona mediante cultivos microbiológicos y detección por PCR. Por otro lado, al tratarse de una bacteria anaeróbica estricta de cultivo difícil y requerimientos especiales, se ha querido optimizar el método más efectivo para el aislamiento y detección de esta bacteria para muestras que han sido congeladas antes de ser procesadas. La muestra final del estudio ha abarcado un total de 104 heces de 72 animales: 28 caballos sanos/control, 30 caballos con problemas digestivos/cólico, 6 potros (<6 meses) y 8 caballos necropsiados. Los resultados de este trabajo muestran que el choque térmico y el choque con etanol antes del cultivo selectivo en medios de agar especiales han resultado incrementar la eficiencia de aislamiento de *C. difficile* en muestras controles positivas. Sin embargo no se ha detectado la presencia de cepas toxigénicas de CD en ninguno de los animales muestreados, sugiriendo que la prevalencia de estas cepas en esta zona geográfica es más baja de lo esperada. Incrementar la muestra del estudio, añadiendo más casos de potros y animales con sintomatología compatible, ayudaría a aumentar la probabilidad de detección de animales positivos a CD.

1. INTRODUCCION: relevancia de la infección por *Clostridium difficile*

Clostridium difficile (CD) es una bacteria grampositiva anaerobia y formadora de esporas que se encuentra de forma ubicua en el medio. Podemos encontrar esta bacteria tanto en el suelo como en el agua, así como también en diferentes animales, incluido el ser humano, y en la comida (vegetales, algunos productos cárnicos, productos de la pesca)(C Rodriguez et al. 2016; Warriner et al. 2016).

C. difficile puede producir ciertos factores de virulencia, como pueden ser la toxina A (enterotoxina) y la toxina B (citotoxina). La patogenicidad de esta bacteria está asociada a la producción de dichas toxinas (Ong et al. 2017). En humanos, la infección asociada a *C. difficile* es la causa más frecuente de diarrea de origen nosocomial. Provoca una colitis pseudomembranosa, aunque el cuadro clínico puede variar e ir de diarreas leves hasta megacolon tóxico e incluso la muerte (C. Rodriguez et al. 2016). En muchos de los casos en humanos, la infección por *C. difficile* está asociada a la hospitalización y al tratamiento previo con antibióticos (Ong et al. 2017; C. Rodriguez et al. 2016). Se estima que aproximadamente un 3% de la población es portadora de esta bacteria, pero este porcentaje aumenta cuando hablamos de pacientes hospitalizados (Tariq & Khanna 2016). El caso es que también se producen casos de infecciones adquiridas en la comunidad, de allí que algunos autores se cuestionen si se podría tratar de una enfermedad de origen zoonótico (Hensgens et al. 2012).

C. difficile también se ha encontrado en diferentes animales, así como perros, gatos, caballos, vacas, elefantes... (Keel et al. 2007; Hensgens et al. 2012) Aunque en muchos de los casos no desarrollan enfermedad, sí son portadores de la bacteria. Hay algunos estudios en los que comparan los ribotipos de *C. difficile* encontrados en animales y en humanos con resultados que podrían sugerir que la enfermedad podría ser una zoonosis. Este sería el caso de la descripción de cepas del mismo ribotipo 078 (filogenéticamente muy relacionadas) encontradas en cuidadores de porcino y en los cerdos de las granjas que frequentaban (Tsai et al. 2016). Otro ejemplo sería el descrito por Keel et al. (2007) donde encontraron hasta 7 ribotipos comunes tanto en caballos como en humanos que tenían contacto con estos animales, y también comunes en perros, bovino y porcino aunque en menor medida. En definitiva, aunque existen evidencias de que distintas especies animales, entre ellas el hombre, parecen compartir cepas muy parecidas o aparentemente del mismo ribotipo, no existe la demostración empírica de que dicha transmisión ocurra de verdad (Hensgens et al. 2012).

1.1. Características generales de CD

C. difficile es una bacteria grampositiva (Imagen 1), móvil en caldos de cultivo con flagelación perítrica. El tamaño de las células va de 0,5 a 1,9 μm de ancho y de 3 a 1,9 μm de largo. Algunas cepas pueden formar cadenas de 2 a 6 células (C. Rodriguez et al. 2016).



Imagen 1: Tinción de gram de *C. difficile* (Walter et al. 2015).

Como se trata de un microorganismo anaerobio, éste puede producir esporas para poder sobrevivir en el medio. Las endosporas que produce son ovales y de posición subterminal. Están recubiertas por un córtex de peptidoglicano y varias capas de proteína, las cuales permiten que sobreviva a las condiciones adversas del medio durante mucho tiempo en condiciones aerobias además de proporcionarle resistencia a desinfectantes y antibióticos. La formación de la espora pasa por diferentes fases: en primer lugar se forma un septo en la célula, luego se forman el córtex y la cubierta de proteínas, respectivamente. Por último, se va degradado lo que queda en el exterior de la espora hasta que sólo queda el exosporio. En la parte central de la espora se encuentra el ADN, ácido dipicolínico y pequeñas proteínas solubles en ácido. De esta manera, las proteínas protegen el ADN de la luz UV mientras que el agua es remplazada en su gran parte por ácido dipicolínico, llegando a ser aproximadamente el 10% del peso seco de la espora. (Francis et al. 2015; Rineh et al. 2015; Francis & Sorg 2016)

1.2. Clasificación genética de CD

Con tal de poder realizar estudios epidemiológicos, es muy importante la caracterización molecular de *C. difficile*. Mediante métodos de tipado molecular, se pueden realizar estudios epidemiológicos y observar los cambios en las prevalencias e incidencias de los diferentes tipos de *C. difficile*. En un estudio europeo del 2013, se vio que la prevalencia del ribotipo 027 había aumentado, siendo del 5% en el 2008 y del 18% en el 2013. Los otros ribotipos que se encontraron con más frecuencia fueron el 001/078 y 014/020 (Ribas & Mansilla 2015). Además, otro estudio del 2011 también observó una incidencia del 5% del ribotipo 027 y del 16% del ribotipo 014/020, siendo este último el más

frecuente (Bauer et al. 2011). En España, hasta el 2014 el ribotipo 027 era muy poco prevalente, mientras que eran abundantes los ribotipos 014/020, 001/072 y 078/126. Por otro lado, actualmente se está observando un aumento de la incidencia del ribotipo 027 (Ribas & Mansilla 2015). El ribotipo 027 se considera hipervirulento, ya que además de la sobreexpresión de las toxinas A y B también es productor de la toxina binaria, así como también tiene resistencia a las fluoroquinolonas. Otros ribotipos como el 078 y el 001 también tienen un mecanismo similar de hiperproducción de toxinas, con lo que también pueden ser capaces de producir brotes de la enfermedad (Rodríguez-pardo et al. 2013).

Hay diferentes métodos de tipado molecular. El ripotipado, la electroforesis de campo pulsado (PFGE) y el *multilocus variable number of tandem repeat analysys* (MLVA) se basan en el análisis de bandas, mientras que el *multilocus sequence typing* (MLST) y la secuenciación de genoma completo (WGS – *whole genome sequencing*) se basan en el análisis de secuencias. El método más usado en Europa y Australia es el ripotipado, mientras que Norteamérica se ha usado más el tipado mediante el análisis de fragmentos de restricción (REA) así como también la PFGE, aunque cada vez es más común el uso del ripotipado.

El ripotipado se basa en amplificar por PCR el espacio intergénico que hay entre los genes 16S y 23S que codifican para el ARN ribosómico. Se pueden diferenciar las cepas porque la disposición, número y tamaño de estos genes en *C. difficile* varía entre ellas. Después de amplificar estos genes, se separan los fragmentos por electroforesis en gel de agarosa obteniendo un patrón de bandas. Los patrones se consideran diferentes si tienen más de una banda de diferencia o están en distintas posiciones. Existe una nomenclatura internacional para los ribotipos basada en números de tres dígitos. Se trata de un método sencillo y no muy caro que tiene una buena reproducibilidad intralaboratorio pero poca reproducibilidad entre distintos laboratorios. Se han descrito más de 600 ribotipos y esto dificulta la correlación de los ribotipos obtenidos en diferentes laboratorios (Ribas & Mansilla 2015). Los diferentes ribotipos que existen se encuentran en una colección de la *Health Protection Agency-funded C. difficile Ribotype Network* (CDRN) en Leeds (Reino Unido), ellos también se encargan de asignar los nuevos ribotipos que se descubren (C. Rodriguez et al. 2016). De todos modos, la introducción de las nuevas técnicas de *next generation sequencing* (NGS) van a permitir mejorar y agilizar la clasificación de CD y establecer el origen de cepas muy similares que con las técnicas convencionales de ripotipado no es posible discriminar.

1.3. Patogenia de la infección por *C. difficile*

La infección por CD (CDI) puede ser asintomática o producir enfermedad. Los signos clínicos pueden variar e ir de diarrea leve o moderada hasta colitis pseudomembranosa, megacolon tóxico y muerte (Ribas & Mansilla 2015). Esta infección suele caracterizarse por la inflamación del intestino grueso y la presencia de placas y acumulación de neutrófilos en el lumen del intestino (Rineh et al. 2015). Los factores de riesgo que se han asociado a la enfermedad por CD son la exposición a antimicrobianos, la hospitalización durante un largo periodo de tiempo, la edad avanzada, la gravedad de otra enfermedad subyacente y la inmunosupresión, entre otros. Se cree que el uso de antiácidos también podría ser un factor de riesgo (Ribas & Mansilla 2015).

Las esporas de CD no son infectivas, es decir, necesitan germinar para poder producir enfermedad. Se cree que la presencia de la microbiota normal presente en el intestino hace que *C. difficile* no pueda germinar y se quede en su forma de espora. El tratamiento con antimicrobianos produce una disbiosis que permite a *C. difficile* germinar, reproducirse y causar enfermedad. En humanos sanos, las esporas pasan por el duodeno y llegan al yeyuno, donde germinan gracias a la presencia de la bilis. Las esporas germinadas llegan al íleo hasta alcanzar el ciego, que es aerobio. La microbiota metaboliza los derivados del colato (sal biliar primaria) y lo convierte en desoxicolato (sal biliar secundaria), haciendo que CD no pueda crecer. Por otro lado, cuando se usan antimicrobianos, la microbiota se ve alterada y aumentan las sales biliares primarias, cosa que permite una mayor germinación de las esporas de CD. De este modo, la microbiota normal inhibe el crecimiento de CD gracias al metabolismo del colato a desoxicolato (Rineh et al. 2015).

Una vez ha germinado, *C. difficile* puede producir dos toxinas, la toxina A (308kDa) y la toxina B (270kDa), además de una toxina binaria. Estas toxinas son las responsables de la patogenia de CD, así que sólo las cepas de CD que pueden producir al menos una de estas toxinas pueden causar enfermedad. A la toxina A también se la llama enterotoxina, ya que provoca una acumulación de fluidos en el intestino. Por otro lado, la toxina B no causa esta acumulación de líquidos pero sí que tiene un efecto citopático. Estas toxinas están codificadas en dos genes diferentes (*tcdA* y *tcdB*) que se encuentran en el mismo locus de patogenicidad (PaLoc). En este locus también hay tres genes más que tienen la función de regular la producción de estas toxinas (*tcdC*, *tcdR* y *tcdE*) (C. Rodriguez et al. 2016). El gen *tcdE* codifica para una holina encargada de hacer poros en la membrana citoplasmática para que las toxinas puedan ser liberadas, mientras que los genes *tcdC* y *tcdR* son los reguladores negativo y positivo, respectivamente, de la producción de dichas toxinas (Rodríguez-pardo et al. 2013). Además, aunque las cepas no toxigénicas de *C. difficile* no tienen el locus PaLoc, pueden adquirirlo de una cepa toxigénica mediante transferencia horizontal (Warriner et al. 2016). Por otro lado, la toxina binaria no está codificada en este locus e induce la formación de

protuberancias en los microtúbulos de las células, lo cual aumenta la adherencia de la bacteria en el epitelio intestinal (Rineh et al. 2015).

Para el tratamiento en pacientes que sufren una infección moderada, lo más común es el uso de metronidazol. El metronidazol es relativamente seguro y es más económico que la vancomicina, tiene la misma eficacia que la vancomicina pero tiene más efectos secundarios. Aun así, no debe usarse para mujeres embarazadas ni niños. Para aquellos casos graves se recomienda la vancomicina. Aunque la vancomicina sea el antibiótico que recomienda la FDA para el tratamiento de la CDI, se usa más el metronidazol por un tema tanto económico como por la preocupación sobre la aparición de enterococos resistentes a la vancomicina (Rineh et al. 2015; Tariq & Khanna 2016).

Además de los antibióticos, también se han propuesto otro tipo de tratamientos. Por ejemplo, un tratamiento poco convencional pero que está ganando importancia es el trasplante de materia fecal. Como las infecciones por CD son causadas por una disbiosis, parece lógico intentar reemplazar la microbiota del paciente enfermo con bacterias obtenidas de individuos sanos, así como bacteroides y firmicutes (Cheng & Fischer 2017). Por tanto, en el tratamiento de la infección mediante trasplante de materia fecal, se transfieren heces de individuos sanos al intestino grueso de pacientes con CDI. El trasplante se puede hacer de diferentes maneras, ya sean enemas, colonoscopia o mediante tubos rectales si se quiere introducir en el intestino grueso, o mediante tubos nasogástricos o endoscopias/gastroscopias si se quiere introducir en el duodeno (Rineh et al. 2015). Se ha visto que estas dos opciones no presentan grandes diferencias cuando se trata de efectividad, pero sí que la probabilidad de que surjan efectos adversos es más alta si se usa la vía superior que la colonoscopia (Cheng & Fischer 2017). Aun así, la ruta de administración debería depender del equipo disponible y de las condiciones del paciente (Rineh et al. 2015). Además, también se ha visto que la probabilidad de recurrencia de la CDI es menor cuando es tratada mediante el trasplante de materia fecal (5-15%), comparado con el 35-65% de recurrencia después de un tratamiento con vancomicina (Cheng & Fischer 2017).

1.4. Relevancia de *C. difficile* en salud pública

Clostridium difficile es la principal causa de diarreas nosocomiales en los países desarrollados. Según el Centre for Disease Control and Prevention (CDC), en el 2011 se estima que hubo medio millón de infecciones por esta bacteria, así como 29.000 casos en los que la infección resultó en muerte (Ribas & Mansilla 2015). La CDC considera que esta infección se trata de un problema de salud pública que requiere de acciones urgentes. En Estados Unidos, cada año se producen unas 250.000 infecciones que requieren hospitalización o afectan a personas ya hospitalizadas, mueren 14.000 personas cada año debido a una infección por *C. difficile* y los costos médicos por año son de al menos 1.000

millones de dólares (CDC 2013b). En un estudio de vigilancia piloto que se realizó en Europa, se estimó que en el 2011-2012 hubo alrededor de 124.000 casos de CDI (Dorp et al. 2013). En ambas regiones, el ribotipo predominante fue el 027 (30% en Europa, 12% en infecciones adquiridas en la comunidad en EEUU y 24% en infecciones nosocomiales en EEUU), seguido de los ribotipos 014 y 020, además del 106 en EEUU (CDC 2013a; Dorp et al. 2013).

Tanto la CDC como la European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) tienen protocolos de vigilancia para poder estimar la incidencia real de esta enfermedad, así como poder conocer mejor la epidemiología de la enfermedad, tal como los cambios que se van produciendo y los diferentes ribotipos implicados. Conociendo las características de la infección se pueden llegar a mejorar tanto el diagnóstico como la prevención (European Centre for Disease Prevention and Control 2017).

En España, las infecciones por *C. difficile* no son de declaración obligatoria, por lo que no existen datos oficiales sobre la incidencia en el país. Sí se estima que puede haber cerca de los 30.000 casos anuales con un gasto asociado de más de 100 millones de euros (Ribas & Mansilla 2015).

1.5. Relevancia de *C. difficile* en sanidad animal

C. difficile se ha podido aislar de muchos animales distintos, ya sean animales de compañía o animales de producción. Se han hecho estudios en diferentes animales: en animales de compañía como los perros se ha visto que pueden estar colonizados por la bacteria, pero si se compara con las esporas que podían encontrarse en los hogares se observaba que las cepas eran diferentes, sugiriendo así que el origen de la contaminación en las casas no eran los perros. Hay estudios que han asociado la presencia de CD con diarrea, pero pueden ser portadores asintomáticos. Respecto a los gatos, la tasa de colonización es relativamente baja, aunque aumenta en aquellos gatos que se encuentran en el hospital veterinario. Se sugiere también que el ambiente del hospital puede ser una posible fuente de infección. La transmisión entre estos animales de compañía y las personas aún no ha sido demostrada. No hay una estimación de lo que podría costar el tratamiento de estas infecciones en animales de compañía, pero el servicio veterinario y el tratamiento de un caso de diarrea aguda oscila entre los 100 y 200€ en Europa (C Rodriguez et al. 2016).

En animales de producción tampoco se ha estimado el coste de las pérdidas y el tratamiento para *C. difficile*, pero puede producir pérdida de peso, mortalidad en las crías y un retardo en el aumento de peso de los animales (C Rodriguez et al. 2016). Los animales más jóvenes son los que suelen tener las prevalencias más altas y el ribotipo que se encuentra en mayor frecuencia es el 078 (Warriner et al. 2016).

Estudios en porcino y vacuno han demostrado que puede haber animales portadores de la bacteria sin que éstos sufran la enfermedad. En el vacuno no se tiene muy clara la patogenia que causa esta infección, aunque se ha asociado con diarrea en terneros y vacas lecheras. En análisis post-mortem se ha visto que aparecen más lesiones histológicas en la zona del ciego. Respecto al porcino, CD es una de las causas más frecuentes de diarrea y la patogenia está más estudiada, se ha observado que no solo puede causar síntomas gastrointestinales sino que pueden aparecer síntomas extraintestinales como disnea, hidrotórax, ascitis y anorexia, entre otros, probablemente a causa de una sepsis. En las aves de corral también se dan casos de individuos asintomáticos, así como una prevalencia que va disminuyendo a medida que aumenta la edad del animal (C Rodriguez et al. 2016).

El hecho de que la bacteria se encuentre en animales de producción podría llevar a pensar que también podría encontrarse en los productos derivados, así como la carne, y que pueden ser una fuente de infección. Diversos estudios han detectado la presencia de CD en productos cárnicos. En Europa las prevalencias obtenidas son menores que en Estados Unidos y Canadá. Por otro lado, aunque sí se haya detectado la presencia de la bacteria en estos productos, también se ha visto que los niveles de contaminación son bajos. Es decir, la cantidad de esporas o unidades formadoras de colonias (ufc) que se encuentran en la carne es baja. Es importante, además, tener en cuenta que la gran mayoría de las cepas de *C. difficile* que se han encontrado son del tipo toxigénico y, por tanto, se debe considerar su potencial patogénico (Hensgens et al. 2012; Warriner et al. 2016). Teniendo en cuenta, además, otros alimentos que suelen dar problemas respecto a patógenos entéricos, se han hecho estudios en vegetales y marisco en los que la bacteria ha podido ser aislada (Warriner et al. 2016; Rodriguez et al. 2016).

1.6. *C. difficile* en caballos

En los caballos, se ha descrito que *C. difficile* es una causa importante de diarrea y enterocolitis. Tanto los potros como los caballos adultos son susceptibles y adquieren la bacteria mediante transmisión fecal-oral. El principal signo clínico es la diarrea, pero puede estar acompañada de membranas mucosas hiperémicas, pirexia, taquicardia, taquipnea, deshidratación, distensión abdominal y cólicos (Medina-torres et al. 2011). Pueden ingerir las esporas o las células vegetativas que se encuentran en el ambiente, o que van expulsando otros animales portadores o enfermos. Como en los humanos, se ha visto que el tratamiento con antibióticos y la hospitalización pueden ser factores de riesgo para desarrollar la enfermedad (Diab et al. 2013; C Rodriguez et al. 2016).

Analizando el ambiente, Båverud et al. (2003) vieron que la presencia de *C. difficile* era menor en los establos de caballos adultos que en los de los potros. Esto podría deberse a una mayor tasa de

excreción de los potros. Además, pudieron observar que la bacteria puede sobrevivir en el medio hasta 4 años. Esto sugiere que tanto los potros como el ambiente en si pueden ser reservorios de la bacteria.

Las prevalencias que se han encontrado pueden variar en función del estudio, de la edad del animal y del método de diagnóstico, entre otros (Rodriguez et al. 2016). La prevalencia de CD es más baja en animales adultos sanos que en potros y en caballos adultos con diarrea (Hensgens et al. 2012). En los potros, se ha visto que la prevalencia si están sanos puede ser de 0-3%, mientras que puede ser mucho mayor en potros tratados con antibióticos (44%). En diferentes estudios de prevalencias en caballos adultos sanos, ésta puede ir de 0 al 10%. (Diab et al. 2013; Rodriguez et al. 2015; Medina-torres et al. 2011). Además, Avesani et al. (2014) observaron una prevalencia del 13,7% en caballos hospitalizados, subiendo a un 20,5% en caballos que habían recibido un tratamiento antibiótico.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

No está demostrado que las infecciones por *C. difficile* puedan tener un origen zoonótico, pero sí se ha comprobado que hay numerosos tipos de animales que pueden ser portadores de la bacteria e incluso presentar la enfermedad. Además, el estudio de la prevalencia de *C. difficile* en los caballos es un tema que aún no ha sido abordado en gran medida. Por ello, con este estudio se espera poder estudiar la prevalencia de *C. difficile* en caballos para poder tener una mayor comprensión de cómo está la situación en nuestra zona y poder determinar, también, si esta bacteria es una causa importante de diarrea, o no, en los caballos. Debido a que únicamente las cepas toxigénicas de CD son las causantes de patología, es interesante enfocar el estudio en la detección de dichas cepas.

Así pues, el objetivo principal del trabajo es estudiar la prevalencia de cepas toxigénicas de *C. difficile* en los caballos que se atienden en el hospital clínico veterinario de la Universidad Autónoma de Barcelona, mediante cultivo microbiológico y detección por PCR. Por otro lado, como se trata de una bacteria que es difícil de aislar, como objetivo secundario se pretende obtener un método eficaz para la recuperación de las esporas y el aislamiento de *C. difficile* que se encuentran en las muestras de heces. Se hará una comparación entre los dos métodos más usados, que son el choque térmico y el choque con etanol.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Diseño del estudio

Se trata de un estudio longitudinal realizado con muestras de heces de los caballos que llegaron al Hospital Clínico Veterinario de la Universidad Autónoma de Barcelona en el periodo entre diciembre

del 2016 y mayo del 2017.

La edad de los caballos se encuentra entre las 48 horas y los 28 años de vida y los motivos de las consultas son diversos (Tabla 1). En total, el número de caballos del estudio es de 72, pero el número de muestras es de 104 ya que en algunos casos se ha muestreado tanto a la recepción como a los 7 días de hospitalización o en el día en el que se les daba el alta. En el grupo control se incluyen aquellos caballos que no presentan las características de los otros grupos, es decir, aquellos en que el motivo de la consulta no eran problemas gastrointestinales, cólicos ni diarreas así como tampoco eran potros ni caballos a los que se les realizó necropsia.

Grupo	Número de caballos	Número de muestras
Control	28	41
Signos clínicos digestivos		
Cólico	19	31
Diarrea o cólico con diarrea	8	13
Problemas gastrointestinales	3	3
	30	47
Potros	6	7
Necropsia	8	9
Total	72	104

Tabla 1: Clasificación de los caballos según el motivo de consulta y número de muestras fecales recogidas en cada grupo.

3.2. Toma y procesamiento de muestras

Las muestras de heces de los caballos se recogieron en recipientes estériles de plástico de unos 100ml. Si las muestras no podían ser procesadas en el mismo día, éstas se guardaban a -20°C.

De todas las muestras de heces de los diferentes grupos de animales, se hizo una alícuota para guardarla en congelación a -80°C para poder conservarlas hasta el momento de su procesado (Fig. 1).

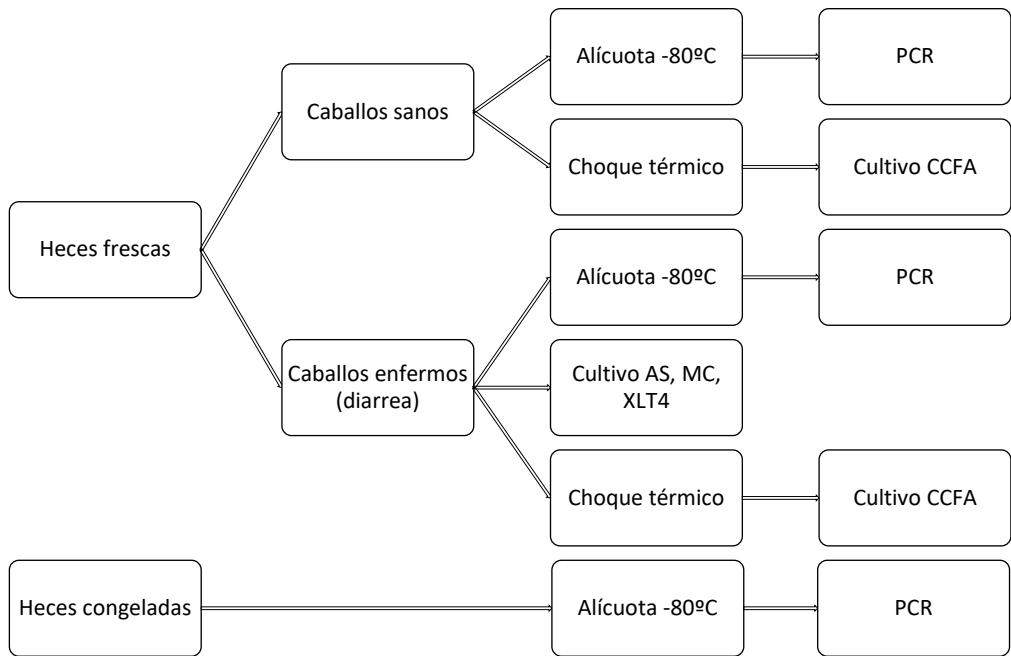


Figura 1. Esquema de procesado de las muestras. PCR, reacción en cadena de la polimerasa; AS, agar sangre; MC, agar McConkey; XLT4, agar Xilosa Lisina Tergitol-4; CCFA, agar cicloserina cefoxitina fructosa.

Para poder determinar un buen método para aislar *C. difficile* de las muestras congeladas y para evitar la contaminación en la placa por parte de otros microorganismos que puedan crecer en el medio agar cicloserina cefoxitina fructosa (CCFA), se compararon los métodos de choque térmico y choque con etanol usando unas muestras que ya se sabía con anterioridad que eran positivas a *C. difficile*. Para el choque térmico se deja la muestra a 70°C durante 20 minutos, para luego centrifugarla a 3.800 rpm durante 10 minutos. Respecto al choque con etanol, la muestra se mezcla a partes iguales con etanol (1:1) y se deja a temperatura ambiente durante unos 45 minutos. Posteriormente se centrifuga a 3.800 rpm durante 10 minutos. Para poder determinar qué método era mejor, se hicieron los cultivos tanto del pellet como del sobrenadante en placas de agar sangre (AS) y CCFA. Los cultivos se realizan en anerobiosis durante 48 horas. Una vez hecho el cultivo, se hacen tinciones de gram para poder descartar aquellas colonias que son gramnegativas o que no se ajustan a la morfología de *C. difficile*. Por último, se realiza una PCR para determinar si realmente aquellas colonias son *C. difficile* o no. Después de obtener los resultados, se comprobó que ambas clases de choque eran útiles para poder aislar y detectar la bacteria.

3.3. Técnicas utilizadas

3.3.1 Cultivo microbiológico

De las muestras que llegan frescas y son de animales sanos, se hizo un choque térmico y luego un cultivo en placa en medio CCFA. Para el choque térmico, se ponen partes iguales de PBS y de muestra

y se deja a 70°C durante 20 minutos. Seguidamente se centrifuga a 3.800 rpm durante 10 minutos. Se descarta el sobrenadante y se hace el cultivo en placa del pellet. Las placas se cultivan en anaerobiosis durante 48 horas a 37°C.

De las muestras que llegan frescas y son de animales enfermos (con diarrea), se hace el cultivo en medios generales como agar sangre (AS), en selectivos para gramnegativos (medio McConkey, MC) y Salmonella (agar Xilosa Lisina Tergitol-4, XLT4) para descartar otros enteropatógenos causantes de diarrea. Estas placas se cultivan en aerobiosis de 24 a 48 horas a 37°C. En paralelo, también se hace el choque térmico como se ha descrito anteriormente y se cultiva en CCFA en anaerobiosis durante 48 horas a 37°C.

De las muestras que llegan congeladas no se hace cultivo, se hace directamente una alícuota para guardarlas a -80°C y realizar técnicas de PCR.

3.3.2. Biología molecular

Para hacer la reacción en cadena de la polimeras (PCR), se lleva a cabo la extracción de DNA de 0,2g de muestra mediante el QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen). Se hace una PCR convencional tanto de la toxina A como de la toxina B de *C. difficile* de todas aquellas muestras que se congelaron a -80°C. La PCR empieza con un *hold* de 10 minutos a 94°C, seguido de 30 ciclos en los que la fase de desnaturalización es de 50 segundos a 94°C, la fase de hibridación es de 40 segundos a 54°C y la fase de elongación es de 50 segundos a 72°C. Por último, la PCR termina con un *hold* de 3 minutos a 72°C. Los primers utilizados en la PCR se detallan en la tabla 2. Con el producto de las PCR, se realiza una electroforesis en gel de agarosa al 2%.

Gen	Primer	Secuencia 5'-3'	Tamaño del amplificado (pb)
<i>tcdA</i>	TcdA F	GCATGATAAGGCAACTTCAGTGGTA	624
	TcdA R	AGTTCCCTCTGCTCCATCAAATG	
<i>tcdB</i>	TcdB F	CCAAAGTGGAGTGTTACAAACAGGTG	409
	TcdB R	GCATTCTCCGTTTCAGCAAAGTA	

Tabla 2: Primers utilizados para la PCR (Persson et al. 2008). TcdA: toxina A de *C. difficile*. TcdB: toxina B de *C. difficile*. F: primer forward. R: primer reverse. pb: pares de bases

4. RESULTADOS

Para poder determinar un método eficaz para el aislamiento de *C. difficile*, se pusieron a prueba tanto el choque térmico como el choque con etanol, descritos anteriormente. Para ello se utilizaron heces de porcino testadas previamente positivas a CD por PCR.

Los resultados de los crecimientos en las placas se muestran en la tabla 3. De un total de 9 colonias seleccionadas de entre las diferentes placas, 4 de ellas resultaron ser *C. difficile*. La gran mayoría de las colonias crecieron en las placas que se cultivaron del pellet.

	Tipo de choque	Sobrenadante (S) / Pellet (P)	Medio de cultivo	Morfología	Detección por PCR
1	Térmico	P	AS	Bacilos grampositivos, esporas subterminales. Color de colonia: blanco.	+
2	Térmico	P	AS	Bacilos grampositivos con espora terminal. Color de colonia: transparente.	-
3	Térmico	P	CCFA	Bacilos grampositivos con espora terminal y subterminal. Color de colonia: blanco.	+
4	Térmico	P	CCFA	Bacilos grampositivos no esporulados. Color de colonia: amarillo.	-
5	Térmico	S	CCFA	Bacilos grampositivos, algunos esporulados.	+
6	Etanol	P	CCFA	Bacilos grampositivos cortos, no esporulados. Color de la colonia: amarillento.	-
7	Etanol	P	CCFA	Bacilos largos grampositivos, algunos esporulados. Color de colonia: blanco.	-
8	Etanol	P	AS	Bacilos grampositivos con esporas terminales y subterminales. Color de colonia: blanco.	+
9	Etanol	P	AS	Bacilos grampositivos cortos. Color de colonia: blanco.	-

Tabla 3: Resultados de la comparación entre choque térmico y choque con etanol. (+) la detección por PCR es positiva. (-) la detección por PCR es negativa.

Las características en común que presentan las colonias que han dado positivo a la PCR es que todas presentan esporulación subterminal o terminal y las colonias son de color blanco (Figura 2). La bacteria ha sido capaz de crecer tanto en el medio general (AS) como en el medio selectivo (CCFA). Con el producto de las PCR se hizo una electroforesis en un gel de agarosa al 2% para comprobar que efectivamente se trataba de cepas toxigénicas de CD (Figura 3).

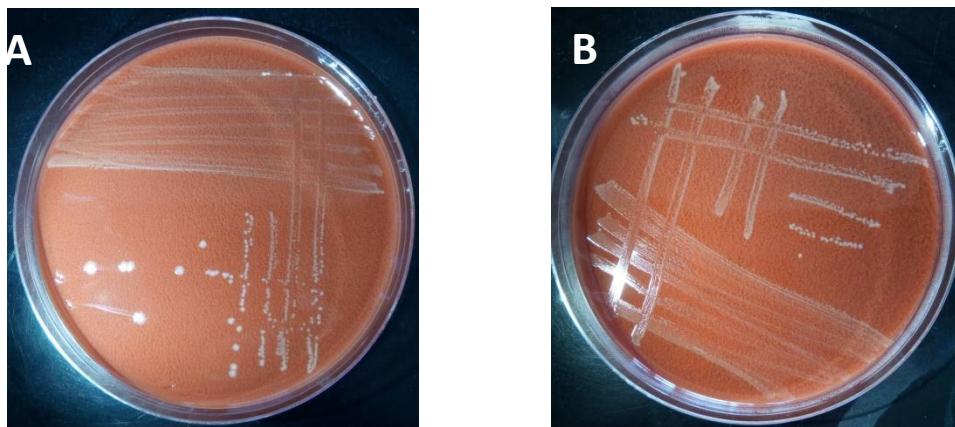


Figura 2: Cultivos microbiológicos de las colonias positivas a *C. difficile* después de los choques térmico y con etanol. A: colonias de *C. difficile* en placa de AS tras choque térmico (número 1 de la tabla 4). B: colonias de *C. difficile* en placa de AS tras choque con etanol (número 8 de la tabla 4).

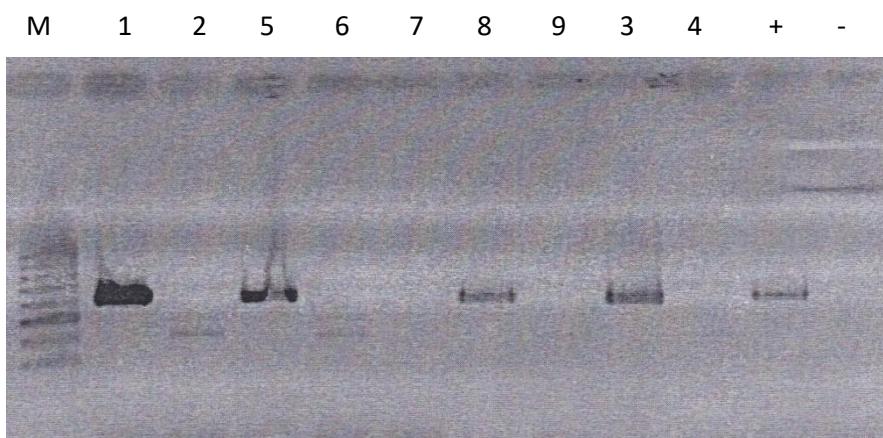


Figura 3: Electroforesis del producto de la PCR para la detección de *C. difficile* para comparar el choque térmico con el choque con etanol. Los números corresponden a los de la tabla 3. M: marcador de peso molecular (100-1000 pb). (+) control positivo. (-) control negativo.

Respecto a las muestras de heces de los caballos, en aquellas en las que se realizó el choque térmico para poder aislar mejor la bacteria, se obtenía el crecimiento de bacilos grampositivos, algunos esporulados y otros no. No obstante, ninguna de las muestras del estudio dio positiva a *C. difficile* mediante detección por PCR (Figura 4), siendo el resultado de una prevalencia del 0%. Pese a que en una de las muestras sí hubo amplificación en la PCR, no resultó ser CD. En el caso de las muestras de animales con diarrea, mediante el cultivo en AS, XLT4 y MC y la posterior realización de pruebas bioquímicas, se pudo detectar la presencia de *E. coli* en una de las muestras siendo una muy

probable causa de la enfermedad del animal. El resto de muestras presentaban un crecimiento de bacterias mixto en el que no se pudo atribuir una etiología bacteriana definitiva.

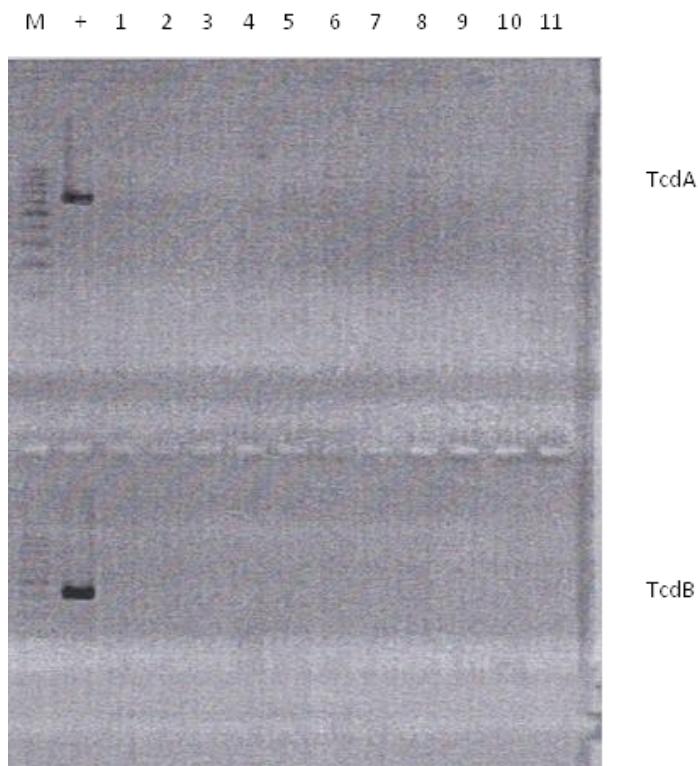


Figura 4: Gel de electroforesis representativo del estudio, donde se muestran 11 muestras de heces de caballos. Resultados negativos tanto para la toxina A como para la toxina B. M: marcador de peso molecular (100-1000pb). (+) control positivo.

5. DISCUSIÓN

La infección por *C. difficile* es un tema de preocupación para la salud pública. Se trata de una enfermedad que puede llegar a ser muy grave y que genera una gran cantidad de costes sanitarios. Es una bacteria que puede encontrarse tanto en humanos como en muchas especies animales e incluso se pueden encontrar los mismos ribotipos en especies diferentes. Esto, sumado al hecho de que aproximadamente un cuarto de las infecciones tienen origen en la comunidad, ha hecho que se plantee si realmente puede tratarse de una enfermedad de origen zoonótico. Los animales pueden ser portadores de la bacteria sin necesidad de desarrollar la enfermedad, como los humanos, así que no sería extraño pensar que puede haber transmisión entre estos animales y las personas, o viceversa. Además, también hay diversos estudios que han encontrado *C. difficile* en productos alimentarios, sobretodo en carne. Hay que tener en cuenta que la mayoría de cepas encontradas en la carne son toxigénicas, así que se debe considerar su potencial patogénico. Aun así, pese a la evidencia de que la bacteria se encuentra tanto en animales (de compañía y de producción) como en los alimentos, no se ha sido capaz, aun, de demostrar que realmente haya una transmisión zoonótica.

En diversos estudios realizados en caballos, las prevalencias eran muy variables. El hecho de que en este estudio la prevalencia sea del 0% puede deberse a diferentes razones. Para empezar, puede que la prevalencia de caballos portadores de cepas toxigénicas de CD de la zona de estudio sea más baja que en otras zonas y por eso no se ha detectado con nuestra casuística de casos y controles (N=66 caballos, N=97 heces). Por otro lado, y con más probabilidad, es que la prevalencia de *C. difficile* suele ser mucho mayor en animales jóvenes (potros) que en adultos y el número de potros que llegaron al hospital veterinario durante el periodo del estudio fue bajo, concretamente 6. Esto puede derivar a que el tamaño de muestra analizado para este grupo del estudio no tenga la potencia estadística suficiente para poder detectar esta infección. Es decir para poder lograr una muestra representativa, deberíamos incrementar la n de este grupo de animales. En nuestro caso no ha sido posible porque estábamos limitados por la casuística de casos remitidos al Hospital veterinario de la UAB que para potros suele ser más elevado en los meses de verano. Comentar también que no se ha realizado la detección de portadores de cepas no toxigénicas por lo que esto reduce la prevalencia de infección general por CD.

Finalmente también puede ser que el hecho de que las muestras estén congeladas antes de procesarlas haga que la detección de CD sea más complicada. También es importante el método usado para el aislamiento y la detección de CD. En este estudio, se ha demostrado que el choque térmico y el choque con etanol son métodos eficaces para este fin. Aun así, con estos métodos no se obtiene un aislado puro de la bacteria, sino que hay otras bacterias, sobretodo grampositivas esporuladas, que no son *C. difficile* pero que crecen igualmente en CCFA después del choque térmico o con etanol y son amplificadas con los primers de la PCR para cepas toxigénicas de CD.

6. CONCLUSIONES

La prevalencia en los caballos puede ser variable y depender de cosas como: el área geográfica, el tratamiento previo con antibióticos y la hospitalización, la edad del animal y el método utilizado para el aislamiento y la detección de *C. difficile*. En este estudio, la prevalencia de cepas toxigénicas de CD obtenida ha sido del 0%. El hecho de no conseguir una muestra más homogénea y representativa de cada grupo de animales analizados (sobre todo de potros) puede haber influido en esta ausencia de detección de CDI.

El uso de un choque térmico o de un choque de calor es muy útil para poder recuperar las esporas de *C. difficile* de las muestras, tanto congeladas como frescas.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Avesani, V. et al., 2014. Carriage and acquisition rates of Clostridium difficile in hospitalized horses , including molecular characterization , multilocus sequence typing and antimicrobial susceptibility of bacterial isolates. , 172, pp.309–317.
- Bauer, M.P. et al., 2011. Clostridium difficile infection in Europe: A hospital-based survey. *The Lancet*, 377(9759), pp.63–73. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61266-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61266-4).
- Båverud, V. et al., 2003. Clostridium difficile: prevalence in horses and environment , and antimicrobial susceptibility. , 35, pp.465–471.
- CDC, 2013a. 2013 Annual Report for the Emerging Infections Program for Clostridium difficile Infection. , (Cdi), pp.2012–2013.
- CDC, 2013b. Antibiotic resistance threats in the United States, 2013.
- Cheng, Y. & Fischer, M., 2017. The Present Status of Fecal Microbiota Transplantation and Its Value in the Elderly. *Curr Treat Options Gastro*, pp.349–362.
- Diab, S.S., Songer, G. & Uzal, F.A., 2013. Clostridium difficile infection in horses : A review. *Veterinary Microbiology*, 167(1-2), pp.42–49. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.03.032>.
- Dorp, S.M. Van et al., 2013. Standardised surveillance of Clostridium difficile infection in European acute care hospitals : a pilot study , 2013. , pp.1–13.
- European Centre for Disease Prevention and Control, 2017. European surveillance of Clostridium difficile infections. Surveillance protocol version 2.3.
- Francis, M.B., Allen, C.A. & Sorg, J.A., 2015. Spore Cortex Hydrolysis Precedes Dipicolinic Acid Release during Clostridium difficile Spore Germination. *Journal of Bacteriology*, 197(14), pp.2276–2283.
- Francis, M.B. & Sorg, J.A., 2016. Dipicolinic Acid Release by Germinating Clostridium difficile Spores Occurs through a Mechanosensing Mechanism. , 1(6), pp.1–13.
- Hensgens, M.P.M. et al., 2012. Clostridium difficile infection in the community : a zoonotic disease ? *Clinical Microbiology and Infection*, 18(7), pp.635–645. Available at: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03853.x>.
- Keel, K. et al., 2007. Prevalence of PCR Ribotypes among Clostridium difficile Isolates from Pigs, Calves, and Other Species. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(6), pp.1963–1964.
- Medina-torres, C.E., Weese, J.S. & Staempfli, H.R., 2011. Prevalence of Clostridium difficile in horses. *Veterinary Microbiology*, 152(1-2), pp.212–215. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.04.012>.

Ong, G.K.B. et al., 2017. Clostridium difficile colitis: A clinical review. *The American Journal of Surgery*, 213, pp.565–571. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002961017300053>.

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. *European Society of Clinical Infectious Diseases*, 14(11), pp.1057–1064. Available at: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02092.x>.

Ribas, A.M. & Mansilla, E.C., 2015. *Diagnóstico microbiológico de la infección por Clostridium difficile*,

Rineh, A. et al., 2015. Clostridium difficile infection: molecular pathogenesis and novel therapeutics. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 12(1), pp.131–150.

Rodriguez, C. et al., 2016. Clostridium difficile in Food and Animals : A Comprehensive Review. *Advances in Experimental Medicine and Biology*.

Rodriguez, C. et al., 2016. Clostridium difficile infection: Early history, diagnosis and molecular strain typing methods. *Microbial Pathogenesis*, 97, pp.59–78. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2016.05.018>.

Rodriguez, C. et al., 2015. Faecal microbiota characterisation of horses using 16 rdna barcoded pyrosequencing, and carriage rate of clostridium difficile at hospital admission. *BMC Microbiology*, 15(1), p.181. Available at: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/15/181>.

Rodríguez-pardo, D., Mirelis, B. & Navarro, F., 2013. Infecciones producidas por Clostridium difficile. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31(4), pp.254–263.

Tariq, R. & Khanna, S., 2016. Clostridium difficile infection: Updates in management. *Indian Journal of Gastroenterology*, 36(February), pp.3–10. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s12664-016-0719-z>.

Tsai, B. et al., 2016. Anaerobe Zoonotic potential of the Clostridium difficile RT078 family in Taiwan. *Anaerobe*, 41, pp.125–130. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.06.002>.

Walter, B.M. et al., 2015. The SOS Response Master Regulator LexA Is Associated with Sporulation , Motility and Biofilm Formation in Clostridium difficile . , pp.1–17.

Warriner, K. et al., 2016. Dissemination of Clostridium difficile in food and the environment : Significant sources of C. difficile community-acquired infection? *Journal of Applied Microbiology*, 122, pp.542–553.

8. ANNEXO: GLOSARIO

AS: agar sangre

CCFA: agar cicloserina cefoxitina fructosa

CD: *Clostridium difficile*

CDC: Centre for Disease Control and Prevention

CDI: infección por *Clostridium difficile*

ECDC: European Centre for Disease Prevention and Control

MC: agar McConkey

MLST: *multilocus sequence typing*

MLVA: *multilocus variable number of tandem repeat analysis*

PaLoc: locus de patogenicidad en el que se encuentran los genes *tcdA*, *tcdB*, *tcdC*, *tcdR* y *tcdE*

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PFGE: electroforesis de campo pulsado

REA: análisis de fragmentos de restricción

tcdA: gen que codifica para la toxina A de *Clostridium difficile*

tcdB: gen que codifica para la toxina B de *Clostridium difficile*

tcdC: regulador negativo del PaLoc

tcdE: gen que codifica para una holina encargada de hacer poros en la membrana citoplasmática

tcdR: regulador positivo de la expresión de las toxinas A y B de *Clostridium difficile*

WGS: *whole genome sequencing*

XLT4: agar xilosa lisina tergitol-4