

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Sanidad Animal



**“CLOSTRIDIUM DIFFICILE”: PREVALENCIA E
IMPORTANCIA ECOLÓGICA EN ANIMALES
DOMESTICOS Y FAUNA SALVAJE.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Patricia Alba Alderete

Bajo la dirección de los doctores

Marta Eulalia García Sánchez
José Luis Blanco Cancelo

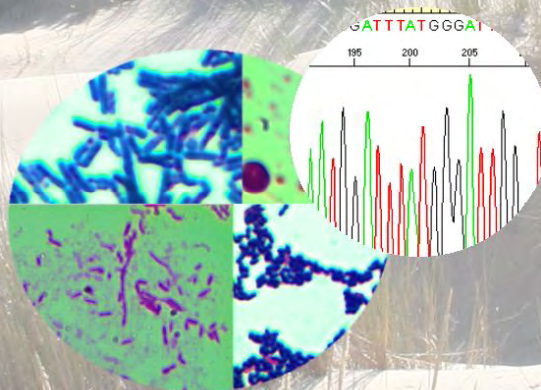
Madrid, 2011

ISBN: 978-84-694-3358-4

© Patricia Alba Alderete, 2010

Clostridium difficile:

PREVALENCIA E IMPORTANCIA ECOLÓGICA
EN ANIMALES DOMÉSTICOS Y FAUNA SALVAJE



DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL
FACULTAD DE VETERINARIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Patricia Alba Alderete
TESIS DOCTORAL
Madrid, 2010

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Sanidad Animal



Clostridium difficile: PREVALENCIA E
IMPORTANCIA ECOLÓGICA EN ANIMALES
DOMÉSTICOS Y FAUNA SALVAJE.

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Patricia Alba Alderete

Bajo la dirección de los doctores
Marta Eulalia García Sánchez y José Luis Blanco Cancelo
Madrid, Octubre de 2010



La Dra. Marta Eulalia García Sánchez, Profesora Titular del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, y el Dr. José Luis Blanco Cancelo, Catedrático del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado “*Clostridium difficile*: prevalencia e importancia ecológica en animales domésticos y fauna salvaje”, ha sido realizado por la licenciada Dña. Patricia Alba Alderete en las instalaciones del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid bajo nuestra dirección, y estimamos que reúne los requisitos exigidos para optar al título de Doctor.

Y para que así conste lo firmamos en Madrid, a 18 de octubre de 2010.

Fdo. Dr. José Luis Blanco Cancelo
Catedrático

Fdo. Dra. Marta Eulalia García Sánchez
Profesora Titular

A mis abuelos

A mis padres

There is grandeur in this view of life, with its several powers, having been originally breathed into a few forms or into one; and that, whilst this planet has gone cycling on according to the fixed law of gravity, from so simple a beginning endless forms most beautiful and most wonderful have been, and are being, evolved.

Charles Darwin. 1859. *On the Origin of Species*. 1st Edition.

To think that we can intervene effectively in human–microbe relationships without considering microbial ecology and evolution is folly.

L. Dethlefsen, M. McFall-Ngai y D. A. Relman. 2007. *Nature*. 449:811.

Agradecimientos

En muchas ocasiones, se utiliza la metáfora del edificio de la ciencia para ilustrar la complejidad y la necesidad de la unión de muchas disciplinas para que la construcción no se derrumbe. En ese sentido, me gustaría que el trabajo de investigación reflejado en la presente tesis, pudiera ser alguna de las diminutas teselas de uno de los cientos de mosaicos con los que me imagino decorado el magnífico palacio de la ciencia. Una de las pequeñitas, de las que están en la periferia, de las que quizá no tienen importancia en la imagen final representada. Pero una aportación que complementa, e incluso embellece, el conjunto arquitectónico.

Para dar forma a esta piedrecita, e contado con la ayuda de muchas personas sin las cuales este trabajo de tesis hubiera sido literalmente imposible:

- En primer lugar debo agradecer toda la ayuda prestada a mis dos directores de tesis, los doctores Marta E. García y Jose L. Blanco, quienes me acogieron en su laboratorio y me dieron la oportunidad de embarcarme en esta aventura. Ambos, no sólo me han enseñado a orientarme en el complejo mundo de la investigación científica, sino que me han tendido la mano ofreciéndome ayuda sincera y han enriquecido mi vida descubriéndome diferentes enfoques y cristales tras los que observar la ciencia, en particular, y la vida, en general.
- La tercera persona a la que tengo que decirle ¡gracias! es el Dr. Sergio Á. Pérez., mi compañero de laboratorio. Él me trajo al grupo de investigación, me enseñó cómo funcionaban los aparatos, me prestó su sabiduría y, sobretodo, se ha mantenido firme en la creencia de que la ciencia debe ser idealista y realista (y basada en el trabajo constante), contagiándome de ese sentimiento en los días de duda.
- Y en general agradecer a todos los que están, o estuvieron, en el grupo de Investigación COVEMI por su ayuda, conversaciones y consejillos, en especial a los Doctores José Antonio García, Sebastián Sánchez-Fortún, Paloma Toni, M^a Pilar Lanzarot, Fernando Marvá y Héctor Rodríguez, y a mi compañera de promoción, Mónica Rouco.

- Tengo que dar también las gracias a todos aquellos que me ayudaron en la recogida de muestras en el interior del Parque de Doñana, destacando a:
 - Al Dr. Fernando Hiraldo, el director de la Estación Biológica de Doñana, agradecerle la disponibilidad que ha mostrado para que se pudiera llevar a cabo el trabajo experimental dentro del Parque.
 - La Dra. Judit Hidalgo, gracias a quien pude incorporar muestras de anfibios en la investigación.
 - El grupo de seguimiento del Milano Negro de la EBD-CSIC, el Dr. Fabrizio Sergio, Lidia López y Vilches, quienes aprovechando sus escaladas a los nidos de milano negro para su seguimiento, recogieron muestras para mi.
 - Al equipo de seguimiento de la Reserva Biológica de Doñana, especialmente a Miguel Ángel Bravo, por su colaboración en el trabajo de campo.
 - Al grupo de vigilancia epidemiológica de la gripe aviar de Doñana, dirigido por el Dr. Jordi Figuerola, gracias a los cuales pude disponer de muestras de aves acuáticas y sobretodo las muestras de gansos, que tan útiles han resultado en la investigación.
 - A las veterinarias del Centro de Recuperación de Animales del Acebuche, especialmente a Cristina Martínez, quienes nos proporcionaron muestras de los animales del Centro de Recuperación del Parque Natural de Doñana y de las vacas de los alrededores, recogidas durante la campaña de saneamientos.

- Al personal del Servicio de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica del Hospital General Universitario “Gregorio Marañón” de Madrid, especialmente a los Doctores Emilio Bouza, Teresa Peláez, Mercedes Marín y Adoración Martín, por sus conocimientos de *C. difficile* y su ayuda en la secuenciación de algunos de los microorganismos encontrados a lo largo de esta tesis.

- Además, agradecer la simpatía y compañía de todos los que trabajan en el Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la UCM, especialmente a Eva, por nuestras amenas conversaciones. Así mismo, quiero

reconocer la ayuda inestimable de la Hemeroteca de la UCM, sobretodo por el impagable trabajo que hacen con el préstamo intercentros, y al maravilloso trabajo del Servicio de Genómica de la UCM.

También he de agradecer la financiación que ha hecho posible poder llevar este trabajo a buen puerto. En primer lugar, gracias al INIA, ya que este trabajo de tesis ha estado encuadrado dentro del proyecto denominado “Relaciones epidemiológicas de cepas del patógeno emergente *Clostridium difficile* aisladas de fauna silvestre, animales domésticos y hombre” (FAU2006-00005-C02-01).

En segundo lugar, gracias a los laboratorios Hipra S.A, por su ayuda mediante las becas predoctorales enmarcadas en los proyectos: “Implicaciones de *Clostridium difficile* en proceso diarreicos porcinos” e “Implicaciones de *Clostridium difficile* en proceso diarreicos”.

Por suerte, en estos cuatro años de tesis doctoral, no sólo he convivido con grandes científicos, compañeros y amigos laboratoriales, mencionados arriba, sino también con mi familia y mis amigos, quienes también me han brindado un grandísimo apoyo. Por ello, no puedo dejar de decir que en gran medida la finalización de esta tesis ha sido gracias a ellos, sobretodo por haberme soportado durante su realización. Así que gracias:

- A mis padres, Paloma y Julián, que siempre están ahí, y soy consciente de su aliento silencioso e incondicional, con cada una de mis ideas peregrinas, aunque prefiriesen que tuviera un trabajo de verdad. ¡Os quiero!
- A mi hermana, María, tan diferente y en el fondo tan igual a mi. Más que gracias debería disculparme, por todas las veces que he puesto la tesis como excusa para librarme de “tareas de hermana”. Gracias por todo, espero que en tu ático-loft siempre haya un huequito para mí. Ah, y muchas gracias por tu valoración y asesoramiento, en calidad de diseñadora gráfica y artista, en el diseño de la portada.
- Giuseppe, ringrazio di cuore anche te per questo mio importante traguardo, soprattutto grazie a il tuo atteggiamento positivo,... non amo usare tante parole, ma tu mi conosci e sai cosa voglio dire!
- Y al resto de mi familia: abuelos, tíos, primos...¡por fin terminé!

- A mis amigas de “terapia”: María, Ana, Moni y Eva...sino llega a ser esas risas y esos bailes, hubiera terminado siendo usuaria vuestra. ¡Cómo ha evolucionado (término escrito con toda la intención del mundo, porque la selección natural hacia nuestro comportamiento ha tenido gran importancia) nuestra forma de enfrentarnos a la vida!
- A mis amigos de la sierra: Almu, Luis, Klaus e Ire (lo siento, Ire, te reubico a efectos prácticos). ¡Qué imprescindibles momentos! Sólo recordar dos detalles, los abrazos en grupo y ¡Ruidera!

Por último, he de dar las gracias a todos los grandes científicos sobre los que he basado mi trabajo. A todos los gigantes que han permitido que esta principiante se subiera a sus hombros, a través de sus escritos, para otear en el horizonte. Lo que he visto, he intentado plasmarlo en esta tesela.

Simplemente, gracias por todo...

Patri

Índice

Resumen	19
Summary	21
Prefacio	23
INTRODUCCIÓN	27
I.- <i>Clostridium difficile</i>	29
I.1. Historia	29
I.2. Características de <i>Clostridium difficile</i>	30
I.3. Patogenia	33
I.4. Factores de patogenidad de <i>C. difficile</i>	35
I.4.1. Toxinas	36
I.4.1.1. PaLoc	36
I.4.1.2. Toxinas A y B	37
I.4.1.3. Toxina binaria	41
I.4.2. Adhesión	42
I.4.2.1. S-layer	42
I.4.2.2. Cwp66	43
I.4.2.3. Fbp68	43
I.4.2.4. GroEL	44
I.4.2.5. FliC y FliD	44
I.4.2.6. Fimbrias	44
I.4.3. Cápsula	45
I.4.4. Proteasas	45
I.4.4.1. Cwp84	45
I.4.5. Genes de resistencia a antibióticos	46
I.4.6. Plásmidos y elementos móviles	46
I.5. Ciclo epidemiológico	47
I.6. Hospedadores de <i>C. difficile</i> : Prevalencias y Manifestaciones clínicas	48
I.6.1. Ser humano	48
I.6.2. Resto de animales	51
I.6.3. <i>C. difficile</i> en ganado porcino: el caso más estudiado	55
I.6.4. <i>C. difficile</i> en fauna salvaje	57
I.6.5. Carácter zoonótico de <i>C. difficile</i>	58
I.6.6. Medio ambiente	60
I.7. Diagnóstico	61
I.7.1. Métodos de diagnóstico de laboratorio	62
I.7.1.1. Tipo de muestra, transporte y almacenamiento	62
I.7.1.2. Detección de toxinas	62
I.7.1.3. Aislamiento microbiano	64
I.7.1.4. Detección por métodos moleculares	66
I.7.1.5. Técnicas de tipado	67
II.- Dos ecosistemas complejos	69
II.1. Doñana	69
II.1.1. Parque de Doñana	69

II.1.2.	Ecosistemas dentro de Doñana	71
II.1.2.1.	Marismas	71
II.1.2.2.	Playas	71
II.1.2.3.	Dunas Móviles (y corrales)	72
II.1.2.4.	El bosque Mediterráneo (y los cotos)	72
II.1.2.5.	Veras (o ecotonos)	72
II.1.3.	Fauna de Doñana	73
II.1.3.1.	Anfibios	73
II.1.3.2.	Aves	73
II.1.3.3.	Mamíferos	74
II.2.	El intestino	75
II.2.1.	Organografía de los intestinos delgado y grueso	75
II.2.1.1.	Tejidos y estructura	75
II.2.1.2.	Principales tipos celulares del epitelio intestinal	76
II.2.2.	La microbiota normal	77
II.2.2.1.	Condiciones ambientales del intestino	77
II.2.2.2.	Microbiota	77
Objetivos		81
Capítulo 1		87
1.- Desarrollo previo de metodologías		89
1.1.	Aislamiento de <i>C. difficile</i> por rehidratación de las muestras	89
1.1.1.	Material y Métodos	89
1.1.1.1.	Muestras	89
1.1.1.2.	Método de “rehidratación”	90
1.1.2.	Resultados	90
1.1.3.	Discusión de los resultados	91
1.2.	Análisis comparativos de dos procedimientos de extracción de ADN para diferentes tipos de muestras	93
1.2.1.	Material y Métodos	93
1.2.1.1.	Métodos de extracción del ADN	93
1.2.1.2.	Comparación de las purezas obtenidas con ambos métodos	94
1.2.2.	Resultados	95
1.2.3.	Discusión de los resultados	97
Capítulo 2		99
2.- Clostridium difficile en animales domésticos		101
2.1.	Material y métodos	102
2.1.1.	Muestreo	102
2.1.1.1.	Lugares de muestreo	102
2.1.1.2.	Animales objeto de muestreo	102
2.1.2.	Aislamiento de <i>C. difficile</i>	103
2.1.3.	Identificación bioquímica	103
2.1.4.	Análisis estadístico	105
2.1.5.	Determinación de la presencia de los genes que codifican para las toxinas en los aislados.	105

2.1.5.1.	Extracción de ADN	105
2.1.5.2.	Toxinotipado	106
2.2.	Resultados	108
2.2.1.	Resultados bioquímicos	108
2.2.2.	Análisis estadístico	108
2.2.3.	Análisis comparativo entre granjas	109
2.2.3.1.	Relación entre <i>C. difficile</i> y la Comunidad Autónoma	110
2.2.3.2.	Relación entre <i>C. difficile</i> y diarrea neonatal	112
2.2.3.3.	Relación entre <i>C. difficile</i> y la edad de los individuos	114
2.2.4.	Toxinotipo	114
2.3.	Discusión de los resultados	115

Capítulo 3 **129**

3.- *C. difficile* en la fauna salvaje del Parque Nacional de Doñana **131**

3.1.	Material y Métodos	132
3.1.1.	Muestreo	132
3.1.1.1.	Lugar de Muestreo	132
3.1.1.2.	Animales objeto de muestreo	132
3.1.1.3.	Recogida de las muestras en el campo	133
3.1.1.4.	Muestras procedentes del Centro de Recuperación	136
3.1.2.	Aislamiento de <i>C. difficile</i>	136
3.1.2.1.	Procesado de las muestras recogidas en el campo	136
3.1.2.2.	Procesado de las muestras del Centro de Recuperación	136
3.1.3.	Identificación de los aislados	136
3.1.3.1.	Confirmación de la identificación por PCR	137
3.1.3.2.	Identificación por secuenciación del gen ribosómico 16S	139
3.1.4.	Análisis estadístico	142
3.2.	Resultados	143
3.2.1.	Aislamiento de <i>C. difficile</i>	143
3.2.2.	Confirmación por PCR	144
3.2.3.	Aislamientos e identificación de microorganismos	144
3.2.3.1.	Identificación bioquímica	144
3.2.3.2.	Identificación por secuenciación de <i>Clostridium</i> -like	148
3.2.3.3.	Estudio de las prevalencias	149
3.2.3.4.	Estudio estadístico de los resultados	151
3.2.3.5.	Perfiles bioquímicos	152
3.2.3.6.	Resultados en mamíferos	153
3.2.4.	Análisis de los resultados según la localización de las muestras	156
3.2.5.	Comparación de los resultados obtenidos en las tres poblaciones de caballos estudiadas	159
3.3.	Discusión de los resultados	162
3.3.1.	<i>Clostridium difficile</i>	162
3.3.2.	<i>Clostridium</i> -like	170
3.3.2.1.	Análisis estadístico	173
3.3.2.2.	Perfiles bioquímicos	174
3.3.2.3.	Clase mamíferos	175
3.3.2.4.	Relación con el hábitat exacto del animal	176
3.3.2.5.	<i>Equus caballus</i>	178
3.3.2.6.	Confirmación de la identidad mediante secuenciación	181

Capítulo 4 _____ **187**

4.- Identificación y caracterización microbiológica mediante biología molecular **189**

4.1.	Material y Métodos	190
4.1.1.	Muestras	190
4.1.1.1.	Procedencia de las muestras	190
4.1.1.2.	Extracción del ADN	190
4.1.2.	PCR	191
4.1.2.1.	Muestras	191
4.1.2.2.	Metodología	191
4.2.	Resultados	193
4.3.	Discusión de los resultados	194

Capítulo 5 _____ **197**

5.- Variaciones en la biodiversidad del ecosistema intestinal del ganso común. **199**

5.1.	Material y Métodos	199
5.1.1.	Muestras	199
5.1.2.	Aislamiento	200
5.1.3.	Identificación	200
5.1.4.	Análisis estadístico de los resultados	202
5.1.4.1.	Análisis estadístico básico	202
5.1.4.2.	Cálculo de la riqueza	203
5.1.4.3.	Cálculo de la abundancia	203
5.2.	Resultados	204
5.2.1.	Microorganismos aislados en total	204
5.2.1.1.	Análisis matemático	205
5.2.2.	Especies aisladas	210
5.2.2.1.	Análisis matemático	212
5.2.3.	Resultados en la Familia <i>Enterobacteriaceae</i>	215
5.2.4.	Riqueza de los ecosistemas: extrapolación matemática	216
5.2.5.	Abundancia del ecosistema	217
5.2.5.1.	Análisis matemático	218
5.3.	Discusión de los resultados	219

Capítulo 6 _____ **235**

6.- Identificación de nuevas especies bacterianas **237**

6.1.	Material y Métodos	238
6.1.1.	Muestras	238
6.1.2.	Secuenciación	238
6.1.2.1.	Extracción del ADN	238
6.1.2.2.	Primers utilizados	238
6.1.2.3.	Metodología	239
6.1.3.	Análisis de las secuencias	240
6.2.	Resultados	241
6.2.1.	Descripción de nuevas especies bacterianas	241
6.3.	Discusión de los resultados	255

CONCLUSIONES	261
BIBLIOGRAFÍA	267
Bibliografía	269
Páginas Web	291
Legislación	292
Índice de Tablas	293
Índice de Figuras	297
ANEXOS	301
Anexo1	303
Anexo 2	307
- Álvarez-Perez S., Blanco J. L., Bouza E., Alba P., Gibert X., Maldonado J. y García M. E. 2009. Prevalence of Clostridium difficile in diarrhoeic and non-diarrhoeic piglets. Veterinary Microbiology. 137:302-305.	307
- Álvarez-Perez S., Alba P., Blanco J. L. y García M. E. 2009. Detection of toxigenic Clostridium difficile in pig feces by PCR. Veterinarni Medicina, 54: 360–366.	307

Resumen

Clostridium difficile es un bacilo grampositivo, anaerobio estricto, al que se reconoce como agente causal de diferentes patologías de carácter intestinal que afectan al ser humano, las más importantes de las cuales son la diarrea asociada al consumo de antibióticos y la colitis pseudomembranosa. Además, también puede causar patologías como colitis o tiflocolitis en otras especies animales (ratones, caballos, perros, gatos, cerdos, avestruces,...) y está presente en el tracto intestinal de muchos otros animales, aunque no se termina de asociar con una patología.

Los principales factores de patogenicidad de *C. difficile* son las toxinas A (tcdA) y B (tcdB), secretadas por la mayoría de las cepas y codificadas en el mismo locus de patogenicidad. Éstas ejercen su acción tóxica sobre diversos tipos celulares de la mucosa intestinal, principalmente enterocitos, provocando daño en la mucosa intestinal e inflamación que deriva en diarrea, colitis o colitis pseudomembranosa. Algunas cepas presentan, además, la toxina binaria (CDT), que actúa sinérgicamente con las otras dos, como en el caso de la cepa hipervirulenta 027.

Sin embargo, en el estudio de este microorganismo faltan detalles importantes para esclarecer su ciclo infeccioso, como conocer su reservorio y sus interacciones en el ecosistema intestinal. En ese aspecto, esta tesis pretende ahondar en el estudio del reservorio de *C. difficile* y en el papel que los animales pudieran tener en el mantenimiento de la enfermedad. Así mismo estudiaremos especies no descritas hasta el momento, que se pueden encontrar formando parte de la flora normal intestinal de los animales, controlando el crecimiento de *C. difficile*.

Para ello, se han dividido las investigaciones en cuatro partes diferenciadas:

- El estudio de la presencia de *C. difficile* en animales domésticos de renta en España, centrándonos en explotaciones ganaderas porcinas de Cataluña, Castilla-La Mancha y Aragón, Comunidades Autónomas que suman más de la mitad de la producción ganadera porcina del país.

- El estudio de la presencia de *C. difficile* en la fauna salvaje española, centrándonos en los animales del Parque Natural de Doñana, así como de microorganismos fenotípicamente iguales a *C. difficile*, pero que no lo son.
- La confirmación y caracterización molecular, toxinotipado en este caso, de los aislados de *C. difficile* obtenidos, así como de otros aislados obtenidos.
- La identificación mediante secuenciación de microorganismos no descritos anteriormente en la flora fecal animal, aislados durante el procesado de las muestras fecales, algunos de los cuales podrían definirse como nuevas especies.

Summary

Clostridium difficile is a grampositive anaerobic bacillus. It is known as causal agent, for different pathologies, affecting human beings. The most important ones are the antibiotic associated diarrhea and the pseudomembranous colitis. Moreover, it can cause pathologies as colitis or typhlocolitis in other animal species (mice, horses, dogs, cats, pigs, ostriches,...). Furthermore, it is present in the intestinal tract of many different animals, although not related yet with any pathology.

The main pathogenicity factors of *C. difficile* are A (tcdA) and B (tcdB) toxins, released by most of the strains and coded in the same pathogenicity locus. Their toxic activity acts in various intestinal mucous cells, mainly enterocytes, provoking injuries in the intestinal mucous and inflammation that end with diarrhea, colitis or pseudomembranous colitis. Some strains present the binary toxin (CDT) as well, which acts sinergically with both others two toxins. The example is the *C. difficile* hipervirulent strain 027.

However, important details are absents in the study of this microorganism to elucidate its infective cycle, like its natural reservoir and the interactions in the intestinal ecosystem. According to that, in this thesis the reservoir of *C. difficile* has been studied, as well as the role of different animals in the keeping of the illness. Additionally, non described bacterial species that may form part of the animal intestinal normal flora, controlling growing *C. difficile*, have been isolated and studied, too.

For this reason, the study has been divided in four different parts:

- Study of the prevalence of *C. difficile* in domestic animals in Spain, mainly in farms where pork are brought up, especially the ones located Catalonia, Castilla La-Mancha and Aragon, which represent together more than half of Spanish pork production.

- Study of the prevalence of *C. difficile* in Spanish wild animals focusing on those living in the National Park of Doñana. During the research, *C. difficile* phenotypically similar microorganisms were found.
- Confirmation and molecular characterization, toxinotyping in this case, of *C. difficile* isolates, and others isolates obtained.
- DNA sequencing, for identification of microorganisms non described previously into the animal fecal flora, isolated during the study of fecal samples. Some of them, could be defined as new species.

Prefacio

El planeta en el que vivían era tubular, enorme, larguísimo. Ellos habitaban en la región interna de aquel acogedor mundo, que no giraba alrededor de una estrella, sino que estaba rodeado por ésta. Estaba literalmente envuelto por su fuente de calor y energía, lo que les proporcionaba una agradable temperatura veraniega todo el año.

Tenían suerte de vivir en aquel planeta, donde el sustrato era generoso y confortable, y el maná caía del cielo y, pese a la superpoblación, no había masificación ni hambrunas. Todos tenían un lugar y una función. Cada uno podía desarrollar libremente su vocación, trabajar en lo que le dictaban sus genes: sintetizaban vitaminas, consumían oxígeno, producían butirato, defendían y evitaban la colonización de individuos extraños y malintencionados... El periodo de aprendizaje era rápido, cuasi-instantáneo. Si querían mejorar sus funciones y resistencias, sólo tenían que esperar a que algún pariente les pasara el plásmido correspondiente, aquel que contenía la información adecuada, y en poco tiempo tenían interiorizados los conocimientos. A veces, con suerte, se los encontraban tirados en el medio y podían acceder a ellos libremente. En el peor de los casos, era necesario recurrir a un implante vírico, es decir, necesitaban la ayuda de un especialista en inserciones genómicas. La vida en aquel mundo era apacible, tranquila, cíclica: nacían, crecían y cuando se sentían lo suficientemente maduros tenían descendencia. Podían considerar que vivían en el paraíso.

Pese a la paz que reinaba y a la mutua colaboración de todos los pobladores, no podían evitar las catástrofes naturales. En algunas ocasiones, fuertes riadas arrasaban zonas enteras. Sin causa conocida para ellos, el sustrato que los envolvía secretaba más agua de la habitual y los arrastraba, ladera abajo, junto con los excrementos, hacia la luz, sin que sus moléculas de adhesión tuvieran alguna oportunidad de anclarse. En estas ocasiones morían algunos millones de individuos, muy pocos, y el lugar era rápidamente colonizado por la vida, que se abría camino.

En cierta ocasión, sin embargo, sucedió un desastre ecológico que dejó cicatrices indelebles en aquella tierra. Los nutrientes que caían del cielo, y los habían estado

alimentando por generaciones, llegaban contaminados con extrañas moléculas que paralizaban su síntesis proteica, y cada ocho horas morían cientos de millones de individuos. Los planes de repoblación de la comunidad de microbiota eran insuficientes y parecía que las dosis de veneno se iban incrementando con el tiempo, y comenzaba a afectar a otros sistemas celulares. Nunca se había visto tan despoblado el terreno: milímetros y milímetros sin ningún microorganismo. Todos tenían la sensación de que iban a extinguirse sin remedio. La situación era desoladora, y los augurios cada vez más nefastos. Pero para sorpresa de todos, una especie enclenque y mala competidora, que hasta entonces había vivido recluida en pequeños microhábitats, y parecía inmune a lo que fuera que los estaba exterminando, se envalentonó. *Clostridium difficile* era su nombre, y se hizo famosa. Sus descendientes eran cada vez más numerosos e influyentes, cada vez acaparaban más superficie, pero el poder les cegó. Crecieron y se expandieron sin control, sin regular la concentración de toxinas que liberaban al medio ambiente. Los niveles de contaminación llegaron a ser letales para las células que los sustentaban, pero no les importó. Su único afán era ser cada vez más y más.

La superficie en la que habían habitado durante muchos días se convulsionó y contrajo de forma dolorosa, y grandes riadas comenzaron a surgir de los intersticios celulares y de las células que morían estallando. La fuerza del agua era tal que arrastraba zonas enteras de la mucosa a su paso. Si antes las muertes se contaban a millones, ahora se producían por billones, pero *C. difficile* estaba tan obcecado siguiendo su particular camino hacia la inmortalidad que no percibió la muerte de todos aquellos inocentes, amigos, simbioses, en aquella masacre descontrolada.

Cierto día, las enterobacterias notaron que los nutrientes las fortalecían, la ecuación se había invertido, los contaminantes que caían junto al maná sólo afectaban a los *difficile*. Poco a poco su número y su poder en la comunidad fue disminuyendo. Llegaron nuevos colonos, microorganismos beneficiosos y trabajadores, bienvenidos en aquel mundo por reconstruir, que se instalaron rápidamente sobre la mucosa despoblada, crecieron y se multiplicaron exponencialmente hasta llegar a su *plateau*.

La población de *C. difficile* no se dejaba relegar tan fácilmente por lo que, y aunque reducida y en pequeños grupos dispersos, se habían organizado en guerrillas y atacaban al sustrato con las propias toxinas que producían. El resultado era de

inestabilidad en ciertas zonas, pero el resto de bacterias establecieron relaciones interespecíficas para reducir sus zonas de influencia, poco a poco, hasta que muchos *difficile* asustados se ocultaron adoptando sus formas de resistencia, y otros se recluyeron en esos microhábitats que los habían mantenido por generaciones.

Afortunadamente, la guerra sólo duró algún tiempo. La ecología que había sido arrasada, pronto volvió a alcanzar los niveles de diversidad y complejidad previa al ataque. Las biomoléculas que caían del cielo eran adecuadas para todos y las temperaturas veraniegas favorecían el desarrollo. Aquel planeta, llamado Intestino Grueso, renació tras la gran perturbación.

INTRODUCCIÓN

I.- *Clostridium difficile*

I.1. Historia

En 1935, Ivan C. Hall y Elizabeth O'Toole aíslan por primera vez un nuevo bacilo anaerobio, potencialmente patógeno, como ellos mismos observan, a partir de heces de niños sanos. Le denominan *Bacillus difficilis* por su morfología bacilar, además de por ser anaerobio y formar esporos y, sobre todo, por la dificultad que les supuso su aislamiento y estudio metabólico: el aislamiento porque este microorganismo crece lentamente y es anaerobio estricto, y la caracterización bioquímica porque no presenta ninguna característica fisiológica destacable (Hall y O'Toole, 1935).

Como complemento a la caracterización del nuevo microorganismo, estudian sus propiedades patogénicas y observan que el filtrado del medio de cultivo líquido en el que crecía el microorganismo presentaba una patogenicidad entre 100 y 1000 veces la Dosis Letal Mínima por centímetro cúbico, para cobayas y conejos. Los autores hipotetizan sobre el posible papel de estas toxinas en las diarreas del recién nacido (Hall y O'Toole, 1935). El tema es confirmado por Snyder, que vuelve a aislar el microorganismo en otros dos estudios posteriores apreciando, además, que existen cepas toxigénicas y cepas no toxigénicas (Snyder, 1937; Hafiz y Oakley, 1976).

En 1938, *Bacillus difficilis* es rebautizado como *Clostridium difficile*, por Prévot (ICSB, 1976) y por tanto, trasladado al género *Clostridium*. En 1960, *C. difficile* vuelve a aparecer en la literatura de forma fortuita: McBee lo aísla de muestras fecales de un león marino (McBee, 1960). Dos años después aparece asociado a diversas patologías como heridas de guerra o colitis graves en humanos (Smith y King, 1962) y cuatro años después, se encuentra en un estudio sobre la flora intestinal de las langostas del desierto (*Schistocerca gregaria*) (Stevenson, 1966) en un linaje de animales de laboratorio.

El interés por este microorganismo empieza a incrementarse a partir de 1974, cuando Hafiz centra su tesis doctoral en la caracterización de *C. difficile*, su morfología macro y microscópica, y sus características bioquímicas más preeminentes (Hafiz, 1974), publicando dos artículos: uno en 1975 en el que expone el aislamiento de *C.*

difficile del tracto genital tanto de hombres como de mujeres (Levett, 1984) y otro en 1976, donde describe los resultados de su tesis (morfología y fisiología) (Hafiz y Oakley, 1976). En un estudio independiente, Modaber (1975) aísla *C. difficile* de heces humanas y de diversos animales. En esa misma época comienzan a aparecer los primeros artículos que relacionan diarrea y colitis, incluso colitis pseudomembranosa, con el consumo de antibióticos a mediados de los años 70 del pasado siglo (Knoop et al., 1993). Green (1974) incluso estudia la citotoxicidad producida por las heces de diarrea inducida por antibióticos, concluyendo que debería estar producida por un virus.

En 1977 aparece el trabajo clave, de la mano de Bartlett, quien establece que *C. difficile* es el agente causal de una colitis inducida por el consumo de clindamicina en hamsters (Bartlett et al., 1977). A partir de ese momento, la publicación de trabajos sobre *C. difficile* ha ido en aumento.

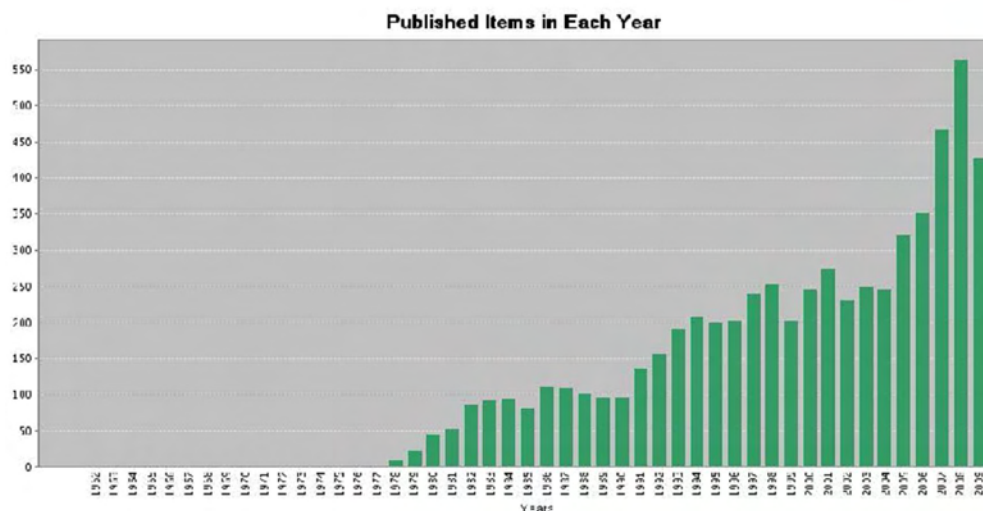


Figura 1. Gráfico que muestra la evolución en las publicaciones sobre el tema *C. difficile* desde 1962 hasta 2009. Tomado de Web of knowledge.

http://sauwok.fecyt.es/apps/CitationReport.do?product=WOS&search_mode=CitationReport&SID=Y22e2lJaGMKiPHhhead&page=1&cr_pqid=1

I.2. Características de *Clostridium difficile*

Clostridium difficile es un bacilo grampositivo (con reacción a la tinción variable), que mide aproximadamente 0,5x3-6 µm, anaerobio estricto, esporulado, resistente a múltiples antibióticos, que puede habitar el tracto intestinal del hombre y de otros animales (Baverud, 2002; Lizuka et al., 2004). Algunas cepas son móviles por la

presencia de flagelos peritricos. En algunas cepas, las células vegetativas se unen por los extremos formando pequeñas cadenas de 2 a 6 células.



Figura 2. Imagen de microscopía 100x, de algunos bacilos de *C. difficile* esporulados

Una de sus características más importantes es la formación del espora. Este constituye una estructura de resistencia ante las condiciones ambientales adversas, principalmente frente a la deshidratación, el calor, el oxígeno y los agentes tóxicos (Kuijper y Tüll, 2006; Kramer et al., 2006), lo que le permite permanecer meses en la superficie de objetos o en el suelo. Además parece que también facilita su dispersión de forma aérea (Roberts et al., 2008). El único compuesto químico capaz de eliminar los esporos ha sido el hipoclorito de sodio, demostrando una gran capacidad para reducir las tasas de infección por este microorganismo (Hacek et al., 2010).

Las colonias de *C. difficile* en agar sangre tienen un diámetro de 2-5 mm, siendo circulares o rizoides, entre planas y poco convexas, de color grisáceo y superficie mate o algo satinada, y no hemolíticas (Hall y O'Toole, 1935; Hafiz y Oakley, 1976). A esto podemos añadir, por observaciones propias, que es grisácea, pero acercándose al blanco en la zona

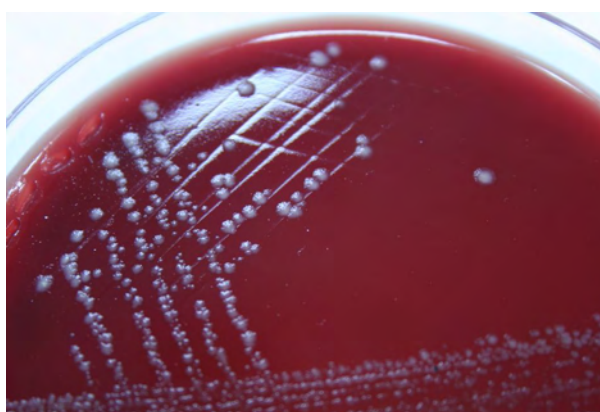


Figura 3. Imagen de las colonias de *C. difficile* en agar sangre

más central y redonda, pero con el borde irregular, tal y como se puede ver en la figura 3. Además, y como curiosidad, merece la pena destacar la descripción poética que hace

Hafiz en 1976 del crecimiento de este microorganismo en agar RCM (Medio Reforzado para Clostridios) en tubo:

“Tras inocular 0.5 ml de una suspensión de 10^3 bacterias por ml en 25 ml de RCM, el crecimiento comienza a aparecer como una pequeña lágrima (o grupo de ellas) 1-1.5 cm más abajo del menisco, con una diminuta burbuja en el centro; este es presumiblemente el mayor nivel al cual el organismo puede crecer. La lágrima crece gradualmente hacia abajo mediante proyecciones como dedos, los cuales parecen estar sostenidos por burbujas entre ellos; después la apariencia general muestra una marcada similitud con un maizal en miniatura. La colonia resistirá sacudidas suaves, después tiende a formar una niebla como de hongo la cual finalmente se asienta en el fondo, dejando el sobrenadante claro y casi estéril (Hafiz y Oakley, 1976).”

Su característica más peculiar es el olor a establo de caballos que desprenden debido a las sustancias volátiles que sintetizan, como el p-cresol (Songer et al., 2009), aunque Hafiz (1974) en su tesis afirma que huelen a fruta dulce. Su temperatura óptima de crecimiento *in vitro* es de 30 a 37°C; Sin embargo presenta un rango de temperaturas de crecimiento entre los 25 y los 45°C. Las endosporas que puede formar *C. difficile* son generalmente ovals y subterminales.

El tamaño de su genoma es de 4.4 Mb aproximadamente, y presenta un bajo contenido en guanina-citosina (28%) (Baverud, 2002). Debido a esta última característica, se le clasifica como perteneciente al *Phylum Firmicutes*, eubacterias grampositivas con bajo contenido en G-C.

Dentro del *Phylum*, como *Clostridium*, *C. difficile* fue automáticamente encuadrado dentro de la familia *Clostridiaceae*, en el orden *Clostridio* (Baverud, 2002). Posteriormente, en 1975 Johnson y Francis estudiaron el ARNr de las especies conocidas de *Clostridium* hasta ese momento, y observaron que estaban poco relacionadas filogenéticamente (Johnson y Francis, 1975) por lo que dividieron al género en diferentes grupos según la distancia evolutiva que existía entre ellos. Lo que estos autores denominaron grupo I-A podría coincidir con el actual cluster I o los

clostridios *sensu stricto* (Collins et al., 1994; Gupta y Gao, 2009), de los cuales la especie tipo es *C. butyricum* (Gupta y Gao, 2009). En esta clasificación mediante clusters, *C. difficile* estaría situado dentro del cluster XIa junto con bacterias del género *Peptostreptococcus*.

En la última revisión del manual Bergey (Ludwig et al., 2009), ahondando en la relación parafilética de la familia *Clostridiaceae*, se trasladan algunas especies del género *Clostridium*, siguiendo el criterio de la proximidad filogenética. Por tanto, *C. difficile* se sitúa dentro de la familia *Peptostreptococcaceae* “*incertae sedis*”, monofilética, que incluye, además, a los géneros *Peptostreptococcus*, *Filifactor*, *Sporacetigenium* y *Tepidibacter*, a las especies *Clostridium bartlettii*, *C. bifermentans*, *C. difficile*, *C. ghoni*, *C. glycolicum*, *C. hiranonis*, *C. irregulares*, *C. litorale*, *C. lituseburense*, *C. mangenotii*, *C. paradoxum*, *C. sordellii*, *C. stocklandii*, *Eubacterium tenue* y *E. yurii*.

Desde el punto de vista clínico, esta clasificación resulta demasiado exhaustiva y no proporciona ninguna ventaja para el diagnóstico o el tratamiento, prefiriéndose clasificar a los clostridios patógenos en cuatro grandes grupos, según las manifestaciones clínicas de las patologías que producen: clostridios neurotóxicos, clostridios histotóxicos, clostridios que producen enterotoxemias y clostridios asociados con enfermedades inducidas por antibióticos, entre los que se encontraría *C. difficile* (Baverud, 2002).

I.3. Patogenia

La acción patógena se desarrolla en el intestino del hospedador. Los esporos de *C. difficile*, previamente ingeridos por el hospedador, germinan para dar lugar a las células vegetativas (Beaugerie, 2004). Pero *C. difficile* es un mal competidor (Wilson y Perini, 1988; Keel y Songer, 2006), es decir, en presencia de la flora normal intestinal, *C. difficile* no es capaz de multiplicarse y por tanto secretar las toxinas necesarias para producir algún tipo de patología, por lo que permanece en forma de espora hasta que las condiciones ambientales son adecuadas para su germinación (Sorg y Sonenshein, 2008). Por ello, las patologías de carácter intestinal asociadas a *C. difficile* suelen estar ligadas

a elementos que originan una disrupción en la microflora intestinal y “vaciado” de nichos (Beaugerie, 2004). Los más comunes son los antibióticos (Songer, 1996), aunque también se sospecha de otros fármacos como puedan ser los inhibidores de la bomba de protones (Dial et al., 2005) y de la concurrencia de algún otro factor no identificado (Baines et al. 2009).

El proceso patogénico comienza cuando se produce un sobrecrecimiento de *C. difficile* en el tracto intestinal, y esto sólo se produce si no hay microorganismos competidores para *C. difficile*. La falta de microorganismos totalmente adaptados al intestino (mejores competidores) ocurre durante su sucesión ecológica primaria o secundaria. La sucesión ecológica primaria es el proceso ecológico por el cual se establece por primera vez una comunidad en un hábitat dado. En el caso del intestino, ocurre en los primeros meses de vida (Mackie et al., 1999) del hospedador, cuando llegan muchos microorganismos diferentes y nuevos, algunos de los cuales podrán colonizar la mucosa y otros no. Si las poblaciones están adaptadas a las condiciones específicas del intestino (interacciones con el hospedador y con el resto de la flora) se perpetuarán. Si no lo están, se sustituirán por otras nuevas mejor adaptadas a ese hábitat hasta que formen una comunidad estable. La sucesión ecológica secundaria intestinal es el proceso de restablecimiento de la flora normal tras una disrupción de la misma. La causa principal de esta disrupción suele ser el consumo masivo de antibióticos y el desarrollo es similar al de la sucesión primaria, basado en competencias entre los microorganismos.

En ambos momentos, la competencia para *C. difficile* no existe, por lo que si este microorganismo está presente le resulta más sencillo multiplicarse y colonizar la mucosa, ocupando los nichos vacíos que dejan los microorganismos eliminados. Su papel como patógeno neonatal depende de la especie, pues en algunos animales como el cerdo es uno de los principales agentes causales de la diarrea neonatal (Songer, 1996), mientras que en neonatos humanos aparece con una prevalencia del 80% (Kuijper y Tüll, 2006; Barbut y Petit, 2001) y no está asociado a patología alguna. Parece que esta diferencia se debe a la falta de receptores para las toxinas en el epitelio intestinal del neonato humano (Keel y Songer, 2006). Una vez aclimatado, secreta las toxinas mediante las cuales ejercerá daño en las células intestinales y, consecuentemente, en el hospedador.

La patología se originaría siguiendo la secuencia de acontecimientos que se esquematiza a continuación, y que se explicará en profundidad junto con cada factor de virulencia descrito.

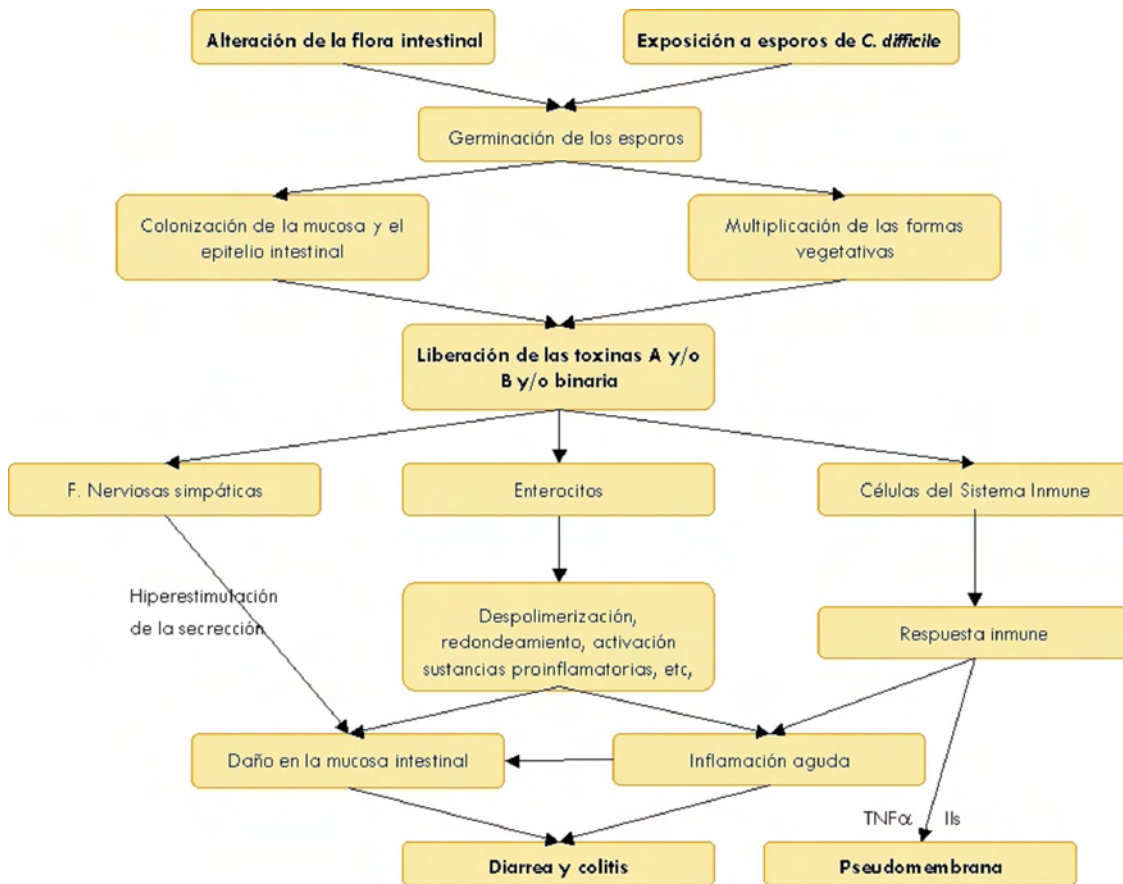


Figura 4. Patogénesis. Modificada de Xia et al., 2000; Poxton et al., 2001, Baverud, 2002; Keel y Songer, 2006; Deneve et al., 2009.

I.4. Factores de patogenicidad de *C. difficile*

La patogénesis referida arriba no está completa, ya que existen muchos mecanismos por dilucidar, sobre todo en relación con las diferentes manifestaciones clínicas y la baja especificidad en cuanto al portador. Por otra parte, sabemos que los daños en el hospedador se producen por factores del microorganismo que en muchas ocasiones no resultan imprescindibles para su supervivencia, denominados factores de patogenicidad. A continuación se especificarán las características de *C. difficile* que se

han considerado factor de patogenicidad y su papel en la patología que produce el microorganismo:

I.4.1. Toxinas

C. difficile, como la mayoría de los clostridios, secreta toxinas mediante las cuales ejerce su poder patogénico. En *C. difficile* se han descrito y caracterizado 3 toxinas: toxina A (*tcdA*), toxina B (*tcdB*) y binaria (CDT) (Borriello, 1998). La secreción de toxinas ha sido, sin duda, el factor de patogenicidad mas estudiado.

I.4.1.1. *PaLoc*

PaLoc es un *locus* de patogenicidad de *C. difficile*. Está formado por 5 genes: 2 que codifican para la toxina A y para la toxina B, y tres genes accesorios con actividad reguladora.



Figura 5. Representación esquemática del *locus* de patogenicidad *PaLoc* donde se hallan los genes que codifican para las dos toxinas principales de *C. difficile*. (Modificado de Poxton et al., 2001)

Las dos toxinas están codificadas por los genes *tcdA* y *tcdB*, respectivamente. El gen *tcdC* parece estar implicado en la regulación negativa de las toxinas. Codifica para una proteína de 231 aminoácidos y se transcribe de forma separada a los genes *tcdA* y *tcdB*. Esta proteína parece asociarse a la membrana celular de la bacteria. Se ha observado que cepas mutantes para este gen tienen una mayor toxicidad, llegando a aumentar el poder tóxico 16 veces para la toxina A y 23 veces para la toxina B si la mutación fuera la delección de 18 pb (Govind et al., 2006) como ocurre en la cepa con ribotipo 027 (Akerlund et al., 2008).

El gen *tcdE* es un ORF o región de lectura abierta (Open Reading Frame) de 501 pb situada entre *tcdA* y *tcdB*, a 122 pb aguas abajo del codón stop de *tcdB* y 727 pb aguas arriba del codón inicio de *tcdA*. *tcdE* codifica una proteína putativa, teóricamente

de 166 aminoácidos y 19 kDa, que se piensa altamente hidrofóbica. Este péptido presenta una estructura muy similar a las proteínas “*holin*” bacterianas que participan en el proceso de formar un “punto de salida” para metabolitos bacterianos, por lo cual se especula que el papel de esta proteína denominada proteína “*holin-like*” esté relacionado con la liberación de las toxinas al espacio extracelular, ya que ninguna de las toxinas tienen un péptido señal para salir de la bacteria. Esta proteína se sintetizaría si el marco de lectura comienza en el primer codón de inicio descrito; si la transcripción comenzara en otro de los dos codones descritos hasta la fecha se asume que se traducirían proteínas estructural y funcionalmente diferentes (Tan et al., 2001).

tcdR (o *tcdD* o *txeR*) es un factor sigma. Los factores sigmas son fragmentos de la cadena de ADN, con secuencias específicas que actúan como promotores de los genes *tcdA* y *tcdB*. De este modo, la ARNpolimerasa, la enzima que sintetiza el ARN, se une a esta región como punto de partida para la síntesis del ARN mensajero para estas dos proteínas (Dupuy et al., 2006). Este gen se considera, por tanto, un regulador positivo de la síntesis de las toxinas A y B, ya que su bloqueo inhibiría la síntesis de las toxinas.

La estructura de este locus ha cobrado importancia tras el hallazgo de cepas toxina A⁻ toxina B⁻ toxina binaria⁺ y de cepas hipervirulentas (001, 017, 027 y 078), por las implicaciones que han demostrado tener pequeñas mutaciones en el conjunto de los cinco genes en la virulencia del microorganismo. Su estructura básica se ha considerado lo suficientemente conservada como para utilizarse para diferenciar cepas entre sí por la presencia y tamaño de los genes codificados en este *locus* (Rupnik et al., 1998), en cada clon aislado.

1.4.1.2. Toxinas A y B

La toxina A, o enterotoxina, es una proteína cuyo peso molecular es de 308 kDa y que está formada por tres dominios funcionales. El extremo N-terminal es el dominio que presenta la acción catalítica responsable de la toxicidad. Ésta es la única región que penetra en la célula del hospedador, mediante autoproteólisis de la toxina (Rupnik, 2007). La parte que se introduce en la célula diana es un péptido de 543 aminoácidos, muy similar a las glucosiltransferasas bacterianas de la familia de las GT-A. El extremo C-terminal es el responsable de la unión de la toxina al receptor de la célula diana. Está

constituido por secuencias peptídicas repetidas características de los clostridios, cuya estructura secundaria es de tipo horquilla β . La zona central, llamada dominio de translocación, abarca más del 50% del tamaño de la proteína. Contiene una secuencia hidrofóbica de anclaje de la proteína en la membrana celular del enterocito (Giessemann et al., 2008). De esta estructura, se deduce que la toxina A se une a los receptores celulares por su extremo C-terminal. Los receptores identificados hasta la fecha son hidratos de carbono, como galactosa, N-acetilglucosamina, sacarosa-isomaltasa o Gala1-3Galb 1-4GLCNAc, dependiendo de la especie animal estudiada (Krivan et al., 1986; Tucket y Wilkins, 1991; Rolfe y Song, 1993; Pothoulaskis et al., 1996). Los receptores se encuentran en la zona apical del enterocito, en el borde en cepillo de las células susceptibles (Keel y Songer, 2006).

La toxina B es la segunda de las toxinas que encontramos en el *locus PaLoc*. Es una proteína de 270 kDa con una estructura funcional y secuencia de aminoácidos muy similar a la de la toxina A. El mecanismo de acción es prácticamente idéntico al de la toxina A. Se diferencia en los receptores celulares. Éste no parece un carbohidrato, ya que la toxina se une a células que no presentan glucocalix. Y se hipotetiza que su localización será basolateral, no apical (Keel y Songer, 2006).

Tras la unión al receptor, las toxinas sufren autoproteólisis, y el extremo N-terminal es fagocitado, por lo que penetran al interior de la célula en el interior de lisosomas ácidos. El mecanismo de salida del lisosoma no ha sido dilucidado para la toxina A. La toxina B parece que es liberada por el lisosoma directamente al citosol.

El mecanismo de acción de las toxinas dentro de la célula, mediante el cual ejercen el daño celular, es la modificación de las proteínas Rho (Rho, Rac y Cdc42) (Nusrat et al., 2001). Estas proteínas constituyen una subfamilia de las proteínas Ras GTPasa. Las proteínas Rho están implicadas en los procesos de señalización celular, como por ejemplo la regulación del citoesqueleto de actina, por la polimerización y despolimerización de la actina (pasando de actina-G a actina-F), la adhesión, la migración, la polaridad celular, actividades enzimáticas, en la transcripción de genes e incluso en la apoptosis (Etienne-Manneville y Hall, 2002).

Las toxinas catalizan la glucosilación de la proteína Rho GTPasa, lo que bloquea su activación. De este modo inhibe su acción e impide su paso de la membrana al citosol. Esta actividad molecular se traduce en un redondeamiento de la célula por despolimerización de la actina-F, ruptura de las uniones íntimas (*tight junctions*) con las células vecinas del epitelio y muerte por apoptosis (Giessemann et al., 2008).

La toxina A también actúa como un potente proinflamatorio. En las células en las que penetra activa el factor nuclear- κ B, el cual favorece la síntesis y liberación de sustancias quimioatrayentes como las interleuquinas (IL) o las prostaglandinas. En roedores también activa la liberación de la proteína inflamatoria de macrófagos 2 (MIP-2) (Castagliuolo et al., 1998). En modelos animales se ha visto que también provoca la liberación de leucotrieno B₄, prostaglandina E₂, factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y en el colon humano de interleuquina-8 (IL-8) (Castagliuolo et al., 1998; Pothoulakis y LaMont, 2001). Además, en cultivos celulares de monocitos, se ha comprobado que activa la liberación de IL-1, IL-6 y TNF- α (Flegel et al., 1991) y de IL-8 (Linevsky et al., 1997).

El TNF α y las interleuquinas desencadenarán una respuesta inmunitaria mayor, que derivará en la formación de la pseudomembrana (Poxton et al., 2001; Meyer et al., 2007). Estos efectos se han contrastado con estudios a nivel de órgano, en intestino de conejo, observándose que la toxina A provoca necrosis celular, así como un aumento de la permeabilidad intestinal.

La toxina A activa el factor nuclear- κ B de todos los tipos celulares, como se ha mencionado. En concreto, en los macrófagos de la lámina propia, el efecto de esta activación es la subsecuente activación de las rutas que conducen a la síntesis de ciclooxigenasa-2 (COX2). COX2 es una de las enzimas que participa en la ruta de la síntesis de prostaglandinas, principalmente prostaglandina E₂ (Alcántara et al., 2001). La prostaglandina E₂ inhibe la absorción de cloruro sódico y agua por los enterocitos e induce la secreción de cloruro sódico, que conlleva salida masiva de agua de las células intestinales. La prostaglandina E₂ también interviene en la vasodilatación, favoreciendo la salida de sangre a través de la mucosa intestinal (Alcantara et al., 2001). Como consecuencia, se daña el borde en cepillo de la membrana celular y el *villi*, pudiéndose

erosionar la mucosa completamente. El síntoma visible es un fluido viscoso y sanguinolento (Poxton et al., 2001).

A nivel inflamatorio, la IL-8 liberada por los monocitos estimula la migración de neutrófilos desde la lámina propia hasta el lugar concreto donde se está produciendo la infección (Kelly et al., 1994; Linevsky et al., 1997). La liberación de IL-8 se mantiene en el tiempo porque las toxinas pueden dañar a las mitocondrias, lo que implica una disminución de la concentración de ATP y un aumento de los radicales libres de oxígeno (He et al., 2000). La alta concentración de éstos últimos activa al factor nuclear- κ B, que desencadena la liberación de IL-8 por el enterocito (He et al., 2002).

La toxina A puede afectar además al sistema nervioso. Por un lado, estimula a las neuronas sensoriales primarias, y favorece la liberación de sustancia P por parte de éstas (McVey y Vigna, 2001). La sustancia P actuará como otra sustancia proinflamatoria más, determinante para la presentación clínica de la enfermedad (Pothoulaski et al., 1994). Por otro lado, inhibe la liberación de noradrenalina por las fibras nerviosas simpáticas postganglionares del intestino delgado. La falta de noradrenalina genera un estado de hiperestimulación de las neuronas secretomotoras entéricas, que se traduce en una mayor secreción de agua y sales a la luz intestinal por los enterocitos (Xia et al., 2000).

A nivel celular se ha comprobado que la toxina B tiene una citotoxicidad entre 100 y 10000 veces mayor que la toxina A (Sullivan et al., 1982; Tucker et al., 1990). Sin embargo, no se ha observado ninguna actividad tóxica en el intestino “*in vivo*”, lo que ha inducido a estos autores a hipotetizar que la toxina B necesita que la mucosa esté previamente dañada, por ejemplo por efecto de la toxina A (Taylor et al., 1981), con lo que ambas toxinas actuarían sinérgicamente (Keel y Songer, 2006). Esta hipótesis ha sido rechazada por un reciente trabajo, en el que se han construido mutantes de *C. difficile* para las toxinas. En este experimento, lo que han tratado es ver si el efecto de la citotoxicidad y toxicidad *in vivo* de los mutantes era la misma que la de la cepa salvaje. Los resultados han mostrado que la actividad de las toxinas es independiente y que no es necesario que estén presentes ambas para provocar daños en el hospedador (Lyras et al., 2009).

1.4.1.3. Toxina binaria

La toxina binaria o CDT, descrita por Popoff en 1988 (Popoff et al., 1988), es una toxina adicional que sintetizan ciertas cepas de *C. difficile* como la cepa epidémica NAP1/ribotipo 027 (O'Connor et al., 2009). No está relacionada genética ni estructuralmente con las toxinas A y B y se cataloga dentro del grupo de las toxinas binarias clostridiales (junto con la toxina iota de *C. perfringens* tipo E, la toxina de *C. spiriforme*, y la toxina C2 de *C. botulinum* C y D) (Gonçalves et al., 2004). Como sucede en todas estas toxinas, CDT está formada por dos subunidades, ambas imprescindibles para ejercer el efecto tóxico, CDTa y CDTb. CDTa es el componente que se introduce en las células y ejerce la acción tóxica y CDTb es la parte que se une al receptor celular (Geric et al., 2003).

La toxina binaria es una ADP ribosiltransferasa específica de actina. Por tanto, ejerce la acción tóxica al catalizar la ribosilación de la actina, con la consiguiente desorganización del citoesqueleto de la célula diana. Esta acción la realiza la región C-terminal de la subunidad CTDa (Gülke et al., 2001). En la célula afectada se observa un redondeamiento por la despolimerización de los filamentos de actina (Gonçalves et al., 2004). En el modelo del bucle ileal de intestino de conejo produce acumulación de líquido (Carter et al., 2007).

La toxina binaria está codificada en el locus cromosómico *CdtLoc*, en los genes *cdtA* y *cdtB* (Geric et al., 2003; Gerding, 2009). Se ha identificado, así mismo, un regulador funcional positivo, *cdtR* ligado genéticamente al locus CDT (Carter et al., 2007).

Como se ha referido anteriormente, CDT sólo es sintetizada por algunas cepas de *C. difficile*, que sintetizan o no las otras dos toxinas (Elliot et al., 2009; Cheknis et al., 2009), por lo que se infiere que no es clave en la virulencia de este microorganismo, aunque actúa como factor de virulencia adicional (Gonçalves et al., 2004). Se ha demostrado que ejerce un efecto similar al del resto de toxinas binarias clostridiales (Geric et al., 2006).

Así mismo, se ha visto que favorece la colonización del microorganismo, al inducir la formación de largas y delgadas protusiones de microtúbulos por las células epiteliales, una vez que los filamentos de actina han comenzado a despolimerizarse, originando una maraña en el exterior celular donde las bacterias podrían quedar “atrapadas” (Schwan et al., 2009)

I.4.2. Adhesión

Por adhesión se entiende la unión del microorganismo al tejido del hospedador. Se considera imprescindible para la colonización y, por tanto, para la patogénesis. Es una característica propia de todas las bacterias de la microflora normal, ya que es necesaria para la permanencia de las bacterias en el tracto intestinal, en contra del continuo flujo de fluidos intestinales.

La adhesión de *C. difficile* a las células intestinales está mediada por multitud de moléculas diferentes (Calabi et al., 2001; Hennequin et al., 2001; Tasteyre et al., 2001; Waligora et al., 2001; Calabi et al., 2002; Karjalainen et al., 2002; Hennequin et al., 2003; Janoir y Collignon, 2004). Se ha comprobado, tanto *in vitro* como *in vivo*, que las células vegetativas pueden unirse a los enterocitos directamente o a componentes de la matriz (Borriello et al., 1988; Cerquetti et al., 2002). No se han observado grandes diferencias en la adhesión a las células entre las cepas virulentas y las no virulentas (Drudy et al., 2001; Waligora et al., 1999).

De las moléculas implicadas, las más estudiadas son las siguientes:

I.4.2.1. S-layer

La capa S o “S-layer” es una doble envuelta, de naturaleza cristalina, formada por proteínas y glicoproteínas, denominadas *Surface Layer Proteins* o proteínas de la capa superficial o SLP, que recubre a la célula en muchas especies de eubacterias y arqueobacterias.

Presente en *C. difficile*, la podemos encontrar en todas las cepas. Está formada por una capa externa y otra interna, conformadas cada una de ellas por un tipo principal

de proteína, cuyos pesos moleculares varían ligeramente de una cepa a otra. En la capa más externa se encuentra mayoritariamente una proteína de 32-38 kDa (low MW-SLP ó P36), mientras que la interna, más gruesa, está formada principalmente por otra proteína de 42-48 kDa (high MW-SLP ó P47) (Calabi et al., 2001; Janoir y Collignon, 2004). Estas dos proteínas están codificadas en el locus *slpA*, en el mismo gen. Tras la traducción, la larga cadena de aminoácidos se rompe en dos puntos, uno cerca del extremo N-terminal, liberando el péptido señal, y otro en la zona central, separando a las dos proteínas maduras.

El locus *slpA* presenta 12 ORF (Calabi et al., 2002) – 17 ORF (Karjalainen et al., 2002, Janoir y Collignon, 2004), en el mismo sentido de lectura. Además de a las proteínas SLP P36 y P47, el gen codifica a las proteínas Cwp66 y Cwp84, que se comentarán a continuación y otras 11 más. Todas ellas presentan la misma estructura de dos dominios. Los dominios podrían ser uno de anclaje, y el otro se duda entre enzimático o estructural (Denevé et al., 2009). Recientemente se ha observado que la proteasa Cwp84 juega un papel destacado en la maduración de la SLP (Kirby et al., 2009), como se explicará en I.4.4.1.

I.4.2.2. *Cwp66*

La *Clostridial wall protein* de 66 kDa o proteína de pared de clostridios de 66 kDa o Cwp66 es una proteína de superficie de *C. difficile*, que presenta ciertas variaciones entre las cepas. Está codificada por el gen *cpw66* que se encuentra en el locus *slpA*. Se supone que la función de la región N-terminal, debido a la gran homología que presenta con CwpB de *Bacillus subtilis*, es la de reconocer peptidoglicanos (Waligora et al., 2001) de la superficie de las células eucariotas, por lo que podría actuar como adhesina. Además, se ha observado que el extremo C-terminal de esta proteína es muy inmunogénico (Pèchinè et al., 2005).

I.4.2.3. *Fbp68*

La *Fibronectine binding protein* 68 o proteína de unión a fibronectina de 68 kDa o Fbp68, es una proteína que, como su nombre indica, se une a la fibronectina del hospedador, tanto a la soluble como a la inmovilizada, y está codificada en el gen *fpb68*

(Hennequin et al., 2003). La fibronectina es una proteína abundante en la matriz extracelular de las células eucariotas que contribuye a su anclaje en el tejido, y en su forma soluble se encuentra en la sangre donde interviene en procesos de coagulación.

Fbp68 parece encontrarse en la superficie de la bacteria, en la pared celular, según la interpretación de su estructura terciaria. “*In vitro*” ha demostrado poder unirse, también, a otros componentes de la matriz extracelular como el fibrinógeno o la vitronectina (Hennequin et al., 2003)

1.4.2.4. *GroEL*

GroEL es una proteína del grupo de las chaperonas, perteneciente a la familia de las Hsp60 (*heat shock protein* o proteína de shock térmico), y parece que el gen en el que está codificada está conservado en las diferentes cepas. Por la estructura y disposición de los aminoácidos de la proteína, parece poder situarse en la membrana bacteriana o en el exterior de la bacteria (Hennequin et al., 2001).

1.4.2.5. *FliC* y *FliD*

FliC y FliD son dos proteínas que conforman el flagelo de *C. difficile*. La primera es una flagelina de 39 kDa, proteína estructural del flagelo, y FliD es una de las proteínas, de 56 kDa, que conforman el capuchón flagelar. Se las considera implicadas en la adherencia ya que se ha descrito su capacidad de adherirse al mucus del tracto intestinal *in vitro* (Tasteyre et al., 2001).

1.4.2.6. *Fimbrias*

Las fimbrias son estructuras proteicas similares a los flagelos, aunque más cortos y delgados. Se encuentran principalmente en bacterias gramnegativas, siendo su función la adhesión a las células epiteliales. Un buen ejemplo son las fimbrias que podemos encontrar en *E. coli* (Connell et al., 1996). Hay evidencias de que algunas cepas de *C. difficile* podrían presentar fimbrias (Borriello et al., 1988) aunque en otras no se han

visto (Taha et al., 2007), y su función en la mediación de la adhesión, o en algún otro mecanismo de patogenicidad, no ha sido dilucidada.

I.4.3. Cápsula

La existencia de una cápsula polisacáridica en el agente infeccioso se ha demostrado que evita la fagocitosis por las células del sistema inmunitario como los mastocitos o los macrófagos, evitando así la detección del patógeno, como en el caso de *Streptococcus pneumoniae* (Wilson et al., 2002). Por ello, el descubrimiento de que algunas cepas de *C. difficile* presentan cápsula polisacáridica (Davies y Borriello, 1990) lleva a pensar en su papel como factor de virulencia de este microorganismo.

I.4.4. Proteasas

Debido a que en el proceso patogénico de muchos clostridios las proteasas tienen un papel destacado, se comenzaron a buscar las enzimas proteolíticas utilizadas por *C. difficile*. La principal función de estas enzimas sería la participación en el metabolismo bacteriano por su capacidad para la degradación y/o adquisición de nutrientes. Pero también se ha observado que participan en la degradación de proteínas del hospedador y en el procesamiento de las proteínas bacterianas (Janoir et al., 2007). Sin embargo, aunque su presencia se ha relacionado con su virulencia en modelos murinos “in vivo”, no se ha podido establecer su acción en estudios de citotoxicidad en cultivos celulares (Janoir y Collignon, 2004).

I.4.4.1. Cwp84

La proteína Cwp84 es la proteasa mejor caracterizada perteneciente a este microorganismo. Está codificada por el gen *cwp84*, en el locus *slpA*, y muy bien conservado dentro de la especie (Janoir et al., 2007). La proteína está constituida por tres dominios: el péptido señal, el extremo N-terminal con actividad proteolítica (similar a la de las cistein-proteasas) y el extremo C-terminal, con función de anclaje (Janoir y Collignon, 2004). Se ha comprobado que puede romper la molécula de fibronectina y degrada la vitronectina y la laminina (Janoir et al., 2007).

Recientemente, se ha observado que Cwp84 está íntimamente implicada en la maduración de las proteínas de adhesión (SLP) (Kirby et al., 2009) por lo que podría considerarse factor de patogenicidad tanto por su función proteasa como por su papel en el procesado de las proteínas de adhesión del microorganismo.

I.4.5. Genes de resistencia a antibióticos

La secuenciación del genoma de la cepa 630 de *C. difficile* identificó varios genes de resistencia a antibióticos o implicados en ella (Sebaiha et al., 2006):

Tn 5397, gen de resistencia a tetraciclina.

Tn 5398, gen de resistencia a eritromicina.

CD0456, gen de resistencia a daurobicina.

CD0643 – 646, gen de resistencia a bacitracina.

CD3215, gen de resistencia a nogalmicina.

CD0458, gen que codifica para la β -lactamasa.

CD0470, gen que codifica para una proteína reguladora de β -lactamasa.

CD0471, gen represor de β -lactamasa.

CD1624 – *Cd1628*, genes homólogos en un 58% - 77% al gen de resistencia a vancomicina.

Unido a las resistencias propias de la especie, hay que destacar que cada vez aparece un mayor número de cepas con heterorresistencias a metronidazol (Peláez et al., 2008), que junto con la vancomicina, hasta el momento, son los únicos fármacos a los que la bacteria es sensible. Recientemente, un nuevo antibiótico denominado Fidaxomicina ha demostrado la misma eficacia que la vancomicina frente al microorganismo, en la fase tres del ensayo clínico, y se plantea presentarlo ante la FDA para su evaluación en la segunda mitad de 2010 (Optimer Pharmaceuticals, 2010).

I.4.6. Plásmidos y elementos móviles

El genoma de *C. difficile* está formado por el cromosoma circular y un plásmido, denominado pCD630, cuyo tamaño es de 7881 pb. Parece codificar para 11 CDSs (secuencias codificadas predeterminadas) sin función obvia (Sebaiha et al., 2006).

Además se ha observado que el 11% del genoma está conformado por elementos móviles: 7 trasposones conjugativos putativos (elementos genéticos capaces de integrarse, eliminarse y transferirse de un genoma a otro, por un mecanismo similar a la conjugación); 1 secuencia similar a la de un trasposón móvil (elementos genéticos capaces de integrarse en un genoma); 2 profagos (fagos latentes); elementos Skin (elementos parecidos a profagos); e IStrons (elementos genéticos quiméricos que combinan trasposones y secuencias de inserción). Estos elementos le confieren una gran plasticidad (Sebahia et al., 2006; He et al., 2010).

I.5. Ciclo epidemiológico

C. difficile habita en el tracto intestinal de los animales y del hombre. Es excretado al medio exterior tanto en su forma vegetativa como en forma de esporo, junto con las heces del animal colonizado. Una vez en el ambiente, sólo el esporo es capaz de resistir las condiciones aerobias que encuentra.

La vía de transmisión, por tanto, es la vía fecal-oral, desde un animal enfermo, o portador asintomático, a un individuo sano con la microflora intestinal alterada. La entrada del microorganismo puede ser anterior, posterior o simultánea a la alteración de la flora normal. Sin embargo, no es necesario que la ingestión sea inmediatamente posterior a la excreción del microorganismo por el portador, debido a que *C. difficile* puede resistir durante meses las condiciones adversas del ambiente en forma de esporo (Kuijper y Tüll, 2006). Aunque puede dispersarse por vía aérea (Roberts et al., 2008), como se ha comentado en I.2, el principal modo de transmisión son las manos del personal del hospital que actúan como vectores mecánicos en la dispersión de *C. difficile*. De hecho, la estancia en hospitales, ambientes contaminados por el microorganismo, se considera factor de riesgo para contraer la enfermedad (Keel y Songer, 2006).

Una vez ingerido, si las condiciones intestinales permiten la colonización, el microorganismo se multiplicará exponencialmente secretando grandes cantidades de toxinas tcdA, tcdB y/o toxina binaria, provocando el daño en el hospedador, tal y como se ha explicado.

Así mismo, parece que la gravedad de la infección y las recidivas están relacionadas con la concentración de anticuerpos frente a las toxinas que presente el hospedador. Los portadores asintomáticos de *C. difficile* presentan elevados niveles de IgG anti-tcdA en sangre como consecuencia, presumiblemente, de una efectiva respuesta inmunitaria (Kyne et al., 2000). Del mismo modo, se ha observado que la inadecuada respuesta inmunológica y el mal desarrollo de la memoria inmunológica frente a la toxina A de este microorganismo es un factor de riesgo para el desarrollo de recidivas (Kyne et al., 2001).

I.6. Hospedadores de *C. difficile*: Prevalencias y Manifestaciones clínicas

I.6.1. Ser humano

El estudio de *C. difficile* se ha centrado históricamente en el ser humano como hospedador del microorganismo. Esto es debido a que el microorganismo se aisló en este hospedador en primer lugar (Hall y O'tool, 1935) y, sobre todo, al gran gasto sanitario que conlleva para los sistemas de salud de los países “desarrollados” (Kyne et al., 2002).

En humanos, la presentación de la enfermedad es variable. Puede cursar como diarrea, colitis sin pseudomembrana, colitis pseudomembranosa o colitis fulminante. En este último caso, se desarrolla hasta en el 3% de los pacientes que presentan megacolon e ileon tóxico, seguido de perforación intestinal y muerte. Además puede presentar una sintomatología general (síntomas prodrómicos) como fiebre, náuseas, anorexia y malestar, o complicarse con perturbaciones en las concentraciones de electrolitos, hipoalbuminemia e íleo paralizado. Las heces tienen un mal olor y en pocas ocasiones presentan sangre (Wilcox, 2003; Songer, 2004).

En condiciones normales, *C. difficile* es un microorganismo que forma parte de la flora normal intestinal del ser humano en un 3% de los individuos adultos sanos (hasta en el 15% en Japón) (Barbut y Petit, 2001; Kuiper y Tüll, 2006; Baverud, 2002) y hasta en el 80% de los neonatos (Kuiper y Tüll, 2006; Barbut y Petit, 2001). En estos

individuos no parece originar ninguna patología. Por tanto la presencia de este microorganismo en una muestra de heces no tiene por qué indicar que el paciente sufra una infección por *C. difficile*.

Sin embargo, cuando el microorganismo es aislado de una muestra de heces diarreicas o el paciente ha estado sometido a un tratamiento antibiótico, sí se sospecha de Infección por *C. difficile* (CDI). En general, se conoce que *C. difficile* es el responsable de entre el 15% y el 25% de los casos de diarrea asociada a antibióticos (Bartlet, 1994; Barbut y Petit, 2001; Walk y Young, 2008) y del 90% de los casos de colitis pseudomembranosa (Bartlet, 1994; Briceño et al., 2000; Bouza et al., 2005). Estos datos hacen suponer que la incidencia de Diarrea Asociada a *C. difficile* (CDAD) oscila en torno al 0'1%-2(3)% (Barbut y Petit, 2001), variando entre los autores consultados. En estos valores, se observa un aumento gradual de la prevalencia que se correlaciona con la fecha en la que los pacientes fueron diagnosticados y la edad de éstos.

En España, se llevaron a cabo dos estudios coincidentes en fecha para establecer la prevalencia y el estado de esta enfermedad en nuestro país. En el primero, que abarca desde 1997 hasta 2005, se estudiaron los datos de las altas hospitalarias recogidos en la base de datos del Ministerio de Sanidad, analizando aquellos en los que figurara el código para “infección intestinal debida a *C. difficile*” (Soler et al., 2008). En el segundo, el periodo estudiado comprende desde 1999 hasta 2007, y en este caso la información fue recogida directamente de los hospitales participantes dentro del programa EPINE (Estudio de Prevalencia de las Infecciones Nosocomiales en los hospitales Españoles), siendo la información analizada la de todos aquellos diagnósticos que encajaran en la definición del CDC (Control Disease Center): “*diarrea clínica o megacolon tóxico con evidencia de laboratorio de un cultivo de heces positivo y/o un ensayo de toxinas para C. difficile positivo*” (Asensio et al., 2008). Soler et al. (2008), concluyen en base a sus observaciones que la prevalencia de CDAD en España es de 41'2 diagnósticos por cada 100.000 altas, mientras que Asensio et al. (2008), encuentran una tasa media anual de CDI en la población hospitalizada del 9%, siendo de 3'9 por cada 10.000 pacientes en 1999, hasta llegar a los 12'2 por cada 10.000 pacientes en 2007.

Según datos del Instituto Nacional de Estadística de España, en números absolutos, en 2007 se produjeron 48 fallecimientos debidos a *C. difficile* (código A0.04.7 en lista detallada Cie-10), desglosados en la tabla siguiente:

	Total	< 1 año	1-14 años	15-19 años	20-49 años	50-65 años	65-69 años	70-74 años	75-79 años	80-84 años	85-89 años	90-94 años	> 95 años
A04.7													
Ambos sexos	48	0	0	0	1	2	3	6	8	9	9	10	0
Varones	23	0	0	0	0	1	2	3	4	4	4	5	0
Mujeres	25	0	0	0	1	1	1	3	4	5	5	5	0

Tabla I. Número de defunciones debidas a *C. difficile* en España en 2007. Distribuidas por sexos y rangos de edades. (Instituto Nacional de Estadística).

<http://www.ine.es/jaxi/menu.do?type=pcaxis&path=/t15/p417/a2007/&file=pcaxis>

La importancia de la infección por *C. difficile* aumenta en el momento en el que se observa que:

- la infección ya no está restringida al ámbito hospitalario. La infección por *C. difficile* siempre se ha considerado una enfermedad nosocomial, relacionada directamente con las terapias antibióticas administradas en los hospitales. Sin embargo, la incidencia de la CDI adquirida en la comunidad parece estar en aumento (CDC, 2008; Bignardi y Settle, 2008), ligada al incremento de virulencia del microorganismo. Uno de los primeros estudios que lo muestra fue realizado en 1994, tomando como población objeto de estudio a los trabajadores de un centro de asistencia sanitaria de los años precedentes, y obteniendo un valor de aproximadamente 8 casos por cada 100.000 habitantes al año (Hirschhorn et al., 1994). En estudios posteriores llevados a cabo por el CDC en EEUU, en 2005 y 2006, tras observar varios casos de infección grave por *C. difficile* en pacientes con un teórico bajo riesgo para contagiarse, se calcularon incidencias de 7´6 casos por cada 100.000 habitantes y 6´9 casos por 100.000 habitantes, respectivamente (CDC, 2005; CDC, 2008). Éstas cifras contrastan con los casos de CDAD adquirida en la comunidad de Reino Unido, donde sufrieron un gran

aumento, hallando una incidencia de menos de 1 caso por cada 100.000 habitantes en 2001, alcanzando los 22 casos por cada 100.000 habitantes en 2004 (Dial et al., 2005).

- El aumento de virulencia de *C. difficile* (Warny et al., 2005; Kuijper et al., 2008, O'Connor et al., 2009) se debe a la aparición de diversas cepas virulentas como las que se corresponden con los ribotipos 001, 017, 027 y 078 (He et al., 2010). De todas éstas, la que se ha demostrado más virulenta es la cepa con ribotipo 027 / análisis de restricción por endonucleasas tipo B1 / campo pulsado tipo NAP1. Esta cepa produce 16 veces más toxina A y 23 veces más toxina B que las cepas toxigénicas que habían sido descritas hasta el momento, y sintetiza además toxina binaria (Warny et al., 2005). Además es resistente a las fluoroquinolonas. Aunque estaba presente en aislados de los años '80, esta cepa ha trascendido globalmente tras los brotes con víctimas mortales en Estados Unidos y Canadá (Pépin et al., 2005, McDonald et al., 2005) y su expansión por Europa (Kuijper et al., 2008; Bacci et al., 2009; Indra et al., 2009).
- Por último hay que señalar el cambio en el patrón de los pacientes susceptibles. En la infección por *C. difficile* se considera factor de riesgo la edad avanzada de los pacientes. Aunque este grupo de pacientes sigue siendo el más afectado, junto con el de enfermeras que trabajan a domicilio (Denève et al., 2009), están aumentando los casos entre adultos jóvenes y embarazadas (CDC, 2005) y en niños mayores de 2 años (Gogate et al., 2005; McFarland et al., 2007; Pituch, 2009), así como un aumento en la gravedad de la enfermedad (Pépin et al., 2004).

I.6.2. Resto de animales

En medicina veterinaria, se ha observado que *C. difficile* puede producir patologías diversas en un amplio abanico de hospedadores, la mayoría de ellos mamíferos. En estos casos, además del cuadro de diarrea descrito en humanos, puede

cursar con tiflitis, tiflocolitis o enterotoxemia (Frazier et al., 1993; Shivaprasad, 2003; Songer, 2004). Un pequeño resumen puede verse en la siguiente tabla:

Nombre común animal	Nombre científico animal	Adquisición de la clostridiosis	Sintomatología
Hamsters	<i>Mesocricetus auratus</i>	<ul style="list-style-type: none"> •usado en investigación •más sensible en la adquisición natural de la infección 	Tiflitis
Cobayas	<i>Cavia porcellus</i>	<ul style="list-style-type: none"> •Lesión por CDI espontánea o inducida •Modelo de la enfermedad humana 	CDAD
Ratón	<i>Mus musculus</i>	<ul style="list-style-type: none"> •Lesión por CDI espontánea o inducida •Modelo de la enfermedad humana 	CDAD
Rata	<i>Rattus norvegicus</i> <i>R. rattus</i>	<ul style="list-style-type: none"> •Lesión por CDI espontánea o inducida •Modelo de la enfermedad humana 	CDAD
Conejo	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	<ul style="list-style-type: none"> •Lesión por CDI espontánea o inducida •Modelo de la enfermedad humana 	CDAD

Caballo	<i>Equus caballus</i>	•CDI espontánea	Potros: enterocolitis hemorrágica necrotizante Adultos: diarrea nosocomial y tiflitis; tiflocolitis
Liebre	<i>Lepus sp.</i>	•CDI espontánea	
Cerdo	<i>Sus scrofa</i>	•CDI espontánea	Colitis neonatal necrotizante Muerte cerdas periparto
Macaco	<i>Macaca sp.</i>	•CDI espontánea	
Orangután	<i>Pongo pygmaeus</i>	•CDI espontánea	
Tití cabeza blanca	<i>Saguinus oedipus</i>	•CDI espontánea	
Perro	<i>Canis familiaris</i>	•CDI espontánea	Diarrea crónica
Gato doméstico	<i>Felis catus</i>	•CDI espontánea	
Avestruz	<i>Struthio camellus</i>	•CDI espontánea	Enterotoxemia Hepatitis
Perrito de la pradera	<i>Cynomys ludovicianus</i>	•CDI espontánea	

Tabla II. Animales en los que se ha descrito Infección por *C. difficile* (CDI). Basada en Songer et al., 2000 y, Keel y Songer, 2006.

Cuando comenzó a conocerse este microorganismo, los primeros aislados procedentes de muestras de animales se encontraron de forma casual, sin buscarlo sistemáticamente (McBee, 1960; Stevenson, 1966). Diez años después, en el desarrollo de su tesis doctoral, Hafiz (1974) estudia algunas cepas de *C. difficile* aisladas por él mismo de heces de caballos, burros y camellos. En 1979 (Dabard et al.) lo encuentran en liebres con la flora normal intacta procedentes de dos granjas, en un estudio sobre la capacidad de los clostridios para producir diarrea en estos animales. Tres años después, Princewe y Agba (1982) lo encuentran en ganado vacuno de Nigeria, estudiando los clostridios patógenos en este tipo de ganado. Sin embargo, el autor aún lo cataloga dentro de los clostridios no patógenos. Y un año después, Borriello et al. (1983) lo aíslan de animales de compañía, de muestras procedentes de clínicas veterinarias: 11

perros (52%), 6 gatos (20%), 1 pato (50%) y 1 ganso (50%), dónde la observación más importante es que sólo algunos animales en los que se encontró *C. difficile* estaban en tratamiento antibióticos. Levett (1986) menciona posteriormente haber aislado el microorganismo también de muestras de una serpiente. En dos estudios posteriores sobre animales de clínicas veterinarias, se sitúa la prevalencia de *C. difficile* en perros y gatos en un 39'5% en el primero de ellos (Riley et al., 1991), frente a un 18% en el segundo (Struble et al., 1994).

Los estudios recientes de prevalencia en perros, muestran que el 13-21% de los perros con diarrea y el 2-7% de los perros sin diarrea presentan las toxinas A o B de *C. difficile*, además de mostrar una asociación entre la diarrea canina y la presencia de las toxinas (Weese et al., 2001a; Marks y Kather, 2003), aunque aislando al microorganismo sólo del 7% de los animales diarreicos y de ninguno de los no diarreicos (Weese et al., 2001a). Pero la prevalencia entre los perros que pueden visitar a los pacientes en los hospitales de Ontario (Canadá) es mucho más alta, aislando al microorganismo del 58% de los perros muestreados, siendo el 71% de las cepas encontradas toxigénicas (Lefebvre et al., 2006).

En caballos adultos, *C. difficile* ha sido asociado a diversas patologías como tiflocolitis o enterocolitis, especialmente en relación con el consumo de antibióticos (Perk et al., 1993), aunque también se ha encontrado sin consumo previo de antibióticos (Baverud, 2004). En caballos sanos, adultos y potros, el porcentaje de este microorganismo oscila entre el 0-1% (Weese et al. 2001b; Baverud, 2004). En animales con diarrea, lo podemos aislar en el 12'7% de los casos de adultos y el 33'3% de los casos de potros (Jones, 1989; Weese et al., 2001b).

Una vez aislado en caballos y en cerdos, como veremos en el apartado siguiente, también se quiso estudiar si estaba presente en el ganado vacuno. Rodríguez-Palacios et al., (2006) obtuvieron unos valores de prevalencia del 11'2%, aislados del 25% de las granjas muestreadas. En el estudio realizado encontró que los animales control presentaban *C. difficile* en mayor proporción (14'9%) que los animales con diarrea (7'6%). Además encontraron que había mayor probabilidad de encontrar al microorganismo en individuos jóvenes (Rodríguez-Palacio et al., 2006). En Zimbawe, la prevalencia de *C. difficile* a partir de heces de ganado vacuno fue del 3'4% (Simango,

2006), bastante menor, aunque mayor que la encontrada en Eslovenia del 1'8% (Pirs et al., 2008). Además se ha encontrado en un 5'4% de heces de cabras y en un 4% de conejos, en Zimbawe (Simango, 2006).

En aves, *C. difficile* ha sido aislado de muestras de heces procedentes de granjas de pollos y de avestruces. La prevalencia en pollos de áreas rurales de Zimbawe es del 17'4% (Simango, 2006). También fue aislado de una muestra de pato y de otra de ganso (Borriello et al., 1983). Además ha sido descrito como el agente causal de enteritis en avestruces (Frazier et al., 1993) pudiendo ser la causa de hepatitis también (Shivaprasad, 2003).

Pese a la diversidad en cuanto a hospedadores se refiere, sí existe cierta especificidad entre el microorganismo y el animal infectado. Esta especificidad la encontramos a nivel de la lesión que produce, localizándose en diferentes regiones del intestino según el animal infectado (Keel y Songer, 2006), como se puede ver en la figura 6.

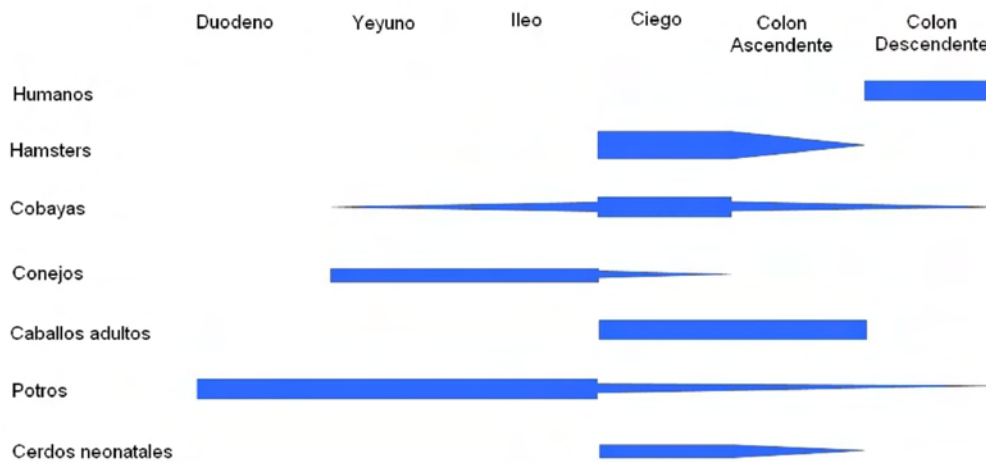


Figura 6. Distribución de la lesiones en el intestino de las diferentes especies animales con CDI espontánea probada. La anchura de la banda indica el grado de la lesión. Modificado de Keel y Songer, 2006.

I.6.3. *C. difficile* en ganado porcino: el caso más estudiado

En 1980 se describió por primera vez una disentería producida por *C. difficile*, en un congreso de medicina veterinaria de cerdos. La infección ocurrió de forma

accidental, durante el estudio experimental de *Brachyspira hyodysenteriae*, en el que los cerdos gnotobióticos que estaban usando se infectaron accidentalmente por *C. difficile* (Songer et al., 2000). Posteriormente, en 1983 se diagnosticó, mediante aislamiento por cultivo, la primera infección natural en cerdos por *C. difficile*, que originó un cuadro de disentería (Jones y Hunter, 1983).

En 1998, Waters et al. (1998) describieron un brote de tiflocolitis en cerdos neonatos causada por *C. difficile*. El diagnóstico lo obtienen porque tras realizar un ensayo de citotoxicidad, no logran indentificar el agente causal del efecto tóxico sobre las células. Para identificarlo prueban con una sección del colon de un individuo por si pudiera tratarse de las toxinas de *C. difficile*. Efectivamente encuentran grandes concentraciones de las toxinas en todas las muestras que analizan posteriormente. El brote comienza afectando a una cabaña de cerdas de cría tres semanas después del parto de una primera camada. Inicialmente, fueron afectados lechones de dos semanas y rápidamente también neonatos. La media de lechones nacidos cada semana era de 25, con una tasa de mortalidad antes del destete de hasta el 58% de las crías. La sintomatología observada en los cerdos incluía disnea, aumento de la prominencia de las costillas y las vértebras, distensión abdominal, edema escrotal, ascitis, edema prominente en el mesocolon ascendente, hidrotorax, precipitación de uratos en las papilas renales. Sin embargo, la diarrea no fue un síntoma constante. Al microscopio, además de considerables micro edemas, se observó exudación de mucus, fibrina, y densos agregados de neutrófilos.

La definición clínica de infección por *C. difficile* en cerdos es la siguiente: animales de 1-7 días de edad, con diarrea poco después del nacimiento. La patología incluye de moderado a grave edema en el mesocolon, a veces acompañado de hidrotorax, ascitis o estrés respiratorio. A nivel histológico se observan pocas lesiones, siendo la más llamativa la infiltración masiva de monocitos y neutrófilos (Songer et al., 2000; Nagy y Bilkei, 2003). Además de la administración de antibióticos, la infección también puede estar condicionada por la pérdida de higiene, el estrés o cambios en la dieta (Nagy y Bilkei, 2003).

La prevalencia de este microorganismo en cerdos es alta, llegando al 51'8% en las granjas de Eslovenia (Pirs et al., 2008). Así mismo, se calcula que la mortalidad en

cerdos neonatos debido a infección por *C. difficile* es del 16%, principalmente a causa del estrés respiratorio (Songer y Anderson, 2006), habiéndose documentado, a partir del año 2000, como la mayor causa de enteritis en cerdos en todo EEUU (Songer, 2004; Songer y Anderson, 2006). Una de las causas por las que se supone que los cerdos son animales más susceptibles a este microorganismo en el hecho de que el receptor principal de la toxina A es el α -galactosil, y las células del epitelio intestinal del cerdo son las que más presentan esta molécula entre los mamíferos (Keel y Songer, 2006).

Recientemente también se le considera el agente causal de la muerte de las cerdas periparturientas, asociado al estrés del parto, a las enfermedades por parto y a la administración de antibióticos (Kiss y Bilkei, 2005)

I.6.4. *C. difficile* en fauna salvaje

Hasta la fecha, y en nuestro conocimiento, sólo hay un artículo en el que se aísla *C. difficile* en fauna salvaje en libertad, mencionado con anterioridad en esta introducción, y realizado en la década de los '60, en un león marino por McBee (1960), dónde lo único que se especifica sobre el aislamiento de este microorganismo y su posterior identificación es que se realiza en anaerobiosis. En el caso del trabajo en el que se encuentra *C. difficile* en langostas del desierto, por Stevenson (1966), éstos artrópodos no eran salvajes sino que procedían de un linaje de animales de laboratorio.

En el resto de trabajos en los que se describe el aislamiento de este microorganismo de animales salvajes, las muestras procedían de zoológicos (Bojesen et al., 2006; Orchard et al., 1983) o centros veterinarios (Borriello et al., 1983), es decir, en ambientes con gran presencia de seres humanos. Además de la mención de la presencia de este microorganismo en una serpiente, posiblemente mascota (Levett, 1986).

Respecto a fauna salvaje en cautividad, el primer caso se describió en un oso Kodiak (oso pardo gigante de Alaska; *Ursus arctos middendorffi*), el cual desarrolló colitis pseudomembranosa después de un tratamiento con kanamicina seguido de otro con tetraciclina (Orchard et al., 1983). En otro caso se describe la muerte de dos elefantes asiáticos (*Elephas maximus*) por una enterocolitis producida por *C. difficile*

(Bojesen et al., 2006). Así mismo, en el marco de la misma investigación, aíslan el microorganismo en un tercer elefante gravemente afectado. Como complemento, estudian muestras fecales de 12 elefantes sanos y 2 rinocerontes de 3 zoológicos de la región, en las que no encuentran *C. difficile*. Los autores también indican que los animales no estuvieron en tratamiento antibiótico pero que tuvieron una dieta con alta cantidad de brócoli, verdura con efectos antimicrobianos (Fahey et al., 1997; Fahey et al., 2002).

En reservas de la biodiversidad como pueden ser parques naturales donde la fauna vive en libertad en un ambiente “casi” libre de interferencia humana, no hay ningún estudio realizado en busca de *Clostridium difficile*. Sin embargo, sí se puede reseñar un estudio realizado en los Parques Nacionales de Kings Canyon, Sequoia y Yosemite, dónde se analizaron heces de caballos y mulas del parque buscando patógenos humanos por aislamiento microbiológico. De todos los aislados que obtuvieron, sólo encontraron 1 clostridio: *Clostridium clostridioforme* (Derlet y Carlson, 2002).

1.6.5. Carácter zoonótico de *C. difficile*

Como se ha indicado anteriormente, *C. difficile* puede infectar tanto al hombre como a otras especies animales, muchas de ellas animales domésticos o de compañía. Por este motivo, muchos autores han propuesto la hipótesis de que este microorganismo pudiera ser zoonótico (Borriello et al., 1983; Songer, 2004; Rodriguez-Palacios et al., 2006; Keel y Songer, 2007b; Rupnik, 2007; Pirs et al., 2008; Jhung et al., 2008; Indra et al., 2009; Songer et al., 2009).

El diccionario de epidemiología veterinaria define zoonosis como aquella enfermedad o infección que se transmite de forma natural entre el hombre y otros animales vertebrados (Toma et al., 1999). En definiciones posteriores se incluyen también aquellas enfermedades comunes para los animales y el hombre, cuyo reservorio puede ser el propio animal o el medio abiótico, entendiendo éste como cualquiera desde el suelo a los cadáveres (Hubalek, 2003).

Para considerar la infección por *C. difficile* como zoonosis se debe, en primer lugar, reconocer que este microorganismo puede infectar tanto al hombre como los animales, hecho sobradamente probado (Rodríguez-Palacio et al., 2007b; Kuijper et al., 2008). Y en segundo lugar, reconocer el mecanismo de transmisión, si lo hubiera, desde los animales al hombre y/o viceversa. Para dilucidar la cuestión, se ha abordado el estudio desde dos perspectivas complementarias: la búsqueda del microorganismo en los alimentos de origen animal y la filogenia molecular.

Varios estudios realizados, dos en Canadá (Rodríguez-Palacios et al., 2007a; Rodríguez-Palacios et al., 2009), uno en Estados Unidos (Songer et al., 2009) y otro en Francia (Bouttier et al., 2010), arrojan datos alarmantes y muy diferentes sobre la proporción de alimentos de origen cárnico, alguno de consumo directo, en los que aíslan *C. difficile*. Rodríguez-Palacio et al. (2007a) aíslan el microorganismo del 20% de las muestras estudiadas la primera vez, pero sólo alcanza una tasa de aislamiento del 6'1% en el segundo muestreo (Rodríguez-Palacios et al., 2009). Los autores achacan esta gran diferencia a una posible estacionalidad en la presencia de *C. difficile*, siendo más prevalente en los meses invernales. En EEUU las muestras positivas alcanzan una proporción que ronda el 50% (Songer et al., 2009). Éstos porcentajes tan elevados contrastan con los valores hallados en muestras de carne en Francia, donde el porcentaje de presencia de *C. difficile* es del 2% del total de muestras estudiadas, coincidiendo en que todas las muestras positivas provenían de carne envasada al vacío (Bouttier et al., 2010).

Por otro lado, estudiando la filogenia molecular, se han encontrado los mismos ribotipos infectando a animales y al hombre. El ejemplo más abundante es el del ribotipo 078 o V, muy frecuente en ganado bovino (94%) y porcino (83%) (Keel et al., 2007a), aislados también en humanos con infección por *C. difficile* (Keel et al., 2007a; Jhung et al., 2008), algunos de ellos adquirida en la comunidad. En el mismo trabajo, Keel et al. (2007a) encuentran otros 8 ribotipos coincidentes de aislados procedentes de muestras humanas con aislados de muestras equinas, bovinas, porcinas o caninas, pero en mucha menor proporción. Arroyo et al. (2005a) también encuentran que el 25% de los ribotipos de *C. difficile* aislados a partir de muestras de humanos son indistinguibles de algunos de los aislados de équidos o perros. Además, hay que señalar que se han aislado en muestras animales (perros y vacas) algunos ribotipos de *C. difficile*

implicados en brotes epidémicos en seres humanos, el 017 y el hipervirulento 027 (Lefebvre et al., 2006; Rodriguez-Palacio et al., 2006), siendo el primero muy común en vacas. La importancia de la cepa con ribotipo 027, además de su mayor toxicidad, es que muchas de las infecciones a humanos fueron en la comunidad (37%) (Rodriguez-Palacio et al., 2006). El aislamiento en los perros es importante debido a que estos visitaban a pacientes hospitalizados, por lo que pudieron adquirir el microorganismo en el hospital (Lefebvre et al., 2006).

La coincidencia de cepas aisladas de diferentes hospedadores también se observa cuando se comparan los genes reguladores de las toxinas *tcdC*, *tcdR* y *cdtR*, mediante secuenciación, encontrando los mismos perfiles en humanos, cerdos y caballos (Bouvet y Popoff, 2008).

El descubrimiento de las mismas cepas en diferentes especies de hospedadores, nos indica que puede existir transmisión entre animales, y de los animales al ser humano, y que ha de ser por una de las vías siguientes (Jhung et al., 2008):

- Transmisión directa por contacto con el animal.
- Transmisión indirecta por contacto con los residuos de los animales (por ejemplo, aguas residuales).
- Transmisión directa por consumo de alimentos cárnicos contaminados.

Sin embargo, aunque la presencia de las mismas cepas en diferentes especies animales, y el hecho de haber aislado el microorganismo en alimentos cárnicos parecen prueba de la transmisión zoonótica de este microorganismo, todos los autores indican la necesidad de hallar pruebas más contundentes. Por ejemplo, Keel afirma que pese a que el ribotipo de las cepas era el mismo, observa ligeras diferencias morfológicas en las cepas aisladas de vacas y cerdos (Keel et al., 2007a).

I.6.6. Medio ambiente

Clostridium difficile es un microorganismo frecuentemente aislado del medio ambiente, principalmente en centros sanitarios y hospitales. Se ha aislado de casi todas las superficies susceptibles de ser tocadas por los paciente: botón de llamada, barandilla de la cama, mesa plegable de la cama, botones para subir-bajar la cama, mesilla,

teléfono, mandos a distancia de la TV, vestidor, armario, picaporte, baño, lavabo, ducha, barandilla del baño, superficie de los asientos de salas comunes, teclado de ordenador, medidor de tensión arterial, bomba intravenosa, oxímetro, carro de medicación, lector óptico del código de barras de los medicamentos,... (Riggs et al., 2007, Dumford et al., 2009, Otter et al., 2009). Aunque parece que ciertos materiales de ciertas superficies, como el cobre, inhiben su presencia (Wheeldon et al., 2008).

También se han encontrado reservorios ambientales fuera del hospital. Por un lado en casas particulares, incluyendo las de las enfermeras. Por otro, se ha aislado de muestras del suelo, aguas e incluso de la superficie de vegetales (Al Saif y Bazier, 1996).

I.7. Diagnóstico

La patología producida por *C. difficile* presenta una gran diversidad en cuanto a sus manifestaciones clínicas, tanto en el ser humano como en el resto de los animales, incluyendo diarrea, colitis sin pseudomembrana, colitis pseudomembranosa, megacolon e ileon tóxico, perforación intestinal, pudiendo llegar a ser mortal. Hay que añadir que no siempre está asociada al consumo de antibiótico, además de que existen otras diarreas ligadas al consumo de antibióticos, ya que el simple consumo de antibióticos puede producir diarrea osmótica si se elimina a todos los microorganismos que hidrolizan los azúcares (Walk y Young, 2008).

Como en todas las patologías, es preciso diferenciar el diagnóstico clínico del diagnóstico en laboratorio. Para el primero, se considera que un paciente padece una infección por *C. difficile*, de carácter nosocomial, si cumple uno de los siguientes supuestos (Kuijper y Tüll, 2006):

- Heces diarreicas o megacolon tóxico, con análisis de laboratorio positivo para tcdA y/o tcdB en heces o aislamiento de un microorganismo toxina positivo.
- Colitis pseudomembranosa.
- Histopatología colónica, característica de infección por *C. difficile*.

Para considerar además que se trata de diarrea asociada a *C. difficile* adquirida en la comunidad, el paciente (CDC, 2005):

- no debe tener ninguna enfermedad seria o crónica subyacente.
- no debe haber pasado ninguna noche en el hospital 3 meses antes del proceso diarreico.

Uno de los problemas de la diarrea asociada a *C. difficile* es la posibilidad de recurrencia, bien con una recidiva causada por la cepa que originó la primera infección o por una reinfección con una cepa diferente del microorganismo. Uno u otro caso sólo se pueden diferenciar tras un estudio de la cepa en el laboratorio (Kuijper y Tüll, 2006).

I.7.1. Métodos de diagnóstico de laboratorio

El diagnóstico en laboratorio de la infección por *C. difficile* puede hacerse buscando al microorganismo o las toxinas que produce.

I.7.1.1. Tipo de muestra, transporte y almacenamiento

La muestra que se utiliza en cualquier diagnóstico son las heces del paciente con sospecha clínica de infección. Para el diagnóstico óptimo, se aconseja el uso de heces líquidas, en pacientes con diarrea, o al menos frescas (Delmée, 2001). Si no pueden ser procesadas en el momento, se almacenarán a 4°C (Delmée, 2001). Algunos autores afirman que tras la congelación no se observa una pérdida de esporos (Freeman y Wilcox, 2003), lo que permite almacenar las muestras más tiempo hasta su procesado.

Cuando se trata de muestras recogidas para detectar las toxinas en ellas, si no van a ser procesadas inmediatamente, deben congelarse. La congelación evita la desnaturalización y, por tanto la pérdida de las toxinas, ya que estas son muy lábiles (Yaeguer et al., 2002).

I.7.1.2. Detección de toxinas

El test considerado como *gold standard* para el diagnóstico de *C. difficile* es el ensayo de citotoxicidad diseñado por Bartlet et al. (1978), con una sensibilidad del 94-

100% y una especificidad del 99% (Nemat et al., 2010). Mediante este ensayo, lo que se identifica es la presencia de las toxinas secretadas por el microorganismo en las muestra de heces. La base de este diagnóstico es la detección de la actividad citotóxica de las toxinas de *C. difficile* que pudiera contener la muestra sobre un cultivo celular, y la neutralización de esta citotoxicidad mediante antitoxinas de *C. difficile* (Bouza et al., 2001). Para su realización las líneas celulares más utilizadas son células vero, Hep2, de fibroblastos, CHO o Hela. Se diluyen las heces en PBS, a un volumen 1:5, y el sobrenadante es filtrado y añadido al medio de cultivo de las células. El efecto se observa a las 24-48h (Delmée, 2001). Si en las heces están presentes las toxinas de *C. difficile*, se observará efecto tóxico en los cultivos celulares, excepto en aquellos que presenten la antitoxina específica.

En la actualidad, en la práctica clínica, se está sustituyendo el test de citotoxicidad por la detección directa de las toxinas en las muestras fecales. Para ello se recurre a kits comerciales basados en la técnica ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) (Bouza et al., 2001; Yaeger et al., 2002; Eastwood et al., 2009; Stamper et al., 2009) que detectan las toxinas A y B de *C. difficile*. Este método tiene muchas ventajas como el ser económico, rápido y sensible (Yaeger et al., 2002). Sin embargo, a partir de las heces no se detecta siempre la presencia de las toxinas ni la toxicidad de éstas. Por ello se recomienda estudiar la toxicidad del aislado a partir del cultivo puro (Bouza et al., 2001), aunque la síntesis de la toxina en cultivo no implica la síntesis de la toxina en el intestino “in vivo” (Chouicha y Marks, 2006).

Actualmente, en el mercado se encuentran muchos test rápidos para la detección de las toxinas de *C. difficile*, algunos de los cuales se citan a continuación (Eastwood et al., 2009):

- ✓ basados en EIA (inmunoabsorción enzimática), para detección de las toxinas A y B:
 - Premier toxin A_B (Meridian)
 - GA *Clostridium difficile* antigen (The Binding Site)
 - Ridascreen *Clostridium difficile* toxin A/B (Biopharm)
 - Toxin A/B II (Techlab)
 - Remel ProSpecT (Oxoid).

✓ basados en inmunoensayos automáticos: Vidas *C. difficile* Tox A/B (Vidas)

✓ basados en ensayos de membrana: Remel Xpect (Oxoid)

Tox A/B Quik Chek (Techlab)

Premier Immunocard Stat (Meridian)

Existen muchos estudios que comparan estos métodos comerciales con la sensibilidad que ofrece el test de citotoxicidad (Altaie et al., 1994; van den Berg et al., 2005; Chouicha y Marks, 2006; Musher et al., 2007, Eastwood et al., 2009). En uno de ellos se ha tratado de comparar la sensibilidad del *gold standard* con un método comercial basado en EIA, para la detección de ambas toxinas de *C. difficile* (sensibilidad del 85-95%). El resultado obtenido muestra que un 10% de los negativos obtenidos son falsos negativos, lo que implica que muchos casos de diarrea causados por *C. difficile* quedan sin diagnosticar apropiadamente (Nemat et al., 2010; Markle y Antaki, 2010).

Además, no pueden utilizarse para el diagnóstico de todos los grupos animales. Por ejemplo, se ha observado que presentan una sensibilidad inferior a la observada en humanos en muestras procedentes de perros (Chouicha y Marks, 2006).

En ocasiones, se utiliza un test bioquímico complementario para determinar la presencia de GDH (glutamato deshidrogenasa), una enzima asociada a la superficie de *C. difficile* (Eastwood et al., 2009). Este test ha demostrado gran poder de discriminación con una sensibilidad del 95%, pero sobre todo con un alto grado de acierto (99%) en muestras negativas (Ticehurst et al., 2006). En este caso también existe un test comercial basado en EIA: *C. diff* Chek-60 (Techlab).

1.7.1.3. Aislamiento microbiano

El aislamiento de *C. difficile* supuso una serie de retos debido a su escasa capacidad de competencia frente a otros organismos de la flora intestinal. El problema ha sido resuelto desde dos vertientes, 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 esporos de este microorganismo.

Siguiendo la primera estrategia, el aislamiento en medios selectivos, George diseñó un medio específico para el aislamiento de *C. difficile*, llamado CCFA por su composición (cicloserina, cefoxitina, fructosa y yema de huevo) (George et al., 1979). Este medio de cultivo se basa en la capacidad de la cicloserina y cefoxitina de inhibir el crecimiento de la flora acompañante. Posteriormente otros microbiólogos implementaron el medio con diversos compuestos, como el taurocolato de sodio para favorecer la germinación de los esporos (Wilson et al., 1982) o clorhidrato de cisteína, norfloxacin y moxalactam, mediante los cuales se reducen las contaminaciones (Aspinall y Hutchinson, 1992). También se probaron otras sustancias como el manitol (intercambiando la cefoxitina del medio CCFA por manitol), obteniendo el efecto contrario al deseado, una menor recuperación de *C. difficile* y un mayor crecimiento de la flora acompañante (Iwen et al., 1989). Los diferentes medios de cultivo han sido adaptados por las diferentes casas comerciales. Un ejemplo es el medio CLO, de BioMérieux, que ha demostrado ser más específico en la recuperación de *C. difficile* que el medio de preparación casera CCFA + taurocolato (Rousseau et al., 2010), aunque con una menor recuperación de esporos.

En los últimos años, para mejorar la recuperación de *C. difficile*, algunos autores han implementado un paso previo al cultivo: incubación previa en un caldo de enriquecimiento. Algunos ejemplos que encontramos en la literatura son los empleados por Arroyo et al. (2005b), quienes utilizan caldo cicloserina, cefoxitina, y fructosa suplementado con taurocolato; Rodríguez-Palacios et al. (2007a), quienes usan el caldo diseñado por Oxoid (CM0601); o Zidaric et al. (2008), quienes utilizan también el caldo de Oxoid, suplementado con D-cicloserina y cefoxitina. En este apartado también se puede citar a Freeman y Wilcox (2003) quienes señalan que mantener las heces en buffer salino podría permitir la supervivencia de *C. difficile* en periodos de tiempo prolongados.

En la segunda estrategia aplicada, encontramos los métodos que eliminan la flora competidora. Éstos se basan en la alta capacidad de supervivencia de la forma de resistencia de este microorganismo. Básicamente los métodos descritos son el shock

térmico (Koransky et al., 1978) y el shock en etanol. Éste último es el utilizado habitualmente, basado en la supervivencia de esporos en el alcohol frente a la inactivación de las formas vegetativas (Aspinall y Hutchinson, 1992) para lo cual la muestra se mezcla con alcohol en proporciones 1:1, durante 30-60 minutos (Johnston et al., 1964).

Respecto a las ventajas de esta técnica en la recuperación de los esporos, las opiniones son variables. Algunos autores afirman que mediante este protocolo aumenta el número de esporos recuperados (Koransky et al., 1978; Clabots et al., 1989), mientras que otros han observado una mayor recuperación tras la siembra en medio selectivo que tras el shock en etanol (Borriello y Honour, 1981). También hay quien apunta que el uso de ambos métodos aumenta la recuperación de *C. difficile* hasta un 96% (Marler et al., 1992). En la práctica clínica se asume que la siembra en medio selectivo es satisfactoria para el diagnóstico (Delmée, 2001).

1.7.1.4. Detección por métodos moleculares

Los métodos basados en la biología molecular están siendo rápidamente desarrollados para identificar este microorganismo. La principal ventaja que esgrimen son su alta especificidad y sensibilidad. 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 codifica las cepas de *C. difficile*. Por ejemplo, para los genes de las toxinas, *tcdA* y *tcdB*, (Kato et al., 1991; Fluit et al., 1991; Lemee et al., 2004) o para genes *housekeeping* específicos del microorganismo como *tpi* (Lemee et al., 2004). La reacción propuesta por Lemee y colaboradores consiste en una PCR múltiple en la que se trata de amplificar tanto el gen *housekeeping* nombrado como los genes de las toxinas. El inconveniente es que se necesita partir de colonias aisladas en un cultivo puro.

La dificultad aparece cuando se quiere realizar la PCR sobre la muestra fecal directamente. Los inconvenientes son debidos a que las heces contienen sustancias inhibitoras de la PCR, en muchos casos desconocidas (Lou et al., 1997; Delmée, 2001). En este sentido, muchos autores han propuesto métodos basados en PCR a tiempo real para el diagnóstico de *C. difficile* a partir de muestras de heces humanas (Gumerlo et al., 2001).

al., 1993; Wolfhagen et al. 1994; Alonso et al., 1999; Guilbault et al., 2002; Bélanger et al., 2003; van den Berg et al., 2005; van den Berg et al., 2007; Sloan et al., 2008). Incluso se ha desarrollado un kit comercial basado en esta técnica para detectar el gen *tcdB*: GeneOhm *C. difficile tcdB* (Becton-Dickinson), con una sensibilidad del 90'9% y una especificidad del 95'2% comparado con el ensayo de citotoxicidad (Stamper et al., 2009).

Además, como comentario señalar, que para otros clostridios patógenos se han descrito PCR para heces de animales como *C. perfringens* (Uzal et al., 1997; Kanakaraj et al., 1998; Gurjar et al., 2008) o *C. botulinum* (Dahlenborg et al., 2001; Myllykoski et al., 2006).

1.7.1.5. Técnicas de tipado

La aparición de brotes epidémicos causados por cepas hipervirulentas de este microorganismo, como el ribotipo 027, hacen necesario distinguir a los aislados más allá del nivel de especie. Actualmente existen diversas técnicas de tipado de las cepas (Killgore et al., 2007; Rupnik et al., 1998):

- basados en el uso de enzimas de restricción en el ADN genómico total:
 - análisis de restricción por endonucleasas (restriction endonuclease analysis: REA)
 - electroforesis en gel en campo pulsado (pulsed-field gel electrophoresis: PFGE)

- basados sólo en productos de PCR:
 - análisis del número de repeticiones en tándem en multilocus variables (multilocus variable number tandem-repeat analysis: MLVA)
 - ribotipado por PCR (polymerase chain reaction-ribotyping: PCR-RT)
 - toxinotipado

- basados en la secuencia de regiones de ADN específicas:
 - tipado de secuencias de múltiples locus (multilocus sequence typing: MLST)

-tipado por la secuencia del gen que codifica para la proteína A de superficie (surface layer protein A gene sequence typing: s/pAST)

-basados en una combinación de enzimas de restricción y PCR:

-polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (amplified fragment length polymorphism: AFLP)

Un método de tipado es útil si es capaz de agrupar a los aislados que parezcan relacionados y excluir a los que no lo estén (Killgore et al., 2008).

II.- Dos ecosistemas complejos

II.1. Doñana

II.1.1. Parque de Doñana

El Parque de Doñana está situado en el sudoeste de la Península Ibérica, en las provincias andaluzas de Huelva y Sevilla. Este espacio Natural, su entorno y su área de influencia cuentan con diferentes grados de protección:

- Parque Nacional de Doñana:

Los Parques Nacionales son espacios naturales de alto valor ecológico y cultural, poco transformados por la explotación o actividad humana que, en razón de la belleza de sus paisajes, la representatividad de sus ecosistemas o la singularidad de su flora, de su fauna, de su geología o de sus formaciones geomorfológicas, poseen unos valores ecológicos, estéticos, culturales, educativos y científicos destacados cuya conservación merece una atención preferente y se declaran de interés general del Estado. La declaración de un espacio como Parque Nacional se hace por Ley de las Cortes Generales.

El Parque Nacional de Doñana fue declarado como tal en 1969, y goza de un régimen jurídico especial establecido por la Ley 91/1978, Ley 8/1999, Ley 5/2007, y diversos Decretos y Reales Decretos. La superficie del Parque Nacional es de 54.251 Ha. Dentro de éste se encuentra la Reserva Biológica de Doñana, la zona más protegida del Parque.

Este espacio es declarado, además, Reserva de la Biosfera por la Unesco en 1980 y sitio RAMSAR (Humedal de importancia Internacional) en 1982. En 1994 es declarado Patrimonio de la Humanidad. Además es LIC (Lugar de Importancia Comunitaria) y ZEPA (Zona de Especial Protección para las Aves), por lo que forma parte de la “Red Natura 2000”.

- Parque Natural de Doñana:

Los Parques Naturales son áreas naturales, poco transformadas por la explotación u ocupación humana que, en razón de la belleza de sus paisajes, la representatividad de sus ecosistemas o la singularidad de su flora, de su fauna o de sus formaciones geomorfológicas, poseen unos valores ecológicos, estéticos, educativos y científicos cuya conservación merece una atención preferente. La declaración de un espacio como Parque Natural se hace por Decreto del Consejo de Gobierno del Gobierno Autónomico en el que se encuentre el Parque.

El Parque Natural de Doñana fue aprobado por la ley 21/1989 de 18 de Julio, denominándosele Parque Natural del Entorno de Doñana, modificándose posteriormente por la Ley 8/1999, del Espacio Natural de Doñana y los Decretos 97/2005 y 24/2007.

La superficie del Parque Natural son 53.835 Ha que rodean al Parque Nacional. Está dividido en cuatro sectores: el Abalario-Asperillo, que forma un rectángulo al oeste de la carretera Rocío-Matalascañas; el Preparque Norte-Pinares de Hinojos, situado justo al norte del Parque Nacional; el Preparque Este-Brazo de la Torre-Entremuros, al este del Parque Nacional entre el Brazo de la Torre y el Guadalquivir y Pinares de Bonanza-Marismas de la Algaida, en la margen izquierda del río Guadalquivir.

-Otras figuras de protección dentro del Parque:

Otras áreas de Ámbito de Doñana, cuentan con especial protección (P.O.R.N.):

- Los Parajes Naturales del Estereo de Domingo Rubio
- El Brazo del Este y las Lagunas de Palos y Las Madres
- El Paisaje Protegido del Corredor Verde del Guadiamar
- Las Reservas Naturales Concertadas de la Cañada de los Pájaros y Dehesa de Abajo, ambas en La Puebla del Río.

II.1.2. Ecosistemas dentro de Doñana

El Parque y su Entorno pueden considerarse un ecosistema de ecosistemas, pues en un área reducida se condensan una gran variedad de biotopos y biocenosis interrelacionados e interconectados: las marismas, la playa, las dunas móviles, los cotos, el bosque mediterráneo que incluye sabinares, alcornoques y pinares, y las veras, que es la denominación que reciben dentro del Parque los ecotonos o zonas de transición entre ecosistemas.

II.1.2.1. Marismas

Las Marismas son ecosistemas acuáticos, cuya característica principal es la presencia de agua de manera estacional. Son depresiones del terreno que por su proximidad al mar, se inundan con agua salada procedente del mar y con agua dulce procedente del Guadalquivir y de aguas subterráneas, creando un ecosistema único. La flora se compone principalmente de herbáceas. En Doñana, se distinguen diferentes Marismas dependiendo de su periodo de encharcamiento, la profundidad de la lámina de agua y el grado de salinidad de ésta, e incluyen a las marismas, lucios, caños y salinas.

Los lucios se definen como lagunas de gran extensión deprimidas, cuyo periodo de encharcamiento es más prolongado. Los caños son los antiguos brazos del Guadalquivir que atravesaban las Marismas, pero que en la actualidad están anegados. Y las salinas son suelos de antiguas marismas transformadas por el depósito de la sal del mar (P.O.R.N.).

Como parte integrante de las marismas, se incluye a las Vetas, terrenos de las marismas más elevados que no se cubren de agua.

II.1.2.2. Playas

Las playas constituyen el límite físico que separa el Parque del océano Atlántico. La longitud es de 37 Km, los que separan Matalascañas de la desembocadura del Guadalquivir. La clave de su importancia ecológica estriba en que la ancha franja de

arena constituye el punto de partida de las dunas móviles características de Doñana. (MMA; Grimalt et al., 1999)

II.1.2.3. Dunas Móviles (y corrales)

El sistema de dunas móviles del Parque Nacional de Doñana se desplaza por acción del viento, aparentemente con una velocidad de 5´6 m/año (García et al., 2007). En su avance, la arena cubre pinares comenzando por rodearlos, derivando en los denominados corrales, cuyos árboles terminarán completamente cubiertos (MMA).

II.1.2.4. El bosque Mediterráneo (y los cotos)

Dentro de los ejemplos de bosque mediterráneo que podemos hallar dentro del Parque, tenemos el bosque maduro típicamente mediterráneo: pinar, sabinar o alcornocal, estos últimos bastante mermados (García et al., 2007; Grimal et al., 1999).

También nos encontramos los cotos, siendo su vegetación predominante los arbustos leñosos típicos de bosque mediterráneo. Los cotos se asientan sobre dunas estabilizadas, que proporcionan al terreno el carácter ondulado. Según la humedad del terreno, se puede diferenciar el monte negro, más húmedo en el que predomina el brezo, y el monte blanco, más seco en el que habitan especies como el tomillo, la lavanda, o el romero (Grimal et al., 1999).

II.1.2.5. Veras (o ecotonos)

Un ecotono es un ecosistema “intermediario”. Se compone de una franja de terreno, en la que habitan vegetación y fauna mixtas de los dos ecosistemas muy diferentes que separa, por lo que se dice que presenta características de ambos ecosistemas. Las veras, concretamente, son las zonas de transición entre las marismas y los cotos, con una anchura de entre 200 y 1500 m. Están constituidas fundamentalmente por pastos abiertos, junto con restos de antiguos bosques, proporcionándole gran diversidad (MMA).

II.1.3. Fauna de Doñana

En conjunto, el Parque Nacional de Doñana alberga 803 especies vegetales y 458 especies de animales vertebrados, que comprenden 7 peces de agua dulce, 30 peces de estuario, 12 anfibios, 19 reptiles, 29 mamíferos y 361 aves (Grimalt et al., 1999). Las especies estudiadas en el presente trabajo, se clasifican dentro de las siguientes tres Clases:

II.1.3.1. Anfibios

Doñana, debido a la gran abundancia de zonas húmedas, constituye un hábitat adecuado para los anfibios. En todo el Parque hay listadas 11 especies: 3 urodelos [tritón ibérico (*Lissotriton boscai*); tritón pigmeo (*Triturus pigmaeus*) y gallipato (*Pleurodeles waltii*)] y 8 anuros [sapo partero ibérico (*Alytes cisternasii*), sapo común, (*Bufo bufo*), sapo corredor (*Bufo calamita*), sapillo pintojo ibérico (*Discoglossus galganoi*), ranita meridional (*Hyla meridionalis*), sapo de espuelas (*Pelobates cultripes*), sapillo moteado meridional (*Pelodytes ibericus*) y rana común (*Rana perezi*)] (<http://www-rbd.ebd.csic.es/Seguimiento/mediobiologico/anfibiosreptiles/anfibios/anfibios.htm>).

II.1.3.2. Aves

En Doñana están representadas el 70% de todas las especies de aves que habitan Europa. Concretamente, en 2009 fueron censadas 106 especies de aves acuáticas por el equipo de seguimiento en el Parque y el entorno de Doñana, a las que hay que sumar el resto de aves como rapaces y paseriformes, hasta llegar a las 361 (Grimalt et al., 1999; <http://www-rbd.ebd.csic.es/Seguimiento/mediobiologico.htm>).

Además, Doñana supone el lugar de supervivencia para algunas especies en peligro de extinción, como el Águila Imperial Ibérica (*Aquila adalberti*), la Cerceta Pardilla (*Marmaronetta angustirostris*), la Cerceta común (*Anas strepera*), la Malvasía Cabeciblanca (*Oxyura leucocephala*) o la Gaviota de Audouin (*Larus audouinii*) (Lanzarot, 2007).

Quizá, en el conjunto de todas las especies de aves que habiten el humedal de Doñana, la más emblemática, después de las garzas, sean los gansos (*Anser anser*), un ave acuática migratoria que llega desde el Norte de Europa (Noruega, Suecia, Finlandia y Dinamarca) para pasar los meses invernales en las marismas (Grimalt et al., 1999).

II.1.3.3. Mamíferos

El número de especies de mamíferos representadas dentro del parque es elevado, aunque quizá la más emblemática sea el lince, aunque existen dos especies cuyas razas son exclusivas del Parque de Doñana.

- Vaca mostrenca o marismeña o bandeña (*B. taurus*) constituye una raza de vacas exclusiva de Doñana, que se caracteriza por sus adaptaciones a la vida en libertad, como son su rusticidad, su gran resistencia y sus coloraciones llamativas. El color de la capa, parece haberse seleccionado por el método de gestión en libertad, pues estos animales no estaban marcados ni herrados, sino que se localizaban por las capas, con lo que los colores más llamativos eran seleccionados (Campos y López, 1998; García et al., 2007).

- Caballo de retuertas (*E. caballus*) Estudios recientes de su ADN mitocondrial han demostrado que es la raza de caballos más antigua de Europa, y que la población se ha mantenido genéticamente separada de otras poblaciones de caballos a lo largo del tiempo (Vega-Pla et al., 2006). Éstos viven en estado salvaje dentro de los límites de la Reserva. Aunque en las inmediaciones encontramos a los caballos de los guardias del Parque y los de propiedad privada que pastan en las marismas (caballos Marismeños) (Campos y López, 1998), las poblaciones se han mantenido separadas como indican los diferentes análisis filogenéticos realizados sobre las poblaciones equinas (Vega-Pla et al., 2006).

II.2. El intestino

II.2.1. Organografía de los intestinos delgado y grueso

II.2.1.1. Tejidos y estructura

La pared del intestino está estructurada en las siguientes capas, en el orden que se refieren a continuación, desde la luz intestinal hacia la parte exterior del órgano:

Luz intestinal	
Mucosa	epitelio cilíndrico absortivo lámina propia (conjuntivo + sistema inmune) muscular de la mucosa (músculo liso)
Submucosa	(tejido conjuntivo denso)
Muscular propia	
Serosa	epitelio plano mesotelio Capa adventicia (conjuntivo)

La superficie de la mucosa aumenta su capacidad de absorción gracias a las vellosidades, a nivel de tejido, y a las microvellosidades, a nivel celular. La histología de una de éstas vellosidades nos revela que la mucosa se sitúa rodeando a un capilar linfático, como se observa en la imagen.

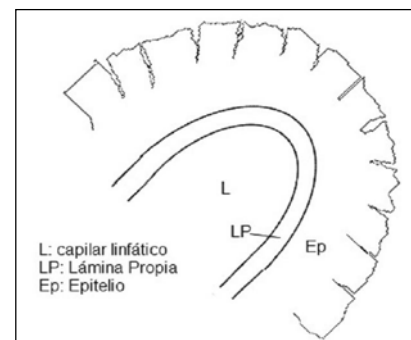


Figura 7. Imagen esquemática de la mucosa intestinal

Como se ha mencionado anteriormente, el sistema inmunitario del intestino se concentra en la lámina propia, en la que podemos encontrar nódulos linfáticos, linfocitos, macrófagos, plasmocitos y eosinófilos. Además podemos encontrar linfocitos en el epitelio absortivo.

II.2.1.2. Principales tipos celulares del epitelio intestinal

Las células que nos podemos encontrar en la mucosa intestinal son:

- Enterocitos
- Células caliciformes
- Células de Paneth
- Células enteroendocrinas
- Células M

La mucosa consiste básicamente en un epitelio cilíndrico simple, sobre la lámina propia, siendo las células predominantes las epiteliales o enterocitos. Éstas son células cilíndricas altas, con núcleo basal y microvellosidades en la zona apical de la membrana plasmática. Cada microvellosidad tiene un centro formado por microfilamentos de actina orientados verticalmente, anclados a la membrana plasmática. Los microfilamentos se extienden hacia el citoplasma apical y se insertan en la estructura conocida como red terminal. Esta red es un retículo de microfilamentos horizontales que forman una capa en el citoplasma más apical y se fija en la densidad intracelular.

Las bombas de transporte, especialmente la ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$, se localizan en la membrana plasmática lateral. Estas bombas transportan sustancias en contra de gradiente de concentración hacia el espacio celular, de forma que disminuye su concentración en el interior celular, permitiendo la difusión libre de esa sustancia desde la luz intestinal hacia el citoplasma del enterocito. En el espacio extracelular, estas sustancias, moviéndose por su gradiente de concentración, llegan hasta la lámina propia y a los capilares que hay bajo ella. Aquellas moléculas con elevado peso molecular penetran en el capilar linfático. Las membranas plasmáticas laterales de las células presentan interdigitaciones, que aumentan la superficie para el intercambio de sustancias con el espacio intercelular y se imbrican con las interdigitaciones de las células adyacentes.

II.2.2. La microbiota normal

II.2.2.1. Condiciones ambientales del intestino

En el tracto intestinal las condiciones ambientales varían de forma vertical, a lo largo de toda la longitud del intestino, y de forma horizontal, ya que encontramos diferentes condiciones en la mucosa intestinal y en la luz (Walk y Young, 2008). De forma general, en el tracto intestinal de los mamíferos, encontramos las siguientes características ambientales (Mackie, 1997):

- Temperatura: constante entre 37°C y 41°C
- Atmósfera: cerca de la mucosa intestinal, la presión parcial de oxígeno es relativamente alta, pero es completamente anaerobia en la luz intestinal. Esto es debido a que los microorganismos anaerobios facultativos consumen el oxígeno generando la atmósfera anaerobia.
- pH: oscila entre 5'5 y 6'9. Los valores disminuyen en el extremo proximal del intestino y aumentan en el extremo distal del intestino.
- osmolaridad: 250-350 mmol/Kg
- nutrientes: al intestino grueso llegan multitud de nutrientes, muchos de ellos ya en sus formas elementales, debido a la digestión previa en el intestino delgado.

II.2.2.2. Microbiota

La flora normal más estudiada es la perteneciente al ser humano. Se calcula que la microbiota humana total presenta alrededor de 10^{14} células bacterianas, estando la mayoría en el intestino, con una media de 10^{12} bacterias por 1g de heces (Hattori y Taylor, 2009), de las cuales se calcula que el 50-80% pertenecen a especies no cultivables (Eckburg et al., 2005; Rajilic-Stojanovic et al., 2007; Walk y Young, 2008) o hasta el 99% (Hugenholtz et al., 1998, Amit-Romach et al., 2004). La composición es muy diferente de un hospedador a otro predominando, en mamíferos, los phyla *Firmicutes* (65'7%) y *Bacteroidetes* (16'3%), junto con 12 phyla más, y con un gran número de OTUs (unidades taxonómicas operativas) dentro de los *Firmicutes*, diferentes para cada especie (Bäckhed et al., 2005; Ley et al., 2008b).

Los microorganismos se disponen a lo largo del tracto intestinal siguiendo un patrón no muy comprendido hasta la fecha, donde en algunas zonas algunos grupos están más representados que en otras. Las variaciones pueden ser tanto en sentido longitudinal como en sentido axial (Walk y Young, 2008). De hecho, se observa una gran diferencia entre los microorganismos del contenido intestinal respecto a los de la mucosa intestinal (Eckburg et al., 2005).

Pese a la gran diversidad de microorganismos, las especiales características del intestino condicionan qué microorganismos pueden vivir en el mismo, ya que éstos han de presentar: un arsenal de enzimas para utilizar los nutrientes disponibles, un complejo molecular para unirse al hábitat correcto, mecanismos genéticos de rápida mutación que les permitan estar bien adaptados, la capacidad de crecer rápidamente para evitar la expulsión y la resistencia al estrés suficiente para saltar de un hospedador a otro (Ley et al., 2006). Además, la evolución del ecosistema intestinal depende de dos fuerzas contrapuestas, la interrelación hospedador-microbiota y la relación de la microbiota. En la primera, se priman las funciones metabólicas que benefician al hospedador, por lo que resulta una comunidad funcionalmente redundante. Las relaciones interespecíficas que se dan entre los microorganismos, se resumen en las relaciones de competencia de cada especie por un nicho metabólico específico (Ley et al., 2006).

Debido a esta gran complejidad, se discute si *C. difficile* es hospedador habitual del tracto intestinal de los animales o no. Algunos autores no consideran que *C. difficile* sea huésped habitual del tracto intestinal de los mamíferos (Keel y Songer, 2006; Chang et al., 2008), no encontrándolo durante el estudio de la flora intestinal de adultos jóvenes sometidos a tratamiento antibiótico (Dethlefsen et al., 2008) mientras que otros afirman que sí lo es (Songer, 1996; Baverud, 2004), pudiendo formar parte de la microbiota normal en el 50% de los individuos sanos (Lizuka et al., 2004). Anecdóticamente, se ha visto que a partir de heces de liebres sanas pueden aislarse *C. difficile*, *C. tertium* y *C. perfringens*, pero nunca de forma simultánea (Dabard et al., 1979).

Desde que nacemos, los animales tenemos una relación simbiótica con los millares de especies bacterias que habitan nuestro tracto intestinal (Walk y Young, 2008). En esta simbiosis, uno de los beneficios más importantes que obtenemos es tener

una línea de defensa extra. La flora normal crea una barrea que dificulta la colonización de la mucosa intestinal por parte de microorganismos no autóctonos. Los mecanismos que la comunidad bacteriana utiliza para ello, aún no se conocen en profundidad, pero parece que podemos mencionar: la síntesis de bacteriocinas, la contribución a la disminución de nutrientes esenciales, la producción de metabolitos finales tóxicos, como ácidos grasos volátiles, la competencia por los sitios de adhesión, la estimulación de la peristalsis, la inducción de respuestas inmunológicas, la liberación de H₂S o ácidos biliares secundarios, la competencia física por el espacio o incluso la inhibición de la síntesis de toxinas. En la actualidad, ya se han comenzado a dilucidar cuales de estos mecanismos podrían ser los que eviten la colonización del intestino por *C. difficile*. Parece ser que la competencia por los nutrientes esenciales es el más importante, principalmente la degradación de mucina por bacterias intestinales (Keel y Songer, 2006). Aunque la competencia de otros microorganismos no es el único factor implicado en la colonización de *C. difficile* como se ha observado en modelos del ecosistema intestinal (Baines et al., 2009), dando peso a la idea de que el desarrollo de esta infección es multifactorial.

El desarrollo de la infección por *C. difficile* podría representar la rotura de la resistencia a la colonización, debido a que el tratamiento antibiótico estándar (metronidazol o vancomicina) suprime a *C. difficile*, lo que permite la recuperación de la microbiota indígena. Esta idea se ve reforzada tras el estudio de la diversidad de la microbiota intestinal normal en individuos que presentan *C. difficile* recurrente. En estos pacientes, se ha observado que la riqueza de *phyla* es reducida, y que *C. difficile* pasa a ser uno de los microorganismos predominantes (Chang et al., 2008).

Objetivos

Objetivos

Clostridium difficile es un microorganismo, como se ha relatado a lo largo de la introducción, muy importante en el ámbito hospitalario y que cada vez parece estar más presente en animales domésticos. Sin embargo, no se conocen en profundidad los factores que determinan que pueda colonizar sólo a algunos individuos incluso dentro de la misma especie, e incluso que no todos los individuos infectados sufran una patología. Ni siquiera se conocen todos los posibles hospedadores de este microorganismo y si pudiera tener algún tipo de reservorio en la fauna salvaje.

La presente tesis se ha planteado desde un punto de vista global, para estudiar diferentes aspectos relacionados con la ecología de *Clostridium difficile* y con la intención de profundizar en el conocimiento del modo de vida de este microorganismo, sobre todo en la búsqueda de su reservorio en el medio natural.

Para llevar a cabo este propósito, el trabajo se ha dividido en dos partes fundamentales: el estudio de *C. difficile* en fauna doméstica y el estudio de *C. difficile* en fauna salvaje. Para abordar estos dos estudios, y darles coherencia, han surgido ramificaciones en su desarrollo: por un lado el desarrollo y puesta a punto de nuevas metodologías de trabajo y de diagnóstico, y por otro el estudio de microorganismos que comparten hábitat y modo de vida con *C. difficile*, así como el estudio del ecosistema intestinal en su conjunto.

El estudio de *C. difficile* en animales domésticos fue planteado como un estudio de la prevalencia de este microorganismo en ganado porcino. Por tal motivo, los objetivos establecidos fueron:

- el estudio de la presencia de *C. difficile* en diferentes explotaciones ganaderas españolas, su prevalencia y la variabilidad entre las cepas.
- y, colateralmente, el desarrollo de un método de detección rápido y específico de *C. difficile* en las muestras de heces.

El estudio de *C. difficile* en fauna salvaje fue diseñado, así mismo, como un estudio de la prevalencia de este microorganismo en animales salvajes. En este caso, los

animales objeto de estudio fueron los de la fauna del Parque Nacional de Doñana. Los objetivos propuestos fueron:

- el estudio de la presencia de *C. difficile* en animales del Parque Nacional de Doñana, su prevalencia y la variabilidad entre las cepas.

Para el desarrollo de este trabajo, fue necesaria una revisión del método de aislamiento de *C. difficile* así como una posterior identificación de microorganismos desconocidos. Por tanto los objetivos se ampliaron:

- mejora del método de aislamiento de *C. difficile*.
- identificación de los microorganismos aislados similares a *C. difficile*, estudio de su prevalencia y papel en el hábitat intestinal.
- caracterización del ecosistema intestinal: estudiando la diversidad microbiana (riqueza y abundancia) y los factores que influyen en la variación de ésta.

En ambas aproximaciones se utilizaron métodos moleculares, lo que hizo necesaria la:

- determinación de un método de extracción de ADN adecuado

Por tanto, los objetivos concretos de esta tesis fueron:

- el desarrollo de un método de recuperación de *C. difficile* a partir de heces de animales salvajes.
- la determinación de un método de extracción adecuado para ADN de procariotas, especialmente *C. difficile*.
- el estudio de la prevalencia de *C. difficile*
 - en animales domésticos
 - en fauna salvaje
- el desarrollo de un método de detección rápido para la identificación de *C. difficile* en las heces de animales.
- la identificación de los microorganismos aislados a partir de heces animales salvajes.

- la caracterización del ecosistema intestinal del ganso salvaje, como ejemplo de ave migratoria, estudiando las diferencias en la diversidad entre el momento de su llegada al Parque y su partida.

Capítulo 1

1.- Desarrollo previo de metodologías

Para alcanzar los objetivos propuestos en esta tesis, fue necesario desarrollar una tecnología específica. Por un lado, era necesario un nuevo método de aislamiento de *Clodtridium difficile* a partir de muestras fecales de animales salvajes.

Por otro lado, debido a la aplicación de técnicas de biología molecular en muchos aspectos del trabajo de investigación, como se verá en los sucesivos capítulos, se hizo necesaria la elección de un método de extracción de ADN adecuado a nuestras posibilidades y a la experimentación planteada.

1.1. Aislamiento de *C. difficile* por rehidratación de las muestras

El método utilizado para la recuperación de *C. difficile* de las heces de los pacientes sospechosos de infección con el microorganismo es el de shock en alcohol, basado en la capacidad de supervivencia de sus esporos en el alcohol frente a la muerte de las formas vegetativas (Aspinall y Hutchinson, 1992), tanto de este microorganismo como de la flora acompañante. Sin embargo, basándonos en el procesado de varias muestras mediante el método clásico de shock en alcohol, y al proceder éstas de animales sanos, contemplamos la posibilidad de realizar una rehidratación para recuperar las formas bacterianas vegetativas.

1.1.1. Material y Métodos

1.1.1.1. Muestras

Se analizaron de forma pareada 10 muestras de heces de animales salvajes procedentes del Parque Nacional de Doñana: 6 de jabalí, 2 de vaca y 2 de caballo.

1.1.1.2. Método de “rehidratación”

Para ello se diseñó un método alternativo que se ha denominado método de rehidratación. Ambos métodos se detallan a continuación:

-Método shock en alcohol (Marler et al., 1992, modificado): Para ello se introdujo el escobillón con la muestra 30 seg. en 500 µl de etanol al 70%. Posteriormente, la mezcla se incubó 30 minutos a T^a ambiente. De la mezcla resultante, se sembraron 75 µl en medio agar para *Clostridium difficile* (CLO) (bioMèrieux, Marcy l’Etoile, France). El medio CLO está compuesto por agar sangre, más dos antibióticos, cicloserina y cefoxitina (George et al., 1979), los cuales le confieren las características de ser selectivo y diferencial para *C. difficile*. Las placas se incubaron de 48 a 72 h, a 37°C, en condiciones de anaerobiosis.

-Método de “rehidratación”: El siguiente método fue desarrollado en nuestro laboratorio. Las muestras recogidas mediante el escobillón estéril fueron introducidas durante 30 segundos en 1 ml de PBS, y la disolución coloidal resultante incubada en reposo 4h a 37°C en atmósfera aerobia. Tras ese periodo de tiempo, la solución fue resuspendida y se sembraron 100 µl en medio CLO (bioMèrieux Marcy l’Etoile, France). Las placas se incubaron de 48 a 72 h, a 37°C, en condiciones de anaerobiosis.

Las 10 muestras se procesaron de forma pareada utilizando ambos procedimientos, primero sumergiendo los escobillones en PBS y luego sometidos al shock en etanol.

1.1.2. Resultados

Los resultados obtenidos tras procesar 10 muestras con ambos procedimientos se muestran en la tabla III y figura 8. Indican que mediante el segundo método el número de bacterias grampositivas anaerobias esporuladas resistentes a cefoxitina y cicloserina (denominadas en el presente trabajo *Clostridium-like*) es mayor. Esto nos llevó a utilizar este procedimiento para el resto de las muestras de animales salvajes, pese a no poder

asegurar la diferencia mediante métodos estadísticos por el bajo número de aislados obtenidos por ambos procedimientos.

animal	n	Aislados shock etanol	Aislados incubación PBS
vaca	2	1 (<i>C. clostridioforme</i>)	4 (<i>C. acetobutylicum</i> ; <i>C. clostridioforme</i>)
caballo	2	0	1 (<i>C. clostridioforme</i>)
jabalí	6	0	1 (<i>Clostridium sp.</i>)

Tabla III. Comparación de los aislados obtenidos utilizando ambos métodos, shock en etanol y rehidratación, expresados en valor absoluto. En la tabla se indica la especie animal de la que proceden las muestras estudiadas, el número de muestras procesadas, y la especie de clostridio aislado en su caso.

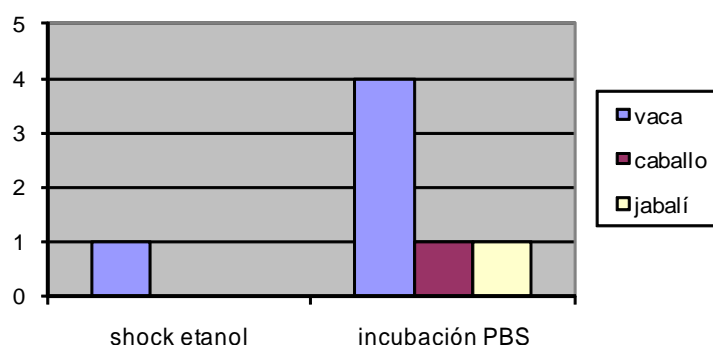


Figura 8. Comparación mediante un gráfico de barras, de los datos absolutos expresados en la tabla III.

1.1.3. Discusión de los resultados

En una primera evaluación de las muestras del Parque de Doñana, se procesaron mediante el método de shock en alcohol sembrando en el medio selectivo (CLO Biomerieux) y en un medio general (Agar sangre). En ninguno de estos dos medios de cultivo crecieron microorganismos. La finalidad de shock en etanol es la eliminación de las formas vegetativas (Aspinall y Hutchinson, 1992), lo que favorecerá la germinación de los esporos. Adicionalmente, se ha mostrado que los medios selectivos permiten una mayor recuperación de *C. difficile* que el shock en etanol, precisamente por la supervivencia de los esporos y de las formas vegetativas (Borriello y Honour, 1981) y que el medio CLO es muy específico a este efecto (Rousseau et al., 2010). Estos dos conceptos indican que el no aislamiento de *C. difficile* en fauna salvaje tras el procesamiento mediante shock con etanol podría deberse a:

✓que no se encuentra este microorganismo entre los habitantes de la flora intestinal de los animales muestreados.

✓que el microorganismo está presente, pero se excreta principalmente en su forma vegetativa.

Para rechazar la segunda posibilidad, se implementó un procesamiento que no eliminara ni los esporos, ni las formas vegetativas. El PBS es un buffer salino que controla los cambios de pH de la muestra, y que ya había sido utilizado para el procesamiento de heces en búsqueda de *C. difficile* (Freeman y Wilcox, 2003). Estos autores determinan que el PBS protege a la muestra y que, además, podría favorecer la germinación de los esporos o, al menos, no los elimina.

El resultado del procesamiento pareado mediante rehidratación en PBS y shock con etanol muestra que mediante la rehidratación se aíslan microorganismos con fenotipo muy similar a *C. difficile*, mientras que con etanol no se aíslan casi microorganismos (tabla III), aunque los pocos que se aíslan también presentan fenotipos muy similares a los del microorganismo objeto de estudio, pero no a este. Tras el tratamiento, en todos los casos se sembró en agar selectivo para *C. difficile* (CLO, Biomèrieux). Este medio se supone selectivo ya que contiene dos antibióticos: cicloserina, que inhibe a *E. coli* y parcialmente a otros bacilos gramnegativos y estreptococos, y cefoxitina, que inhibe a casi todas las bacterias grampositivas y gramnegativas excepto a *C. difficile* y a *Enterococcus faecalis*. Algunos autores afirman que la siembra en este medio es suficiente para el aislamiento de *C. difficile* (Borriello y Honour, 1981; Rouseau et al., 2010).

Por tanto, la rehidratación de la muestra previa a la siembra en medio selectivo, no debería inhibir el crecimiento de *C. difficile* si la muestra se siembra posteriormente en medio selectivo. Además favorece la recuperación de microorganismos fenotípicamente similares.

1.2. Análisis comparativos de dos procedimientos de extracción de ADN para diferentes tipos de muestras

El ADN utilizado para la experimentación llevada a cabo en el presente trabajo tiene diferentes orígenes. Por un lado se ha utilizado ADN extraído de aislados de *C. difficile* procedentes del ganado porcino; por otro lado se ha utilizado ADN de microorganismos aislados de la fauna salvaje de Doñana, tanto de los aislados en el marco de la investigación del capítulo anterior, como aislados no provenientes de medios selectivos. Además, se ha extraído ADN directamente de heces de suidos.

Por tanto, el origen del ADN utilizado puede reducirse a dos: de colonias de microorganismos aislados o de heces de animales presumiblemente infectados o colonizados. La extracción de ambas fuentes presentará características diferentes debido sobre todo a la posibilidad de que sustancias “extrañas” contaminen el ADN extraído. Por ello vamos a comparar dos métodos de extracción de ADN, uno manual y otro automático, para determinar cual de los dos resulta más adecuado para llevar a cabo todo el desarrollo experimental que implica la biología molecular.

1.2.1. Material y Métodos

1.2.1.1. Métodos de extracción del ADN

La extracción del ADN de la muestra se llevó a cabo mediante dos procedimientos, uno manual y otro automatizado. En ambos casos, se utilizaron los mismos cinco aislados diferentes en cultivo puro.

1.- Manual:

Se parte de una colonia aislada del microorganismo en cultivo puro. Ésta se resuspende en un mililitro de agua mili-Q estéril y se incuba 20 minutos a 100°C. Tras atemperarlo, se somete a una centrifugación durante 3 minutos a 10.000 rpm. El ADN habrá quedado en el sobrenadante, por lo que se recogen 200 µl del mismo, y se llevan a un contenedor apropiado.

2.- Semi-automática:

Utilizamos la máquina de extracción de ADN QuickGene-810 (Fujifilm) y el kit QuickGene DNA tissue kit S (DT-S; Fujifilm), dónde encontramos todos los reactivos utilizados en el procedimiento. Se toma una colonia del cultivo puro bacteriano y se resuspende en 500 μ l de agua mili-Q estéril. La muestra se mezcla en un eppendorf de 1'5 ml, con 180 μ l del Buffer de lisis y 20 μ l de proteinasa K, y se incuba durante 4h a 55°C.

Tras la incubación, la mezcla se centrifuga durante 3 minutos a 10000 rpm. Todo el sobrenadante se transfiere a un nuevo tubo eppendorf de 1'5 ml y se le añaden 180 μ l de buffer LDT. Se incuba de nuevo, esta vez a 70°C durante 10 minutos, y se le añade 240 μ l de etanol absoluto (Panreac).

La mezcla se transfiere a los cartuchos de extracción del kit y, seleccionando el programa *DNA tissue mode* y el volumen de elución final a 50 μ l, se pondrá en funcionamiento la máquina siguiendo las instrucciones del fabricante (QuickGene-810; Fujifilm).

1.2.1.2. Comparación de las purzas obtenidas con ambos métodos

Para comparar las dos metodologías utilizadas en la extracción, se extrajo mediante ambos procedimientos y de forma simultánea el ADN de los mismos cultivos puros de microorganismos aislados de muestras de ganso. A continuación se calculó la concentración de los extractos obtenidos mediante espectrofotometría, previa dilución del ADN obtenido en agua mili-Q estéril, a 1/4, para los extractos obtenidos manualmente y a 2/35 (~1/16), para los obtenidos mediante el método semiautomático. A continuación se midió la absorbancia de las diluciones a dos longitudes de onda: 260 nm y 280 nm (Ultraspec 3000; Pharmacia Biotech), en cubetas de cuarzo de 10mm de paso óptico, realizando dos medidas de cada dilución.

El valor de absorbancia a 260 nm nos permite conocer la concentración del ADN de la muestra sabiendo que en una cubeta de 10 mm de paso óptico, 1 Unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 50 μ g/ml de ADN de cadena doble o a 100 μ g/ml de ADN de cadena sencilla. Por tanto:

$$[\text{ADN}] = (\text{DO}_{260}) (\text{F.D.}) (50 \mu\text{g/ml}) \quad \text{siendo F.D. el factor de dilución.}$$

Además, la medida de la absorbancia nos permite conocer la pureza del ADN de la muestra calculando el ratio $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$. Si es igual a 1'80, el ADN es de una gran pureza. Si el valor es menor de 1'60, entonces la muestra presenta un alto contenido de proteínas. Si el ratio es mayor de 2, significa que hay ARN en la muestra.

Las concentraciones finales obtenidas en las diferentes mediciones para cada método, fueron comparadas estadísticamente mediante el análisis del valor de curtosis estandarizado, de asimetría estandarizada, el test de la t de student para comparar medias, y del test de la F de Fisher para comparar varianzas. Todo ello se hizo mediante el programa estadístico Statgraphics Plus 5.0.

1.2.2. Resultados

Las concentraciones de ADN de las muestras estudiadas al efecto, se muestran en la tabla siguiente.

muestra	extracción	260 nm	280 nm	ratio		[ADN] ($\mu\text{g/ml}$)	dilución	[ADN] extraído ($\mu\text{g/ml}$)
DOAN4/5	manual	0'016	0'012	1'35	proteínas	0'8	1/4	3'2
DOAN8/2	manual	0'0165	0'009	1'8	ADN	0'825	1/4	3'3
DOAN3/2	manual	0'0475	0'0335	1'45	proteínas	2'375	1/4	9'5
DOAN6/4 A	manual	0'0385	0'029	1'375	proteínas	1'925	1/4	7'7
DOAN6/4 B	manual	0'0245	0'02	1'225	proteínas	1'225	1/4	4'9
DOAN4/5	automático	0	0			0	2/31	-
DOAN8/2	automático	0	0			0	2/31	-
DOAN3/2	automático	0'0105	0'0055	1'909	ADN*	0'525	2/31	8'137
DOAN6/4 A	automático	0'0205	0'0085	2'412	ARN	1'025	2/31	15'737
DOAN6/4 B	automático	0'002	0'002	1	proteínas	0'1	2/31	1'55

Tabla IV. Tabla con las medias obtenidas en las mediciones para cada cepa y método. La siguiente tabla indica la cepa de la cual se ha obtenido el ADN, el método de extracción por el cual se ha obtenido, los valores de absorbancia obtenidos a 260 y a 280 nm, el ratio y la pureza de ADN que indica (proteínas= alta contaminación por proteínas; ADN= ADN extraído con gran pureza; ADN*= ADN extraído con alto grado de pureza, pero su valor está próximo a 2 por lo que podría contener ácido ribonucleico; ARN= muestra con ácido ribonucleico), la concentración en la dilución medida, la dilución medida y la concentración de ADN que se extrajo de la muestra de partida.

Para evaluar si existen diferencias entre los valores obtenidos por los dos métodos, se han comparado las concentraciones finales obtenidas para cada aislado y en cada una de las mediciones a las que fueron sometidos, obteniendo los siguientes resultados medios:

	manual	automatizada
Count	10	10
Average	5,72	7,731
Variance	8,75733	45,8992
Standard deviation	2,95928	6,7749
Minimum	3,0	0,0
Maximum	10,6	18,3
Range	7,6	18,3
Skewness	0,852394	0,410147
Std. skewness	1,10044	0,529497
Kurtosis	-0,971562	-1,19212
Std. kurtosis	-0,627141	-0,769513

Tabla V. Valores estadísticos comunes para cada tipo de extracción. (Count: número de muestras; Average: media; Variance: varianza; Standard deviation: desviación estándar; Minimum: mínimo; Maximum: máximo; Range: rango; Skewness: asimetría; Std. skewness: asimetría estandarizada, Kurtosis: Curtosis; Std. kurtosis: curtosis estandarizada). Obtenido con Statgraphics.

Al observar que los valores obtenidos de asimetría estándar y de curtosis estándar están dentro del rango 2- (-2), asumimos que los datos obtenidos están dentro de una distribución normal, por lo que calculamos si hay diferencia en el valor de la media de la concentración de ADN obtenido por ambos métodos, y en la desviación estándar.

El test de la t-student para calcular diferencias en la media, donde la hipótesis nula es que las dos medias son iguales, resulta que $t = -0,86$, con un $p\text{-valor} = 0,401$. Como el $p\text{-valor}$ es mayor de $0,05$, no podemos rechazar la hipótesis nula, lo que indica que las concentraciones de ADN obtenidas por ambos métodos son similares. Este resultado hay que tomarlo con cautela porque para el cálculo de este parámetro estadístico se asume que las varianzas son iguales, y como veremos a continuación, esto no se puede afirmar.

La comparación de las desviaciones estándares la realizamos mediante el test estadístico de Fisher para comparar varianzas. La hipótesis nula de partida es que ambas varianzas son iguales. El resultado, $F=0,19$ con $p\text{-valor} = 0,021$, indica que podemos

rechazar la hipótesis nula de que las varianzas sean iguales. En concreto, la varianza de los valores de concentración de ADN por la metodología automatizada es mayor que la de los valores obtenidos mediante la metodología manual. Esto indica que el método de extracción automatizada tiene mayores variaciones en cuanto a la concentraciones de ADN que se obtienen.

1.2.3. Discusión de los resultados

La extracción del ADN de una forma correcta y libre de contaminaciones que puedan desvirtuar el resultado de las pruebas posteriores es uno de los pasos más importantes en el trabajo

Al comparar las concentraciones obtenidas gracias a ambos métodos, se observa que las medias obtenidas son significativamente muy parecidas, por lo que no podemos afirmar que la concentración de ADN extraída con uno u otro método sea mayor o menor. Sin embargo, al ser la desviación típica significativamente mayor en el caso del ADN extraído mediante el procedimiento semi-automatizado, sí que podemos deducir que la diferencias entre las concentraciones obtenidas mediante esa metodología son mayores. Por otro lado, observando las purezas del ADN extraído (tabla V) vemos que en el caso del ADN extraído por metodología manual suele contener una alta concentración de proteínas mientras que en el caso del obtenido de forma automática puede presentar contaminación tanto por presencia excesiva de proteínas como de ácido ribonucleico. Quizá el bajo número de muestras nos impide saber a ciencia cierta en cual de los dos métodos se producen mayores contaminaciones, aunque la mayor presencia de proteínas en el método manual es fácilmente explicable por una más baja especificidad del método.

Adicionalmente hay que valorar el tiempo y la complejidad de procesado. Como puede observarse en la descripción de la metodología, el tiempo del procesado semi-automático es mayor, necesitándose al menos 4h para que actúe la proteinasa, mientras que en ese tiempo ya se ha podido finalizar la extracción mediante la metodología manual.

Con respecto a la complejidad, es más sencillo el método manual. Sin embargo, la complejidad del método semi-automatizado, basado en el uso de reactivos y filtración a presión a través de una membrana porosa de naturaleza hidrofílica, inmoviliza a los ácidos nucleicos, tras sucesivos lavados. Este procesado, junto con los reactivos del kit empleado, desarrollado para extraer ADN de cualquier tejido, asegura la eliminación de cualquier sustancia que pudiera inhibir la PCR, como las que contienen las heces (Lou et al., 1997).

Por tanto, debido a que prácticamente ambos métodos ofrecen el mismo resultado si se parte de cultivo puro, y el manual es más rápido, más sencillo y menos costoso, se optó por éste para la extracción del ADN, siempre que la muestra de partida fuesen colonias aisladas. En cambio, debido a que la materia fecal contiene muchas sustancias que pueden inhibir la PCR (Capítulo 4) (Lou et al., 1997), se optó por la extracción semi-automatizada para asegurar la eliminación de estos inhibidores.

Capítulo 2

2.- *Clostridium difficile* en animales domésticos

Como ya se ha referido en el punto I.6., se ha descrito la presencia de *C. difficile* en una alta proporción en ciertos animales domésticos, considerándosele agente causal de patologías en ellos. Un ejemplo es la importancia que representa este microorganismo en el desarrollo de la diarrea neonatal porcina, con una alta prevalencia en EEUU o Canadá.

Sin embargo, pese a la importancia de la ganadería porcina en España, hasta la realización del presente trabajo, no se había estudiado su presencia en nuestro país, ni su papel en patologías porcinas como la diarrea neonatal. De hecho, no se había descrito con anterioridad en animales en España. Para llevar a cabo el mencionado estudio, se tomaron muestras de ganado porcino procedentes de Cataluña, Aragón y Castilla La-Mancha, tres comunidades autónomas que, según los datos del Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino de España (<http://www.mapa.es/es/estadistica/pags/anuario/2008/indice.asp?parte=1&capitulo=4&grupo=5>), suman el 62'93% de las cabezas de ganado porcino de todo el país (aproximadamente 11 millones y medio de animales).

2.1. Material y métodos

2.1.1. Muestreo

2.1.1.1. Lugares de muestreo

Las muestras se tomaron de 13 granjas localizadas en 3 de las comunidades Autónomas españolas con mayor densidad de ganado porcino mencionadas anteriormente: Aragón (Zaragoza: 3 granjas), Cataluña (Barcelona y Girona: 3 granjas) y Castilla La-Mancha (Toledo: 4 granjas), todas ellas con problemas de diarreas neonatales. La región de Aragón se denominó zona A, Cataluña zona B y Castilla-La Mancha zona C. Las muestras fueron recogidas durante los meses de noviembre y diciembre de

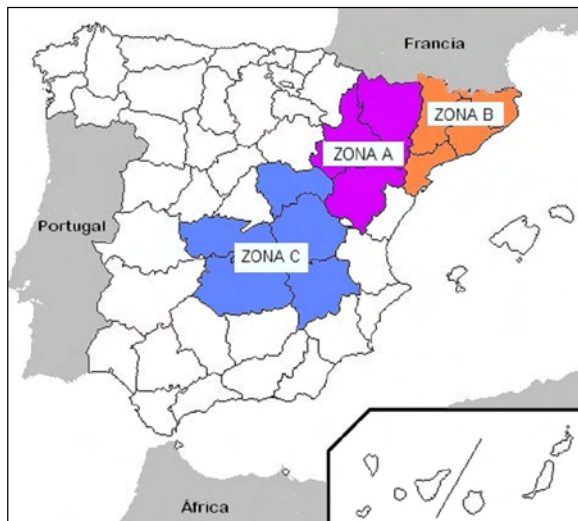


Figura 9. Mapa en el que se muestra la localización geográfica de las tres zonas muestreadas. zona A: Aragón, zona B: Cataluña, zona C: Castilla La-Mancha

2006. Además se tomaron muestras de otras 3 granjas, en marzo de 2007, sin problemas de diarrea, ubicadas las tres en la provincia de Girona (Cataluña). Éstas tres últimas fueron utilizadas como granjas control.

2.1.1.2. Animales objeto de muestreo

En total se analizaron 780 muestras fecales de animales. Estas muestras se tomaron de cerdos con diarrea y sin diarrea, en los que se puede diferenciar dos rangos de edad: 1-7 días y 1-2 meses. El número de individuos muestreados en cada caso se indica en la siguiente tabla:

	animales sin diarrea	animales con diarrea	total
1-7 días	287	254	541
1-2 meses	187	52	239
total	474	306	780

Tabla VI. Número total de animales muestreados. Las columnas diferencian según sintomatología y las filas diferencias por edad.

Las muestras de heces se recogieron directamente del animal, introduciendo el escobillón estéril en el recto del cerdo. Las muestras se transportaron al laboratorio sin medio de transporte ni de conservación, y se almacenaron a -20°C hasta su procesamiento.

2.1.2. Aislamiento de *C. difficile*

El aislamiento de *C. difficile* se llevó a cabo mediante el método selectivo de shock en alcohol (Marler et al., 1992, modificado) y siembra en medio selectivo y diferencial (CLO, Biomerieux). Para ello se introdujo el escobillón con la muestra 30 seg. en 500 µl de etanol al 70%, agitándolo ligeramente. Tras retirar el escobillón, la mezcla resultante de heces y etanol se incubó 30 minutos a T^a ambiente. De ésta se sembraron 75 µl en medio agar para *Clostridium difficile* (CLO) (bioMèrieux, Marcy l'Etoile, France). El medio CLO está compuesto por agar sangre, más dos antibióticos, cicloserina y cefoxitina (George et al., 1979), los cuales le confieren las características de ser selectivo y diferencial para *C. difficile*.

Posteriormente, las placas sembradas se incubaron durante 48-72h, a 37°C, en anaerobiosis. La generación de la atmósfera de anaerobiosis se llevó a cabo mediante jarras de anaerobiosis GENbox (bioMèrieux) y sobres generadores de anaerobiosis GENbox (bioMèrieux).

2.1.3. Identificación bioquímica

Las colonias sospechosas de ser *C. difficile*, en base a sus caracteres macroscópicos, descritos en el punto I.2 de la introducción, fueron identificadas mediante microscopía y tira API (rapidID 32A, bioMèrieux) para anaerobios, siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, a partir de cultivo puro y joven (24h) en agar sangre, se toman colonias que se resuspenden en el medio de suspensión hasta alcanzar una turbidez igual al patrón 4 de la escala de MacFarland. Posteriormente, se inocularon 55 µl de esta solución en cada uno de los pocillos de la tira. Este tipo de prueba bioquímica rápida se caracteriza por determinar presencia/ausencia de enzima, en base al resultado positivo o negativo sobre el sustrato específico que contiene cada pocillo de la galería.

Los resultados obtenidos fueron introducidos en la página web que el fabricante tiene al efecto: www.apiweb.biomerieux.com (apiweb™ version: 1.2.1. Copyright 2003 bioMérieux SA), donde está almacenada la base de datos y los porcentajes en los que cada prueba concreta resulta positiva, para cada especie. El resultado viene expresado mediante dos valores, el porcentaje de identidad (%id) y el índice T. El porcentaje de identidad indica la proximidad del microorganismo estudiado al taxón al cual parece pertenecer. El índice T muestra la proximidad del perfil bioquímico estudiado al perfil bioquímico “típico” del taxón en cuestión.

Para la interpretación de los resultados propuestos, hay que tener en cuenta tanto el porcentaje de identificación como el índice T. Así, para determinar la fiabilidad de la identificación, el fabricante (<https://apiweb.biomerieux.com>) propone unos valores umbral:

EXCELENTE IDENTIFICACION	%id >= 99.9	T >= 0.75
MUY BUENA IDENTIFICACION	%id >= 99.0	T >= 0.50
BUENA IDENTIFICACION	%id >= 90.0	T >= 0.25
IDENTIFICACION ACEPTABLE	%id >= 80.0	T >= 0
IDENTIFICACIÓN A NIVEL DE GÉNERO	varios taxones del mismo género	
BAJA DISCRIMINACIÓN	varios taxones de diferentes géneros	
IDENTIFICACIÓN "NO FIABLE"	%id<80.0	
PERFIL "DUDOSO"	algún test en contra (perfiles atípicos)	
PERFIL "INACEPTABLE"	si se aleja de todos los taxones de la base de datos	

Tabla VII. Valores umbral para la identificación de microorganismos mediante tiras API. (BioMérieux)

Según los valores de id e índice T, se identificaron los aislados obtenidos. Así diferenciamos entre:

- los identificados a nivel de especie como pertenecientes a esa especie
- los identificados a nivel de género como pertenecientes a ese género
- los identificados como “dudoso”
- los identificados como “no fiable”
- los identificados con baja discriminación como probables sin confirmación
- los que presentaban perfil inaceptable como desconocidos



Figura 10. Tira API rapidID32A. Muestra el color de las pruebas bioquímicas cuando son positivas. Imagen obtenida de apiweb.

2.1.4. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó calculando el porcentaje de aislados obtenidos respecto al total de muestras analizadas para animales con diarrea y sin diarrea para estudiar así la prevalencia del microorganismo. Además, los resultados obtenidos se representaron en un diagrama de barras. Así mismo, se estudiaron las posibles diferencias en el número de aislados obtenidos mediante el test de la χ^2 , utilizando la corrección de Yates en los casos necesarios. Para la realización de este test se parte de la hipótesis nula, en todos los casos, de que no existe relación entre las variables estudiadas. Los cálculos se han realizado utilizando el programa estadístico Statgraphics Plus 5.0.

2.1.5. Determinación de la presencia de los genes que codifican para las toxinas en los aislados.

2.1.5.1. Extracción de ADN

El ADN utilizado se extrajo mediante metodología manual (descrita en el capítulo 1), procedente de los siguientes microorganismos:

- 140 cepas de *C. difficile*, aisladas de heces de cerdo, para confirmar que se trata de este microorganismo y caracterizarlo toxigénicamente.

- Controles positivo: Se utilizaron indistintamente dos cepas diferentes de *C. difficile*, las cepas NT77577 y NT135600, cedidas por el H.G.U. Gregorio Marañón. Ambas cepas son productoras de toxinas A y B.
- Controles negativos: Se utilizaron dos tipos de controles negativos para asegurar que no se produjeran amplificaciones inespecíficas. Para ellos se utilizaron, por un lado la cepa PS22/2 de *Clostridium sp.*, que no era *C. difficile* (aislada en el presente trabajo e identificada por tira API) y por otro agua destilada en sustitución al ADN del microorganismo.

2.1.5.2. *Toxinotipado*

El toxinotipado (Rupnik et al., 1998) realizado sobre las cepas se limitó a la amplificación de los genes que codifican para las toxinas A y B del microorganismo. La reacción de PCR llevada a cabo fue de tipo simple, mediante la amplificación de cada uno de los dos genes que codifican para cada una de las dos toxinas, *tcdA* y *tcdB*, individualmente. Las dos se ejecutaron en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, USA):

Gen *tcdA*:

- Primers (Isogen Life Science, Maarssen, Netherlands) (Kato et al., 1991):

NK2 R (5'CCCAATAGAAGATTCAATATTAAGCTT3')

NK3 F (5'GGAAGAAAAGAACTTCTGGCTCACTCAGGT3')

- El producto de amplificación que se espera es de un tamaño de 252 pb.

- Mezcla de Reacción, para un volumen final de 30 µl:

- glicerol 10% (v/v)
- dNTP 200 µM de cada desoxinucleótido (dNTP)
- NK2 5'5 pmol
- NK3 5 pmol
- AmpliTaq Gold DNA Polimerasa (Applied Biosystems, Madrid, Spain) 0'75 U
- MgCl₂ 2'5 mM
- Buffer: Tris-HCl 10 mM (pH= 8'3)
KCl 50 mM

Se añaden 3 µl de ADN problema.

- Reacción de Amplificación:
 - desnaturalización 5 min 98°C
 - amplificación 35 ciclos 15 seg a 95°C
 - 20 seg a 50°C
 - 40 seg a 72°C

Gen tcdB:

- Primers (Isogen Life Science, Maarssen, Netherlands) (Fluit et al., 1991):

A: 5´TAATAGAAAACAGTTAGAAA3´

B: 5´TCCAATCCAAACAAAATGTA3´

- El producto de amplificación que se espera es de un tamaño de 301 pb.

- Mezcla de Reacción, para un volumen final de 50 µl:

- glicerol 10% (v/v)
- dNTP 100 µM de cada desoxinucleótido (dNTP)
- primer F 50 pmol
- primer R 50 pmol
- AmpliTaq Gold DNA Polimerasa (Applied Biosystems, Madrid, Spain) 2´5 U
- MgCl₂ 1´5 mM
- Buffer: Tris-HCl 10 mM (pH= 8´3)
- KCl 50 mM

A la que se añaden 2 µl del ADN problema.

- Reacción de Amplificación:
 - desnaturalización 5 min 94°C
 - amplificación 40 ciclos 1 min a 94°C
 - 1 min a 50°C
 - 1 min a 72°C

En todas las reacciones se incluyeron controles positivos (*C. difficile* A+B+) y negativos (agua destilada).

Los productos de amplificación se observaron tras someterlos a una electroforesis a 95V en un gel de agarosa al 1´6%. Los fragmentos de amplificación se tiñeron con bromuro de etidio (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain), y se observaron bajo luz UV. El tamaño de cada fragmento se determinó comparando con el patrón de tamaño de fragmentos génicos (*lader*) cargado en cada uno de los geles.

2.2. Resultados

2.2.1. Resultados bioquímicos

Los perfiles bioquímicos obtenidos muestran que los aislados encontrados son *C. difficile*, con 16 perfiles bioquímicos diferentes. Todos ellos coinciden en ser positivos para Prolina Arilamidasa, la única prueba bioquímica para la que el microorganismo es positivo en el 95% de los casos (BioMerieux). En la interpretación matemática de los positivos obtenidos en la galería, 4 de estos 16 perfiles indican que el microorganismo en cuestión es *C. glycolicum*, siendo *C. difficile* la segunda opción más probable.

2.2.2. Análisis estadístico

El número de aislados obtenidos se resume en la tabla siguiente, procedentes todos de los cerdos de 1-7 días de edad. De los animales de más edad no se aisló ningún *C. difficile*.

zonas	granjas	animales sin diarrea		animales con diarrea		n total	positivos (%)
		n	<i>C. difficile</i> positivos (%)	n	<i>C. difficile</i> positivos (%)		
zona A	A1	27	5 (18'5%)	27	7 (25'9%)	54	12 (22'2%)
	A2	26	8 (39'85)	27	7 (25'9%)	53	15 (28'2%)
	A3	27	7(25'9%)	27	8 (29'6%)	54	15 (27'8%)
Total A		80	20 (25%)	81	22 (27'2%)	161	42 (26'1%)
zona B	B1	25	11 (44%)	25	3 (12%)	50	14 (28%)
	B2	27	15 (55'5%)	27	10 (37%)	54	25 (46'3%)
	B3	25	16 (64%)	21	10 (47'6%)	46	26 (56'5%)
Total B		77	42 (54'5%)	73	23 (31'5%)	150	65 (43'3%)
zona C	C1	25	2 (8%)	25	3 (12%)	50	5 (10%)
	C2	25	4 (16%)	25	0 (0%)	50	4 (8%)
	C3	25	7 (28%)	25	7 (28%)	50	14 (28%)
	C4	25	1 (4%)	25	3 (12%)	50	4 (8%)
Total C		100	14 (14%)	100	13 (13%)	200	27 (13'5%)
granjas control	control I	10	3 (30%)	-	-	10	3 (30%)
	control II	10	2 (29%)	-	-	10	2 (29%)
	control III	10	1 (10%)	-	-	10	1 (10%)
Total control		30	6 (20%)	-	-	30	6 (20%)
TOTAL		287	82 (28'6%)	254	58 (22'8%)	541	140(25'9%)

Tabla VIII. Número de muestras en las cuales se aisló *C. difficile*, respecto del total. Para ello se muestra el valor para cada granja estudiada, y el total para cada área geográfica, así como para los controles. (n: número de muestras analizadas)

El conjunto de los aislados obtenidos de las granjas de las zonas A, B y C (columna denominada: positivos, exceptuando los controles) se representó en un gráfico de cajas y barras para estudiar la dispersión de los mismos. Los valores pueden encuadrarse dentro de una distribución normal.

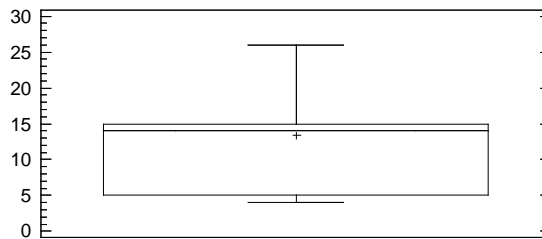


Figura 11. Gráfico de cajas. En este gráfico se representan los valores más frecuentes observados para el conjunto de muestras recogidas. Mediante este tipo de gráfico se representan las frecuencias observadas, tomando los valores individuales de cada granja y calculando la media, mediana, y cuartiles. La caja comprende los valores que se incluyen al 50% de las frecuencias. La cruz señala la media. La línea horizontal que cruza la caja, indica el valor de la mediana. Los bigotes indican cuales son los valores mínimo y máximo encontrados.

2.2.3. Análisis comparativo entre granjas

Las diferencias en el número de aislamientos pueden observarse en el gráfico siguiente.

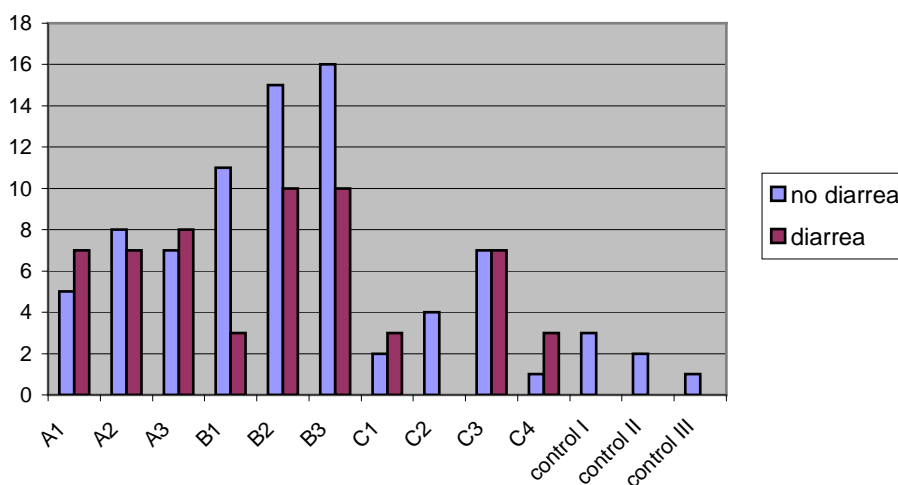


Figura 12. Gráfico de barras en el que se comparan en valores absolutos los datos obtenidos en animales con síntomas de diarrea y sin síntomas de diarrea, en cada granja (A1, A2, A3, B1, B2, B3, C1, C2, C3, C4 y las granjas control).

2.2.3.1. Relación entre *C. difficile* y la Comunidad Autónoma

Al comparar el número de aislados de *C. difficile* totales en las tres áreas geográficas estudiadas, partiendo de la hipótesis nula de que no existe relación entre las variables, se obtiene que:

$$\chi^2 = 39'43, \text{ con 2 grados de libertad, y un p-valor} = 0,$$

por lo que se puede rechazar la hipótesis nula al 99% de confianza. Este resultado indica que existe algún tipo de relación entre el área geográfica muestreada y el número de *C. difficile* aislados en ésta.

Observando los datos, podemos afirmar que el número de aislados de *C. difficile* en la zona B es significativamente mayor, mientras que en la zona C es significativamente menor. Para confirmar este punto, se han comparado el número de aislados para cada dos zonas, A versus B, B vs. C, A vs. C:

	χ^2	p-valor
zona A vs. zona B	9'48	0'0021
zona B vs. zona C	8'34	0'0039
zona A vs. zona C	37'85	0

Tabla IX. Resultados obtenidos en la comparación estadística. χ^2 : chi-cuadrado. p-valor: la probabilidad de que los datos comparados sean lo mismo.

En los tres casos podemos decir, al 99% de confianza, que existe una diferencia significativa entre el número de *C. difficile* aislados y la zona de la que proceden. De este modo, podemos ordenar las áreas según la prevalencia, de mayor a menor valor, como Cataluña, Aragón y por último Castilla La-Mancha.

A continuación se compararon los resultados diferenciando entre los aislados obtenidos de animales con diarrea y de animales sin diarrea para el conjunto de las tres zonas, para examinar si se mantienen las diferencias.

Para los animales con diarrea, el análisis comparativo de los resultados en las tres zonas, arrojó los siguientes resultados:

$$\chi^2 = 9.47, \text{ con 2 grados de libertad, y un p-valor} = 0.0088,$$

por lo que se puede rechazar al 99% de confianza la hipótesis nula. Por lo tanto, existen diferencias significativas entre el número de *C. difficile* aislados de los animales con diarrea en las tres áreas geográficas muestreadas.

Como en el caso anterior, para ver entre que áreas concretas existen estas diferencias, se compararon los datos dos a dos:

	χ^2	p-valor
zona A vs. zona B	0.17	0.68
zona B vs. zona C	4.88	0.02
zona A vs. zona C	7.68	0.0056

Tabla X. Resultados obtenidos en la comparación estadística. χ^2 : chi-cuadrado. p-valor: la probabilidad de que los datos comparados sean lo mismo.

Estos resultados indican que la hipótesis nula se confirma para las zonas A y B, pues la diferencia observada entre el número de aislados de Aragón (A) y de Cataluña (B) no es significativa. Sin embargo, se confirma que la diferencia de prevalencia es significativa entre las granjas de Castilla-La Mancha y Aragón (95% de confianza), y Castilla-La Mancha y Cataluña (99% de confianza).

Por tanto se pueden diferenciar dos zonas, la de las comunidades autónomas de Aragón (27.2%) y Cataluña (31.5%) con mayor presencia de *C. difficile* en los animales con síntomas de diarrea y la comunidad de Castilla-La Mancha (14%) con menor número de aislados en los cerdos neonatos con diarrea.

Para comparar el número de aislados de *C. difficile* de animales que no presentaban diarrea, se realizó el mismo análisis. En este caso, se compararon también con los datos obtenidos a partir de las granjas control. En primer lugar, se estudió la posible relación entre el lugar y el número de aislados confrontando las cuatro zonas. El resultado fue:

$$\chi^2 = 37.44, \text{ con 3 grados de libertad, y un p-valor} = 0,$$

por lo que se puede rechazar la hipótesis nula al 99% de confianza. Por tanto, existe algún tipo de relación entre la prevalencia de *C. difficile* y la región en la que se ha encontrado.

Con el fin de estudiar si las diferencias son debidas a una diferencia entre las granjas estudiadas o una diferencia con el control, se compararon las zonas dos a dos, como en los casos anteriores. El resultado fue:

	χ^2	p-valor
zona A vs. Control	0'09	0'7
zona B vs. Control	9'07	0'002
zona C vs. Control	0'26	0'60
zona A vs. zona B	13'12	0'0003
zona B vs. zona C	31'22	0
zona A vs. zona C	2'83	0'09

Tabla XI. Resultados obtenidos en la comparación estadística. χ^2 : chi-cuadrado. p-valor: la probabilidad de que los datos comparados sean lo mismo.

Como se desprende de los resultados, la única zona que presenta diferencias significativas en cuanto a la presencia de *C. difficile* con el control es la zona B, con una confianza del 99%. Sin embargo, comparando las zonas de estudio entre sí, se observa que existen diferencias significativas entre las tres. Entre Cataluña y Aragón la diferencia es significativa al 99% de confianza, entre Cataluña y Castilla-La Mancha, al 99% de confianza y entre Aragón y Castilla-La Mancha al 90% de confianza. Estos valores nos permiten relacionar la prevalencia y la localización geográfica de la granja. Por ello, se puede establecer una gradación en la prevalencia de *C. difficile*, de mayor a menor, como sigue: Cataluña (54'5%), Aragón (24%) y Castilla La-Mancha (14%), recalando que en estas dos últimas regiones no presentan diferencias significativas con el control.

2.2.3.2. Relación entre *C. difficile* y diarrea neonatal

El estudio de la existencia de una posible relación entre la presencia de *C. difficile* en las muestras y la presencia de síntomas de diarrea en los animales, se hizo en primer lugar comparando los datos totales y absolutos obtenidos para animales con diarrea y animales sin diarrea, cuyas prevalencias son 22'8% y 28'6%, respectivamente.

La hipótesis nula de partida es que no existe relación entre la sintomatología de diarrea y la presencia de *C. difficile*. El resultado:

$$\chi^2 = 2,66, \text{ con 1 grados de libertad, y un p-valor} = 0,1,$$

indica que no se puede rechazar la hipótesis nula.

A continuación, se ha realizado la misma comparación para cada zona:

	χ^2	p-valor
zona A	0,02	0,89
zona B	7,19	0,007
zona C	0	0,1

Tabla XII. Resultados obtenidos en la comparación estadística. χ^2 : chi-cuadrado. p-valor: la probabilidad de que los datos comparados sean lo mismo.

En el único caso en el que podemos rechazar la hipótesis nula es para el área B, con un 99% de confianza. Esto implica la existencia de una relación entre la presencia de *C. difficile* y la presencia, o no, de sintomatología diarreica. Sin embargo, tras evaluar los porcentajes de prevalencia de *C. difficile* encontrados en Cataluña, 54,4% en animales sin diarrea y 31,5% en animales con diarrea, se observa que la prevalencia de este microorganismo en animales sin diarrea es significativamente mayor que en animales con diarrea.

Ahondando en el estudio de las diferencias entre prevalencias de *C. difficile* de animales con y sin diarrea, se han comparado los datos para cada una de las granjas estudiadas. En ninguna de las granjas, excepto la B1, las diferencias en cuanto a la prevalencia de *C. difficile* entre individuos sintomáticos y asintomáticos, es significativa. Los resultados indican que sólo se puede rechazar la hipótesis nula para la granja B1 al 95% de confianza, con:

$$\chi^2 = 4,86, \text{ con 1 grados de libertad, y un p-valor} = 0,02,$$

siendo significativamente mayor la prevalencia de *C. difficile* en animales sin diarrea (44%) que en aquellos que presentan síntomas (12%).

En resumen, de las diez granjas estudiadas, 9 no presentan diferencias significativas que relacionen a *C. difficile* como agente causal de la diarrea neonatal y en una, al interpretar los datos rigurosamente, podríamos entender que la presencia del microorganismo favorece el no desarrollo de la misma.

2.2.3.3. Relación entre *C. difficile* y la edad de los individuos

Para estudiar la relación entre la edad de los animales estudiados y la prevalencia de *C. difficile* se ha comparado el total de animales positivos por cultivo para este microorganismo en los individuos de 1-7 días de edad (25´9%; tabla VII) con los de individuos de 1-2 meses (0 de 239 muestras). Observando los resultados, ya se observa una diferencia significativa, pero se realiza el test estadístico para afirmarlo con rotundidad. La hipótesis nula es que no existe relación entre la edad y la presencia de *C. difficile*. El resultado confirma la diferencia que se observa:

$$\chi^2 = 74\text{´}53, \text{ con } 1 \text{ grados de libertad, y un p-valor} = 0,$$

por lo que se puede rechazar la hipótesis inicial al 99% de confianza, lo que indica que existe una relación entre la edad de los individuos y la presencia de *C. difficile*, estando presente en los individuos neonatos y no en los del grupo de 1-2 meses.

2.2.4. Toxinotipo

Todos los aislados, tal y como indicaron las tiras API, son *C. difficile*. De ellas podemos observar los siguientes tres perfiles toxigénicos, según la presencia de los genes que codifican para las toxinas:

Toxinotipo	nº aislados (%)
A ⁺ B ⁺ (tcdA+, tcdB+)	132 (94´3%)
A ⁻ B ⁻ (tcdA-, tcdB-)	7 (5%)
A ⁻ B ⁺ (tcdA-, tcdB+)	1 (0´7%)
A ⁺ B ⁻ (tcdA+, tcdB-)	0 (0%)
	140 total

Tabla XIII. Toxinotipos encontrados en las cepas de *C. difficile* aisladas. Tipos y número absoluto y porcentual.

De las 140 cepas aisladas en el curso del trabajo, sólo 8 de ellas presentan toxinotipos diferentes, A-B- y A-B+. Éstas 8 han sido aisladas a partir de las muestras procedentes de una sola granja de cerdos, la granja B3, y de animales sin síntomas de diarrea, correspondiéndose con la mitad de las cepas de *C. difficile* aisladas en esta granja.

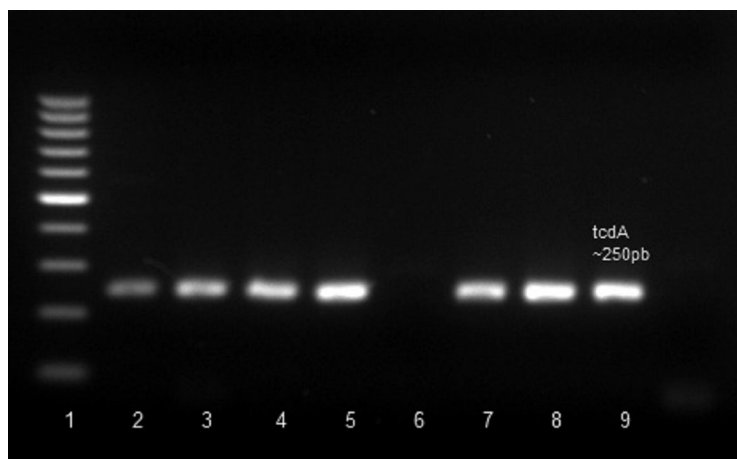


Figura 13. PCR simple de amplificación de un fragmento interno del gen *tcdA* de ~250pb (Kato et al., 1991). En el primer carril está el ladder. El segundo y tercer carril son los controles positivos para el gen *tcdA*. El resto de carriles son muestras de ADN de cepas de *C. difficile* aisladas de ganado porcino, excepto el último que es el control negativo. Como se observa en la muestra 3 (carril 6) no ha habido amplificación.

2.3. Discusión de los resultados

Han sido muchos los autores que han descrito la presencia de *C. difficile* en fauna doméstica (Hafiz, 1974; Princewe y Agba, 1982; Borriello et al., 1983; Jones, 1989; Riley et al., 1991; Perk et al., 1993; Frazier et al., 1993; Songer et al., 2000; Weese et al., 2001a; 2001b; Yaeger et al., 2002; Marks y Kather, 2003; Shivaprasad, 2003; Nagy y Bilkei, 2003; Baverud, 2004; Kiss y Bilkei, 2005; Lefebvre et al., 2006; Rodriguez-Palacios et al., 2006; Simango, 2006; Keel y Songer, 2006; Pirs et al., 2008; Avbersek et al., 2009). Sin embargo, hasta el momento no se había realizado un estudio de este tipo en el ganado español.

Los resultados obtenidos indican que es un microorganismo frecuente entre los cerdos neonatos, presente en el 25'9 % de media, pero que no se encuentra en individuos de entre 1 y 2 meses. La alta tasa de prevalencia de *C. difficile* en neonatos

había sido descrita previamente por Keel et al. (2007a) en explotaciones ganaderas estadounidenses, así como en explotaciones ganaderas europeas (Pirs et al., 2008; Zidaric et al., 2008).

Así mismo, la ausencia de *C. difficile* en individuos no neonatos coincide con la mayoría de las observaciones realizadas hasta el momento. Songer et al. (2000, 2005, 2006), por ejemplo, definen a *C. difficile* como la mayor causa de diarrea neonatal en cerdos, aunque sí describe la existencia de este microorganismo en individuos mayores. Por otra parte, en un estudio realizado en ganado vacuno, Rodriguez-Palacios et al. (2006) demuestran una relación lineal entre la edad del animal y la probabilidad de encontrar *C. difficile*, la cual disminuye a medida que aumenta la edad del animal muestreado. Pese a que se trata de otra especie animal, a la luz de los resultados obtenidos, podría suceder algo similar en el caso del ganado porcino. Además, podría ser lo mismo que ocurre en humanos, ya que se han descrito prevalencias muy altas de *C. difficile* en las heces de neonatos humanos, de hasta el 80%, y bajas (3%) en adultos sanos (Kuijper y Tüll, 2006; Barbut y Petit, 2001). Aunque hay que señalar también que en humanos, la edad avanzada es un factor de riesgo para el desarrollo de la patología (Denève et al., 2009).

Por otro lado, se ha descrito la presencia de este microorganismo en cerdos adultos, describiéndolo como agente causal, con posible implicación, en la muerte de cerdas adultas poco después del parto (Kiss y Bilkei, 2005). En el mismo sentido, Bakri et al. (2009) encuentran *C. difficile* en las heces de 2 cerdos, de un total de 10, todos mayores de 6 meses. Estas observaciones se oponen a la nuestra de no presencia de *C. difficile* en animales de entre 1 y 2 meses.

Posteriormente a nuestro estudio, se han realizado otros estudios sobre la presencia de *C. difficile* en cerdos. Así, Avbersek et al. (2009) estudian la presencia de este microorganismo en animales menores de 10 días, encontrándolo en el 50,9% de las muestras, una prevalencia de más del doble que la hallada en España. Para comparar con nuestros resultados es necesario resaltar que los autores cultivan las muestras en un medio de enriquecimiento, antes del cultivo.

Los resultados muestran que el porcentaje de recuperación de *C. difficile* es indistinguible si comparamos entre los animales con sintomatología con o sin diarrea. El resultado es el mismo tanto si se analizan de forma conjunta como si se diferencia por comunidad autónoma, mostrando que la frecuencia es prácticamente la misma entre los animales sintomáticos y los asintomáticos, tanto dentro de las mismas regiones como comparando con las granjas tomadas como control. A partir de estas observaciones podemos asumir que la mera presencia del microorganismo no es suficiente para que el hospedador desarrolle la enfermedad, sino que es necesaria la confluencia de otros factores para que la patología se desarrolle. Estos datos reafirman la hipótesis de que *C. difficile* se comporta como patógeno oportunista (Kyne et al. 2000; Morris et al., 2002; Cave et al. 2002; De La Cochetière et al., 2008). Sin embargo, la mera presencia de la bacteria, supone una gran cantidad de animales portadores asintomáticos, que podrían transmitir la infección a otros cerdos o al ser humano, si se confirmase la hipótesis de que se trata de una zoonosis alimentaria (Borriello et al., 1983; Songer, 2004; Rodriguez-Palacios et al., 2006; Keel y Songer, 2007b; Rupnik, 2007; Pirs et al., 2008; Jhung et al., 2008; Indra et al., 2009; Songer et al., 2009).

También es de destacar que sólo se aisló a *C. difficile* en el 22,8% de todas las muestras de animales con diarrea. Esto se contradice con los porcentajes más elevados obtenidos por otros autores previos, como Yaeger et al. (2002), quienes detectan toxinas de *C. difficile* en el 55% de los casos de diarrea neonatal porcina estudiados o Jones et al. (1987) quienes encuentran al microorganismos en el 63% de las muestras de cerdos con diarrea; o con las incidencias de Songer et al. (2000, 2005), quienes afirman que este bacilo es el agente causal de la diarrea neonatal, tras aislarlo de forma mayoritaria del tracto intestinal de cerdos neonatos muertos por estrés respiratorio asociado a diarrea neonatal. Por otro lado, concuerda con los resultados obtenidos en vacas canadienses por Rodriguez-Palacio et al. (2006), quienes no observan diferencias significativas de prevalencia entre los animales diarreicos y animales control, y con los obtenidos posteriormente por Avbersek et al. (2009) tanto en cerdos como en vacas. En la presente investigación se observa además que en los animales de la región de Cataluña, el número de *C. difficile* es significativamente mayor (p-valor= 0,02) en aquellos individuos sin sintomatología, dato que por el momento se tomará como una aberración respecto a la generalidad.

Sin embargo, es curioso observar como la zona de Cataluña presenta una prevalencia significativamente mayor a la del control. Esta diferencia podría sostener que sí existe cierta relación entre la presencia de *C. difficile* y la diarrea neonatal porcina, ya que las granjas control se tomaron como tales porque en ellas no se detectaron problemas de diarrea. Así mismo, tampoco se ha observado diferencia entre las granjas de Castilla-La Mancha y Aragón con el control. Siguiendo este razonamiento, los resultados pueden interpretarse de modo que se identifique un problema de diarrea neonatal debido a una alta presencia de *C. difficile* en las explotaciones ganaderas afectadas, probablemente debido a un gran número de portadores asintomáticos, como se refleja en las altas prevalencias encontradas en animales que no presentan signos de diarrea, o al carácter oportunista del microorganismo mencionado anteriormente.

A la luz de estos datos surgen diferentes interrogantes en cuanto a la patología de *C. difficile*. En primer lugar, cabe preguntarse el por qué de la gran presencia de este microorganismo en cerdos sin diarrea. Este síntoma se considera la manifestación inmediata de la patología, aunque no siempre se produce en el transcurso de un brote por *C. difficile* (Waters et al., 1998). Para dar respuesta a esta pregunta surgen diferentes hipótesis:

✓ Las cepas de *C. difficile* presentes en los cerdos sin síntomas no producen las toxinas *tcdA* y *tcdB*, responsables directas del daño en la mucosa intestinal y la consiguiente diarrea, lo que podría deberse a diferentes causas:

- Porque no presentan los genes que codifican para las citadas toxinas. Se ha confirmado que casi todas las cepas presentan los genes *tcdA* y *tcdB*, es decir, presentan un toxinotipo A⁺B⁺. Sólo ocho de las cepas aisladas presentan diferente toxinotipo (A⁻B⁻ y A⁻B⁺), que parecen estar restringidas a una de las granjas de la zona de Cataluña.
- Porque no expresan los genes, y por tanto no sintetizan las toxinas. La no expresión de algún carácter suele estar ligado a ambientes diferentes (Fenotipo = Genotipo + Ambiente) o por la ausencia de los genes reguladores positivos.

- Respecto al ambiente, una de las diferencias ambientales determinantes con las que puede encontrarse *C. difficile* será la composición de la microbiota intestinal de cada individuo, factor que analizaremos más abajo, o de la alimentación, aunque se asume que al tratarse de animales de renta será similar. Aún así, para confirmar la hipótesis de una diferente expresión de las toxinas, hubiera sido necesario un análisis de la citotoxicidad de las heces de los animales.
- Respecto a la presencia o ausencia de los genes reguladores positivos, en este caso *tcdR*, no se ha verificado. Podría suceder que, igual que algunas cepas carecen de los genes que codifican para las toxinas, otras cepas carezcan de los reguladores. Para confirmarlo sería necesario realizar el toxintipado completo de las cepas (Rupnik et al., 1998).

✓ Porque aunque la toxina está presente, no ejerce su actividad tóxica.

- La principal explicación para este fenómeno se resumiría en la ausencia de receptores para las toxinas en el epitelio intestinal de los cerdos neonatos, como ocurre en otras especies animales como los conejos, los hamsters o el ser humano (Hall y O'Tool, 1935; Rolfe y Song, 1983; Waters et al., 1998). Sin embargo, Keel y Songer (2007b) realizaron un experimento mediante el cual demostraron que los cerdos de un día de edad ya presentan el principal receptor confirmado para la toxina A, α -galactosil. También encuentran que la toxina se une a otras zonas del intestino dónde no aparece este receptor, por lo que es probable la presencia de receptores adicionales para esta toxina. Lo que no observa es el receptor para la toxina B, si ésta se termina por demostrar imprescindible para la patogenicidad (Lyras et al., 2009). Esto constituiría una explicación plausible de que los individuos sin sintomatología no presentaran el receptor.
- Alternativamente, la posible existencia de variaciones en la composición del glucocalix de la mucosa intestinal dentro de la población porcina, por lo que dentro de la misma población encontraríamos animales que presentan

los receptores y animales que no contienen los receptores para las toxinas de este microorganismo.

- Una tercera explicación podría ser que las toxinas no alcanzaran las células. *C. difficile* puede adherirse tanto a los enterocitos como a la mucosa (Borriello et al., 1988; Cerquetti et al., 2002). Podría suceder que las bacterias puedan situarse en diferentes localizaciones a lo largo del eje axial del intestino. Si la población de *C. difficile* está situada relativamente alejada de las células diana, podría suceder que las toxinas no alcanzaran a sus receptores. Para confirmar esta opción habría sido necesario determinar si los animales no diarreicos también excretaron toxinas con las heces.

✓Competencia. Al hablar de competencia entre los microorganismos podemos diferenciar dos momentos ecológicos en los que circunscribir esta competencia:

- El primero es la competencia que sucede en condiciones normales, y deriva de la convivencia de diferentes especies en el mismo territorio. Como consecuencia de esta competencia, principalmente por nutrientes esenciales, *C. difficile* no puede sobrecrecer (Keel y Songer, 2006; Walk y Young, 2008). Como estamos estudiando a individuos neonatos, los sucesos de competencia ecológica estarán enmarcados dentro del momento ecológico explicado a continuación.
- El segundo se denomina sucesión ecológica y ocurre cuando el hábitat a colonizar está despoblado. La sucesión es el proceso mediante el cual el ecosistema madura, y se produce mediante sustituciones continuas de las especies colonizadoras por otras más adaptadas, hasta que llegan las especies mejor adaptadas al hábitat, que conformarán el ecosistema clímax. Este fenómeno ocurre en todas las biocenosis al menos una vez, cuando el hábitat es virgen, y en este caso se denomina sucesión ecológica primaria. Y si se produce una gran perturbación en el ecosistema vuelve a ocurrir este fenómeno, denominándose esta vez sucesión ecológica secundaria. En el caso del ecosistema intestinal la sucesión ecológica primaria se produce tras el nacimiento del individuo y la sucesión ecológica secundaria, por ejemplo

tras una ingesta masiva de antibióticos. En el momento del nacimiento, la sucesión ecológica primaria ocurrirá conforme vayan llegando diferentes especies de microorganismos al tracto intestinal y lo colonicen. Entre ellos se darán las mismas relaciones de competencia que en condiciones estables, para mantenerse en el hábitat, siendo los mejor adaptados a las condiciones intestinales los que colonizan finalmente la mucosa (Hirayama et al., 1995). Por tanto, otra explicación a la alta prevalencia de este microorganismo en animales sin sintomatología podría ser que los microorganismos más competitivos están eliminando a los menos competitivos, como *C. difficile*. Este fenómeno se ha observado en hamsters dónde se ha encontrado que los animales de 4 días de edad presentan una gran población en el ciego, reduciéndose hasta ser indetectable a las dos semanas de vida de los roedores, coincidiendo con el momento en el que el ecosistema intestinal en estos animales es maduro (Waters et al., 1998). Esta explicación además justificaría por qué, en el presente trabajo, no se ha encontrado en animales de más edad.

✓Sensibilidad de los animales. Como se sabe, el sistema inmune de cada individuo es diferente, por lo que es probable que algunos individuos sean más susceptibles a la infección que otros. En este sentido, hay que señalar que *C. difficile* no se considera un patógeno estricto porque no le es posible colonizar el hábitat y crecer en suficiente número como para producir suficientes toxinas. Por tanto, otra vez nos encontramos hipotetizando la posibilidad de tener un alto número de portadores asintomáticos, como afirman Avbersek et al. (2009), en los que encontramos al microorganismo pero que por diversas causas no producen síntomas, aunque actúan como vector de transmisión del mismo.

✓Evolución. Siguiendo la línea de pensamiento del párrafo precedente, y sabiendo que tenemos aproximadamente el mismo número de portadores sintomáticos que asintomáticos, quizá estamos observando un proceso de coevolución del patógeno (*C. difficile*) y el hospedador (cerdo). En este proceso estaríamos observando una pérdida de virulencia, por ejemplo mediante la pérdida de los genes que codifican para las toxinas (Fluit et al., 1991), pasando de ser el agente etiológico de la CDAD neonatal a ser un

simbionte de la flora normal. Lo contrario, una ganancia de virulencia, se ha certificado en el caso de cepas hipervirulentas, al parecer con orígenes diferentes (He et al., 2010).

Alternativamente, habría que preguntarse por la gran proporción de animales con síntomas de diarrea en cuyas heces no se ha aislado *C. difficile* (77,2%). En este sentido hay que tener en cuenta sobre todo, el método de aislamiento utilizado en el presente trabajo. Este método ha consistido en utilizar alcohol al 70%, como método selectivo de los esporos de la muestra, en contra de las formas vegetativas. Por tanto, si en la muestra de heces sólo hubiera formas vegetativas del microorganismo, éstas se perderían en el procesado (Aspinall y Hutchinson, 1992).

Adicionalmente, hay que contemplar el carácter multifactorial de la diarrea neonatal porcina, donde podrían estar implicados otros microorganismos como rotavirus, adenovirus, *E. coli* (principalmente enterotoxigénico), *C. perfringens*, coccidios, *Cryptosporidium* sp. (Morin et al., 1983; Holland, 1990). Es frecuente también la aparición de diarreas por cambios en la microbiota intestinal (Walk y Young, 2008). Y además podría darse la circunstancia de que el microorganismo productor de la patología no sea excretado al medio.

En lo que respecta a las diferencias entre las tres regiones ganaderas estudiadas, se observa que existen diferencias significativas en los valores de prevalencia totales de *C. difficile* en el ganado porcino de las tres comunidades autónoma. De este modo, las zonas pueden ordenarse de mayor a menor, según su valor de prevalencia, como siguen: Cataluña (43%), Aragón (26%) y Castilla La-Mancha (8%). Al separar los valores obtenidos entre animales con sintomatología diarreica y sin sintomatología de diarrea, las diferencias se reducen. La prevalencia de los animales con diarrea de las zonas de Cataluña y Aragón no presenta diferencias significativas; sin embargo, en Castilla La-Mancha la prevalencia es significativamente menor (p -valor=0,02 y 0,0056, comparando con Aragón y Cataluña, respectivamente).

En cuanto a los animales sin diarrea, se ha encontrado que la presencia de *C. difficile* en las granjas con problemas de diarreas neonatales es la misma que en las granjas control, excepto para el caso de Cataluña, donde se ha encontrado una mayor proporción del microorganismo, con respecto a las otras dos regiones. En este caso, al

igual que sucedía al estudiar la prevalencia global, podemos ordenar las comunidades autónomas respecto a su porcentaje de *C. difficile*: Cataluña, Aragón y Castilla La-Mancha, de mayor a menor, debido a las diferencias significativas que se observan entre las tres regiones.

Curiosamente, dentro de las zonas muestreadas, la Comunidad Autónoma con mayor prevalencia de *C. difficile* es Cataluña, la situada más al norte de la península Ibérica (41° Norte). La que menos prevalencia presenta es la que se encuentra más al sur, Castilla-La Mancha (39°N). Una de las explicaciones que sugiere este dato es que la presencia de *C. difficile* podría estar condicionada por la latitud. Sin embargo, esta justificación se invalida al tener en cuenta que las granjas control están ubicadas en Cataluña y la diferencia de prevalencias entre éstas y las que presentaban diarrea neonatal porcina es significativa. Además *C. difficile* ha sido aislado en Zimbawe (Simango, 2006), a una latitud de 17° Sur, y en California, de infecciones por *C. difficile* en perros y potros (Cave et al., 2002, Magdesian et al., 2002), con una latitud de 38°5'N.

Como argumentación alternativa, existen autores que refieren que el aislamiento de *C. difficile* podría estar determinado por la época del año en la que se realiza el muestreo (Norman et al., 2009), siendo mayor la presencia del microorganismo en los meses fríos. La misma observación se refleja en el estudio de la presencia de microorganismos en carnes, al recuperar un mayor porcentaje en las muestras recogidas en meses fríos (Rodríguez-Palacios et al., 2009). En el presente estudio, sólo podemos diferenciar las muestras analizadas, en base a la estación en la que se recogieron en dos grupos, las granjas con problemas de diarrea neonatal y las 3 granjas control. Como muestran los resultados, y se ha apuntado anteriormente, se observan diferencias significativas entre las prevalencias halladas en el grupo control y la zona B, siendo mayores en esta última. Por tanto una explicación alternativa a la existencia de estas diferencias podría deberse a la climatología en el momento de recogida de las muestras, si nos ajustamos a las observaciones de Norman et al. (2009). Las muestras tomadas en la zona B fueron recogidas en noviembre-diciembre y las muestras de las granjas control se tomaron en marzo, lo que estaría de acuerdo con la bibliografía. Sin embargo, las muestras de las otras dos zonas, A y C, también se recogieron entre los meses de

noviembre y diciembre y los valores encontrados no mostraron diferencias con los observados en la zona control. Esto nos impide aceptar la “hipótesis climatológica”.

Por otro lado, todos los microorganismos aislados a partir de heces de cerdos, e identificados como *C. difficile* mediante métodos bioquímicos, fueron sometidos a dos PCRs específicas, a fin de conocer parcialmente su toxinotipo. En resumen, se intentó amplificar los mismos genes específicos de la bacteria: *tcdA* y *tcdB*, y en base a su presencia o ausencia, determinar si se trataba de este microorganismo o no.

Los resultados, en primer lugar, confirman que los aislados obtenidos a partir del muestreo en ganado porcino son *C. difficile*, lo que concuerda con las identificaciones realizadas mediante pruebas bioquímicas y características organolépticas de los microorganismos.

En segundo lugar, los *C. difficile* aislados de la flora fecal porcina muestran que no todos pueden englobarse dentro de la misma cepa, como ya se ha comentado. En base al perfil toxigenico hallado en estos aislados, podemos afirmar que al menos, se han aislado tres cepas diferentes, cuyos toxinotipos son:

A⁺B⁺

A⁻B⁻

A⁻B⁺

Como se ha explicado previamente, el toxinotipo realizado en el presente trabajo está basado exclusivamente en las toxinas A y B, debido a que sólo se ha estudiado la presencia, o ausencia, de los genes *tcdA* y *tcdB*. Para realizar un toxinotipado completo de las cepas habría que amplificar todas las regiones del locus *PaLoc*, además del gen de la toxina binaria (Rupnik et al., 1998). Pese a ello, con los presentes resultados, podemos afirmar que tenemos un mínimo de tres cepas genéticamente diferentes.

Curiosamente, esta diversidad genética procede exclusivamente de una de las granjas muestreadas (granja B3) y del grupo de portadores asintomáticos. Este resultado evidencia que la población de *C. difficile* presente en los animales de esta ubicación es muy diversa. En este caso asumimos que existe alta diversidad para este microorganismo, no sólo porque se ha hallado diversidad de cepas, sino porque la suma de las cepas A⁻B⁻ y A⁻B⁺ constituyen la mitad de los aislados (8 aislados) encontrados en esta explotación ganadera, lo que indica un alto número de representantes de esas cepas en relación al número total que se han hallado. Esta proporción es la que sigue:

50% A^+B^+ ; 43'75% A^-B^- ; y 16'25% A^-B^+ . Calculando las proporciones de forma global, teniendo en cuenta el conjunto de aislados en el estudio, la proporción de cepas A^-B^- se reduce al 5%. Norman et al. (2009), al analizar un gran número de muestras fecales procedentes de explotaciones porcinas de EEUU encuentran que la mayoría de aislados son A^+B^+ y sólo un pequeño porcentaje presenta un patrón toxigénico diferente, concretamente A^-B^- y A^-B^+ , como en nuestro caso. En Korea también se han hallado los mismos perfiles, esta vez procedentes de muestras de pacientes humanos, donde encontraron que el 50% son A^+B^+ ; el 27'3% A^-B^+ y el 22'7% A^-B^- (Shin et al., 2009). En otros trabajos se ha encontrado también variabilidad en cuanto a las cepas estudiadas. Así, Persson et al. (2008) encuentran en pacientes daneses un 0'6% de cepas A^+B^- y un 15% de cepas no toxigénicas, y Sloan et al. (2008) encuentran que en muestras fecales un 11'4% de los *C. difficile* estudiados son A^+B^- y un 6'8%, A^-B^+ . En el resto de explotaciones ganaderas porcinas estudiadas en esta tesis, todos los *C. difficile* encontrados son A^+B^+ .

Observando los resultados obtenidos en las explotaciones porcinas de España y los resultados de otros trabajos (Persson et al., 2008; Sloan et al., 2008; Norman et al., 2009; Shin et al., 2009) puede deducirse que, en base al carácter de la presencia de los genes que codifican para las toxinas A y B (A^+B^+), las poblaciones son semi-homogéneas. Entendiendo población semi-homogénea para un carácter, como una población en la que la mayoría de sus representantes presentan una característica determinada, en este caso los genes *tcdA* y *tcdB*, pero siempre existen un número reducido de representantes de la especie con variaciones de esa característica: A^-B^- , A^-B^+ o A^+B^- . La representación gráfica de población semi-homogénea es una distribución normal o curva de Gauss con una elevada pendiente, tal y como se muestra en el ejemplo siguiente:

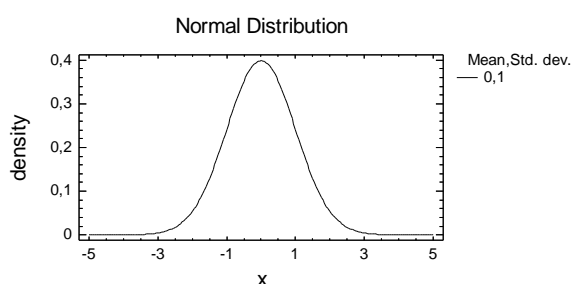


Figura 14. Ejemplo gráfico de una población con distribución normal para un carácter, en el que la mayoría de los individuos presentan el mismo fenotipo para ese carácter.

La distribución normal es la que aparece usualmente en la naturaleza, para un carácter cualquiera, dentro de una población de una especie de ser vivo. Esta distribución se caracteriza, porque para ese carácter una gran parte de la población presenta una variante, que por tanto es una variante mayoritaria. Mientras que el resto de variantes están representadas, pero en un número menor de individuos. Esto le permite a la población cierta plasticidad para responder hacia una u otra dirección de forma acorde con cualquier cambio que pudiera producirse en el medio.

Encontrar esta distribución genotípica dentro de las poblaciones de *C. difficile* de una ubicación concreta, como puede ser en la presente tesis las granjas de ganado porcino, indica que son poblaciones establecidas a lo largo del tiempo. Complementariamente, la pérdida y ganancia de virulencia de cepas de *C. difficile* es una característica observada desde hace tiempo (Fluit et al., 1991; Warny et al., 2005; Kuijper et al., 2008; O'Connor et al., 2009) siendo más estudiado el aumento de virulencia por los brotes epidémicos a los que ha dado lugar (Pépin et al., 2005; McDonald et al., 2005). En este sentido, parece demostrado que la hipervirulencia de las diferentes cepas hipervirulentas (001, 017, 027 y 078) ha surgido de forma separada y probablemente varias veces a lo largo del tiempo (He et al., 2010). Además se conoce la gran plasticidad del genoma de *C. difficile*, debido a la gran cantidad de elementos móviles que presenta, lo que indica la importancia de la transferencia horizontal de genes en la evolución de este microorganismo (Sebahia et al., 2006; He et al., 2010). Por tanto, podemos suponer que las cepas de *C. difficile* que no presentan los genes para las toxinas encontradas en la presente tesis y en trabajos realizados por otros autores, podrían haber surgido por eventos evolutivos de la misma naturaleza de aquellos que habrían dado lugar a las cepas hipervirulentas.

Siguiendo esta línea de razonamiento es interesante un estudio llevado a cabo por Cheknis et al. (2009) dónde estudian un gran número de *C. difficile* aislados en tres continentes (América, Europa y Australia) mediante análisis de restricción por endonucleasas (REA). Cada REA es asimilable a un ribotipo, según los propios autores del estudio, y al menos indicarían cepas diferentes. En base a sus resultados se observa que en algunas cepas las diferencias porcentuales son altas, siendo el ejemplo más reseñable la cepa BI (NAPI o ribotipo 027), que muestra una prevalencia del 36%, 8% y 0% en América del Norte, Europa y Australia, respectivamente. Analizando el número

de aislados que obtienen en cada caso mediante un análisis estadístico sencillo, chi-cuadrado, se obtiene que comparando los porcentajes de cepas diferentes aisladas en las tres zonas continentales, existe algún tipo de relación entre la cepa y el lugar de aislamiento (p -valor=0). Esta observación podría explicarse por la ocurrencia de eventos microevolutivos diferentes asociados al lugar o a las condiciones ambientales, debido a diferencias en las presiones selectivas a las que los microorganismos se ven sometidos, como el ecosistema intestinal del que forman parte.

En Europa, aunque los datos no pueden compararse matemáticamente debido a los diferentes métodos de diagnóstico e identificación utilizados por los diferentes países, se observan diferencias en cuanto al porcentaje de *C. difficile* ribotipo 027 encontrados del total de microorganismos analizados. Así, en los que se ha encontrado mayores porcentajes de presencia de esta cepa han sido Finlandia (49%), Reino Unido (30%), donde sorprende la alta incidencia en Inglaterra (42%), Francia (27%), Dinamarca (30%) y Luxemburgo (26%). Mientras que en otros países como España, los pocos casos encontrados han sido importados, excepto una infección accidental de un técnico de laboratorio (Bouza et al., 2008). Del mismo modo, los brotes epidémicos causados por este microorganismo se localizan en Centroeuropa y Reino Unido (Kuijper et al., 2008).

Por lo tanto, mediante la integración de lo que se conoce sobre las diferentes cepas de *C. difficile* existentes, y su localización podemos determinar por un lado que son poblaciones estables para un lugar concreto, y por otro que las poblaciones presentan cierto grado de variabilidad genética, e incluso están constituidas por diferentes cepas. Lo cual induce a pensar que las poblaciones de *C. difficile* que encontramos en cada región del planeta, estarán conformadas por diferentes cepas, las cuales estarán adaptadas de forma local al hábitat en el que viven y al resto de poblaciones de microorganismos presentes en éste.

La importancia de este trabajo radica en dos cuestiones clave. En primer lugar constituye el primer gran estudio de prevalencia de *C. difficile* en España, concretamente en el ganado porcino. En segundo lugar, las altas tasas de prevalencia obtenidas. Los resultados indican que este microorganismo está muy presente en neonatos, y predomina en algunas zonas de España, como Cataluña. La importancia de

estos datos, además de respecto al estado sanitario de los animales, es la posibilidad de que este microorganismo se transmita al ser humano a través de la carne de los animales infectados como sugieren algunos autores (Rodríguez-Palacios et al., 2007a; Rodríguez-Palacios et al., 2009; Songer et al., 2009; Bouttier et al., 2010), o pueda transmitirse la infección por otras vías, y sean éstas las que estén influyendo en el aumento de los casos de infección por *C. difficile* adquiridos en la comunidad (Bignardi y Settle, 2008; Freeman et al., 2010). En este sentido, estudios de ribotipado realizados en el Hospital General Universitario Gregorio Marañón con las cepas aisladas en el presente trabajo han demostrado que la mayoritaria es la 078, causante de infecciones en el ser humano (Keel et al., 2007a; Jhung et al., 2008), lo que apoya la argumentación a favor de una posible transmisión zoonótica del microorganismo.

Capítulo 3

3.- *C. difficile* en la fauna salvaje del Parque Nacional de Doñana

El estudio de la presencia de *Clostridium difficile*, y su significado, en el entorno del Parque Nacional de Doñana se abordó desde dos perspectivas diferentes. Como ya se ha comentado en el apartado II.1.3 de la Introducción., la fauna de Doñana está conformada por animales salvajes y animales explotados comercialmente que conviven en libertad junto con los primeros. Además, al ser un enclave natural con un gran número de especies vulnerables o en peligro, cuenta con un centro de recuperación de fauna que atiende a los animales heridos o en peligro de extinción.

Así, el estudio se dividió para abarcar ambos tipos de muestras. Por un lado se estudiaron 421 muestras fecales de diferentes animales salvajes que habitan la Reserva Natural, recogidas entre Julio de 2007 y Octubre de 2008, pertenecientes a diferentes especies animales representantes de las clases mamíferos, aves y anfibios.

Por otro lado, debido a la presunción de que la infección por *C. difficile* está asociada al consumo de antibióticos, demostrado *in vitro* y mediante experimentación animal (Bartlett et al., 1977; Borriello, 1998; Rodríguez-Palacios et al., 2007b), se analizaron 32 muestras fecales procedentes de animales que pasaron por el centro de recuperación de fauna del Parque, es decir, que pasaron por un Centro Veterinario por diversas causas y 100 muestras de material fecal de vacas de explotaciones ganaderas de los alrededores del Parque, recogidas durante las campañas de saneamiento que se realizan a estos animales.

3.1. Material y Métodos

3.1.1. Muestreo

3.1.1.1. Lugar de Muestreo

El lugar de muestreo se encuadró dentro del Parque Nacional de Doñana, en las zonas indicadas en el siguiente mapa:



Figura 15. Mapa que muestra las localizaciones exactas de los lugares de muestreo. Realizado con Google Earth a partir de las coordenadas obtenidas del cuaderno de Campo de Doñana (EBD; <http://161.111.232.183/CuadernosEnLaRed/Extranet/Website/FichasLocalizaciones/ArbolLugares.aspx>)

3.1.1.2. Animales objeto de muestreo

En total, se analizaron 553 muestras de heces recogidas en el Parque Nacional de Doñana, que son la suma de las 421 muestras de fauna salvaje, las 32 procedentes de fauna salvaje del centro de recuperación y 100 procedentes de campañas de saneamiento

de vacas de explotaciones ganaderías cercanas. Estas muestras pertenecen a un total de 26 especies animales pertenecientes a tres clases de vertebrados.

Clase	Orden	Familia	Especie	Nombre vernáculo	n°
<i>Amphibia</i>	<i>Anura</i>	<i>Hylidae</i>	<i>Hyla meridionalis</i>	Ranita	5
		<i>Pelobatidae</i>	<i>Pelobates cutitripes</i>	Sapo	1
	<i>Caudata</i>	<i>Salamandridae</i>	<i>Triturus pigmaeus</i>	Tritón	5
<i>Aves</i>	<i>Falconiformes</i>	<i>Accipitridae</i>	<i>Milvus milvus</i>	Milano	20
	<i>Passeriformes</i>	<i>Hirundinidae</i>	<i>Hirundu rustica</i>	Golondrina	2
		<i>Sturnidae</i>	<i>Sturnus vulgaris</i>	Estornino	1
	<i>Galliformes</i>	<i>Phasianidae</i>	<i>Alectoris rufa</i>	Perdiz	8
	<i>Gruiformes</i>	<i>Rallidae</i>	<i>Fulica atra</i>	Focha común	28
			<i>Fulica cristata</i>	Focha cornuda	3
	<i>Anseriformes</i>	<i>Anatidae</i>	<i>Anser anser</i>	Ganso	99
<i>Anser platyrhynchos</i>			Pato	10	
<i>Mammalia</i>	<i>Artiodactyla</i>	<i>Bovidae</i>	<i>Bos taurus</i>	Vaca	145
		<i>Suidae</i>	<i>Sus scrofa</i>	Jabalí	40
		<i>Cervidae</i>	<i>Cervus elaphus</i>	Ciervo	22
			<i>Dama dama</i>	Gamo	20
	<i>Perossodactyla</i>	<i>Equidae</i>	<i>Equus caballus</i>	Caballo	85
	<i>Lagomorpha</i>	<i>Leporidae</i>	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	Conejo	10
			<i>Lepus granatensis</i>	Liebre	3
	<i>Carnivora</i>	<i>Viverridae</i>	<i>Genetta genetta</i>	Jineta	9
		<i>Felidae</i>	<i>Linux pardinus</i>	Lince	1
			<i>Felix silvestris</i>	Gato silvestre	23
		<i>Mustelidae</i>	<i>Meles meles</i>	Tejón	1
			<i>Lutra lutra</i>	Nutria	1
		<i>Canidae</i>	<i>Vulpes vulpes</i>	Zorro	5
			<i>Canis lupus</i>	Perro	2
	<i>Herpestidae</i>	<i>Herpestes ichneumon</i>	Meloncillo	4	

Tabla XIV. Número de heces analizadas de cada especie, las cuales están agrupadas siguiendo un criterio sistemático: Clase, Orden, Familia, Género y especie. Además, incluye el nombre vernáculo (definición drae: Dicho especialmente del idioma o lengua: Doméstico, nativo, de nuestra casa o país).

3.1.1.3. Recogida de las muestras en el campo

Debido a la gran variedad de animales muestreados, pertenecientes a diferentes Clases, Órdenes, Familias, Géneros y Especies, con hábitats y etología diferentes, el muestreo para cada grupo animal se hizo de un modo concreto, guardando la máxima de perturbar lo menos posible a los animales.

Los animales, cuyas muestras recogimos por muestreo en el campo son los siguientes: ranita, sapo, tritón, milano, golondrina, estornino, perdiz, focha, ganso, pato, vaca, jabalí, ciervo, gamo, caballo, conejo, liebre, jineta, lince, tejón, nutria y zorro. Todas ellas recogidas mediante escobillón estéril sin medio de transporte, y almacenadas a -20°C hasta su posterior procesamiento. En este caso, el muestreo se llevó a cabo como se describe a continuación:

✓ Anfibios: El método utilizado en el muestreo de esta Clase de animales fue el de captura y suelta. Los animales fueron capturados en la laguna Dulce, en Pino Muerto y en la Laguna del Orfeón, llevados al laboratorio de campo del PN de Doñana. La muestra en este caso fue perianal, recogida directamente con el escobillón estéril. Para dos de las ranitas, también se recogieron las heces de los animales. Después de tomar las muestras pertinentes, los animales fueron devueltos a su hábitat.

✓ Aves: milanos, golondrinas, estorninos, perdices, fochas, gansos y patos. Las muestras procedentes de milanos fueron recogidas mediante el método de captura y suelta en las zonas de Matagordas y El Raposo. Se tomó una muestra de cada individuo, tras ser identificado y anillado, de la cloaca del ave.

Las muestras pertenecientes a fochas, gansos y patos, fueron tomadas de heces recién dejadas por el animal. Las muestras se tomaron de cuatro localizaciones: Veta La Palma, Cañada de las Aves, Casa de los Guardas y Caracoles, y en dos momentos, a su llegada al Parque y poco antes de su marcha.

Las muestras de perdices fueron tomadas del suelo. Las de golondrinas y estorninos de las proximidades del nido. Todas fueron recogidas de las zonas de Palacio y de la Laguna de Sta. Olalla.

✓ Mamíferos: las muestras procedentes de vacas, jabalíes, y caballos se recogieron siguiendo un protocolo desarrollado por nuestro grupo de trabajo. La población animal de estudio fue observada hasta asegurarnos de que algunos individuos de la misma hubieran defecado. A continuación, se ahuyentó a la población y se tomaron muestras de la zona central de las heces recién defecadas. El muestreo se llevó a cabo en la zona de las Gangas, Palacio, Caño de Martinazo, Pinar San Antón, Rincón de la Boliya, Laguna de Santa Olalla,

Laguna el Zahillo, Pinar de San Agustín, La Frenera, Zalagalano, El Rocío y Matasgordas. En el caso de los caballos hay que destacar tres poblaciones diferentes, pertenecientes a diferentes razas equinas: los caballos de retuertas, los caballos que los guardas utilizan en el interior del Parque y los caballos domésticos, recogidas en las proximidades de El Rocío, pertenecientes a habitantes del pueblo.

Las muestras de conejo, liebre, ciervo y gamo se recogieron del suelo, tras comprobar que fueran frescas. En este caso se recogieron enteras en un contenedor estéril. Éstas se tomaron de Las Gangas, Palacio, Martinazo y Matasgordas.

Para recoger las muestras de jineta, lince, tejón, nutria y zorro fue necesario conocer antes la etología de estos carnívoros, pues todos ellos defecan en lugares concretos, ya sea en letrinas como la jineta, el tejón o la nutria; en zonas donde llamen la atención como los zorros, o en los caminos como los lince. Las letrinas de jineta se encontraron en Zalagalano, las muestras de lince, tejón y zorros en Matasgordas y la de nutria en la Laguna Dulce.

	Ranita	Tritón	Sapo	Milano	Golondrina	Estornino	Perdiz común	Focha	Focha	Ganso	Pato	cornud.	Vaca	Caballo	Jabalí	Conejo	Ciervo	Gamo	Liebre	Jineta	Lince	Tejón	Nutria	Zorro	TOTAL
Loc. desconocida			20			1										1									22
C. pájaros								10	3																13
Caracoles									15																15
C. guardas									84																84
El Rocío (M)														34	1										35
El Rocío (P)														5											5
La Fresnera															4										4
L. Sta. Olalla							8										5								13
L. Dulce	2																						1		3
Las Gangas													2	1		5		2							10
Martinazo													5	25	2	4	5		1						42
Matasgordas				4											5	5	4	8			1	1		3	27
Orfeón	1	3																							4
Palacio					2									35	19	14	1	1	12						84
P. S. Agustín															6										6
P. S. Antón													3	3		1									7
Pino Muerto	2	2	1																						5
R. de la Bolija														2											2
Veta La Palma								28																	28
Zalagalano															4						8				12
TOTAL	5	5	1	24	2	1	8	28	99	10	3	45	85	40	10	22	20	3	8	1	1	1	3		421

Tabla XV. Lugares y número de muestras recogidas, y posteriormente analizadas, de animales salvajes del Parque Nacional de Doñana.

3.1.1.4. *Muestras procedentes del Centro de Recuperación*

Las muestras del Centro de Recuperación de la Reserva Natural de Doñana nos fueron proporcionadas por las veterinaria del Centro. Entre éstas se incluyen las 32 muestras de animales salvajes y las 100 de vacas de explotaciones ganaderas de las inmediaciones. Todas ellas fueron tomadas del recto mediante escobillón estéril, sin medio de transporte ni conservación y almacenadas a -20°C .

3.1.2. **Aislamiento de *C. difficile***

3.1.2.1. *Procesado de las muestras recogidas en el campo*

Las muestras recogidas durante los muestreos en el Parque fueron procesadas siguiendo el protocolo de “rehidratación”, explicado en el primer capítulo.

3.1.2.2. *Procesado de las muestras del Centro de Recuperación*

Para el aislamiento de *C. difficile* a partir de las muestras de heces procedentes del Centro de recuperación, se utilizaron los dos procedimientos, según el origen de la muestra:

-Las muestras de vaca procedentes de los saneamientos, fueron procesadas siguiendo el método del shock en etanol (100 muestras) detallado en el capítulo 1, para una mejor comparación con los resultados de otras explotaciones ganaderas, como los obtenidos en el estudio de la cabaña porcina.

-El resto de muestras fueron procesadas siguiendo el método alternativo de rehidratación, desarrollado en nuestro laboratorio (32 muestras), detallado en el capítulo 1.

3.1.3. **Identificación de los aislados**

Para todas las muestras, una vez crecidas las colonias en el medio de cultivo, los diferentes tipos coloniales fueron aislados en agar sangre e incubados en anaerobiosis 48h a 37°C .

A todos los aislados se les identificó macroscópicamente y microscópicamente, gracias a la tinción de Gram.

Al 77% (285) de los aislados bacilos grampositivos anaerobios (escritos y/o facultativos) y resistentes a cefoxitina y cicloserina, fueron identificados mediante tira API (rapidID 32A, bioMérieux) para anaerobios, siguiendo las instrucciones detalladas en el capítulo 2. Al resto de cepas aisladas no se les realizó la tira API debido a que sus caracteres morfológicos macro y microscópicos indicaban que eran las mismas especies que aislados a los que se le había realizado la tira API.

3.1.3.1. Confirmación de la identificación por PCR

Extracción de ADN

El ADN utilizado se extrajo mediante metodología manual (descrita en el capítulo 1), procedente de los siguientes microorganismos:

- 22 cepas de microorganismos bacilos grampositivos anaerobios, resistentes a cefoxitina y cicloserina, aisladas de heces de animales salvajes (5 de vaca, 4 de caballo, 4 de ciervo, 3 de focha, 2 de gamo, 1 de jabalí, 1 de golondrina, 1 de conejo y 1 de zorro), con perfiles bioquímicos muy diferentes (4 con buena identificación: 3 *C. clostridioforme* y 1 *C. botulinum*; 4 con buena identificación a nivel de género; 5 con perfil dudoso; 2 con identificación no válida y 7 con perfil inaceptable), para confirmar que no se trata de *C. difficile*.
- Controles positivos: Se utilizaron indistintamente dos cepas diferentes de *C. difficile*, las cepas NT77577 y NT135600, cedidas por el H.G.U. Gregorio Marañón. Ambas cepas son productoras de toxinas A y B.
- Controles negativos: Se utilizaron dos tipos de controles negativos para asegurar que no se produjeran amplificaciones inespecíficas. Para ellos se utilizaron, por un lado la cepa PS22/2 de *Clostridium sp* (no *C. difficile*) y por otro agua destilada en sustitución al ADN del microorganismo.

PCR

La reacción de PCR llevada a cabo fue de tipo múltiple. En este caso se amplificaron en la misma reacción los dos genes que codifican a las toxinas, *tcdA* y *tcdB*, respectivamente, además del gen *housekeeping tpi*. Esta reacción de PCR está basada en la diseñada por Lemee et al. (2004). Se realizaron en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, USA):

- Primers (Isogen Life Science, Maarssen, Netherlands) (Lemee et al., 2004):

tpi-F (5'-AAAGAAGCTACTAAGGGTACAAA-3')

tpi-R (5'-CATAATATTGGGTCTATTCCTAC-3')

- El producto de amplificación que se espera es de un tamaño de 230 pb.

tcdBF (5'-GGAAAAGAGAATGGTTTTATTAA-3')

tcdB-R (5'-ATCTTTAGTTATAACTTTGACATCTTT-3')

- El producto de amplificación que se espera es de un tamaño de 160 pb.

tcdA-F (5'-AGATTCCTATATTTACATGACAATAT-3')

tcdA-R (5'-GTATCAGGCATAAAGTAATATACTTT-3')

- El producto de amplificación que se espera es de un tamaño de 369 pb si la cepa es toxina A⁺ y de 110 pb si la cepa es toxina A⁻.

- La Mezcla de Reacción se compone de, para un volumen final de 25 µl:

- glicerol 10% (v/v)
- dNTP 200 µM de cada desoxinucleótido (dNTP)
- tpi-F 0'5 µM
- tpi-R 0'5 µM
- tcdA-F 1 µM
- tcdA-R 1 µM
- tcdB-F 1 µM
- tcdB-R 1 µM
- AmpliTaq Gold DNA Polimerasa (Applied Biosystems) 0.5 U
- MgCl₂ 2'5 mM
- Buffer: Tris-HCl 10 mM (pH= 8'3)
KCl 50 mM

A la que se añaden 10 µl del ADN problema.

- La Reacción de Amplificación consta de:

desnaturalización inicial, durante 3 minutos a 95°C

amplificación, durante 11 ciclos: desnaturalización, 30 seg. a 95°C
anillamiento, 30 seg. a 65°C, disminuyendo 1°C
cada ciclo
elongación, 30 seg a 72°C

amplificación, durante 29 ciclos: desnaturalización, 30 seg. a 95°C
anillamiento, 30 seg. a 55°C
elongación, 30 seg a 72°C

En todas las reacciones se incluyeron controles positivos (*C. difficile* A⁺B⁺) y negativos (agua destilada).

Los productos de amplificación se observaron tras someterlos a una electroforesis a 95V en un gel de agarosa al 1´6%. Los fragmentos de amplificación, teñidos con bromuro de etidio (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain), se observaron bajo luz UV. El tamaño de cada fragmento fue determinado por comparación con el patrón de tamaño de fragmentos génicos (*lader*) cargado en cada uno de los geles.

3.1.3.2. Identificación por secuenciación del gen ribosómico 16S

Extracción del ADN

La extracción del ADN de las muestras se realizó utilizando las dos metodologías descritas en el capítulo 1. La metodología automatizada se utilizó para el primer grupo de aislados, para los cuales sólo se secuenciaron las primeras 500 pb, y la metodología manual para los 5 aislados *Clostridium*-like a los que se secuenció el gen completo.

Los microorganismos secuenciados fueron los siguientes:

- secuenciación de los primeros 500 pares de bases del gen ribosómico 16S:
 - o 19 aislados bacilos grampositivos, anaerobios, resistentes a cefoxitina y cicloserina, procedentes de la flora fecal de individuos diferentes pertenecientes a las siguientes especies animales: caballo, jabalí, gamo, gato silvestre, perdiz y focha común. Todas infructuosamente

identificados por tiras API id32A, 18 con perfil dudoso *C. clostridioforme*, *C. septicum*, *C. acetobutylicum*, *C. histolyticum*, *C. tyrobutyricum* y *C. paraputrificum*, y 1 perfil con identificación no válida de *C. histolyticum*. Son una mínima parte de las bacterias englobadas en el capítulo 2 bajo el epíteto *Clostridium*-like.

- secuenciación del gen ribosómico completo 16S:
 - o 5 de las cepas anteriores, identificadas como *C. clostridioforme* por API, fueron elegidas para una secuenciación completa del gen que codifica para el ARN 16S.

Secuenciación

- Primers

Los primers utilizados en todos los casos son universales, para regiones conservadas del gen que codifica para el ARN ribosómico 16S presente en todas las bacterias. Concretamente se utilizaron dos parejas de primers, la primera restringe el tamaño del amplicón a unos 500 pares de bases a partir del extremo 5', una región hipervariable del gen, y la segunda se utiliza para abarcar el gen ribosómico completo.

1. E8F (5'- AGAGTTTGATCMTGGCTCAG -3')

E533R (5'-GWATTACCGCGGCKGCTG-3')

- El producto de amplificación que se espera es de un tamaño de aproximadamente 500 pb (RIDOM, <http://rdna.ridom.de>) (García et al., 2008). Estos primers fueron utilizados para la identificación del primer grupo de aislados.

2. 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')

1492R (5'-GGGTTACCTTGTTACGACTT-3'),

- El producto de amplificación que se espera es de un tamaño de aproximadamente 1500 pb, prácticamente el gen completo (Vickerman et al., 2007). Ésta fue utilizada para identificar 7 de los aislados anteriores, a fin de confirmar la identificación con un número mayor de bases.

- Secuenciación

El proceso de secuenciación del primer grupo de muestras se llevó a cabo en el HGUGM. Brevemente, se llevó a cabo una PCR del gen RNA 16S con los primers previamente mencionados. Los amplicones obtenidos fueron secuenciados mediante el método “Big Dye Terminator” y detectados mediante un secuenciador automático ABIPrism (Applied Biosystems Inc.). Las secuencias obtenidas se compararon con las almacenadas en la base de datos Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). La identificación de las especies fue definida con un 99% de similitud de secuencia (Drancourt et al., 2004).

Para el resto de muestras, junto con las 5 repetidas del primer grupo, se siguió el siguiente procedimiento. Para la mezcla de reacción se utilizaron microesferas PuReTaqTM Ready-To-GoTM PCR (GE Healthcare, UK), cada una de las cuales contiene:

- dNTP a 200 μ M
- KCl a 50 mM
- MgCl₂ a 1.5 mM
- Buffer tris-HCl a 10 mM
- 2.5 U de TaqPolimerasa.

Por cada reacción, se añadieron 4 μ l de primer 8F a 25 pmol, 4 μ l de primer 1492R a 25 pmol y 10 μ l de ADN problema. Cada reacción se llevó a un volumen final de 25 μ l con agua mili-Q estéril.

Se amplificó por PCR la casi totalidad del gen ARN 16S (~ 1500pb), en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, USA) programado como se especifica a continuación:

desnaturalización inicial, durante 3 minutos a 94°C

amplificación, durante 30 ciclos: desnaturalización, 1 minuto a 94°C
anillamiento, 1 minuto a 60°C
elongación, 1 minuto a 74°C

elongación final durante 1 a 72°C.

La amplificación se consideró correcta cuando, al observarse la electroforesis de una alícuota del producto de reacción en un gel de agarosa al 1.6%, mediante tinción con Bromuro de Etidio y bajo luz UV, se observó una banda de 1500 pb.

Los amplicones se purificaron utilizando el kit de purificación de PCR QIAquick. Para ello se añadió al producto de PCR obtenido, el buffer PBI con un volumen de 5 veces el volumen del producto de la reacción. Esta mezcla se deposita sobre la columna de purificación, que se centrifuga durante 1 minuto a 13000 rpm. Después se le añaden 750 µl de buffer PE y se centrifuga de nuevo 1 minuto a 13000 rpm. Tras colocar un recipiente limpio y estéril bajo la membrana, se le añade el volumen de agua mili-Q estéril final, que dependerá de la concentración a la que estuviera previamente el producto de amplificación, y se centrifuga nuevamente 1 minuto a 13000 rpm. Éste último paso, la dilución en agua mili-Q constituye una variación del protocolo del fabricante, por consideraciones técnicas de la secuenciación.

Los productos de amplificación purificados se secuenciaron mediante un secuenciador multicapilar "ABI Prism 3730" utilizando los mismos dos primers (8F; 1492R) que para su amplificación. De este modo el gen amplificado se secuenció desde sus dos extremos.

Las secuencias obtenidas fueron procesadas utilizando Applied Biosystems® Sequence Scanner Software v1.0; un software para la obtención del reverso y complementario (<http://www.vivo.colostate.edu/molkit/manip/>). También se utilizó el programa de GenBank para detectar identidades mediante el BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). En este caso, al estudiar la secuencia completa del gen, la similitud para poder hablar de la misma especie es del 97% (Drancourt et al., 2000).

3.1.4. Análisis estadístico

Para el análisis y comparación de los datos obtenidos se utilizó el test estadístico, para variables cualitativas, χ^2 (chi-cuadrado), con y sin corrección de Yates, aplicada en los casos de tablas 2 filas x 2 columnas. El presente test estadístico nos ayuda a certificar si existe algún tipo de relación entre las variables estudiadas. La hipótesis nula de partida que se trata de rechazar, en todos los casos, es que no existe

relación entre las variables estudiadas. El cálculo se ha realizado utilizando el programa estadístico Statgraphics Plus 5.0.

En el caso de que los datos no fueran del todo apropiados para aplicar χ^2 , que requiere que al menos el 80% de las celdas de la tabla de datos sean mayores de 5 se ha recurrido al test exacto de Fisher. Esto nos ha sucedido en el caso de los clostridios totales en base al número de muestras.

3.2. Resultados

3.2.1. Aislamiento de *C. difficile*

No se ha aislado ningún *C. difficile* a partir de las muestras procesadas. En aquellas procesadas mediante el método de “rehidratación”, es decir, aquellas recogidas en el campo y las procedentes del centro de recuperación, hubo crecimiento de otros tipos bacterianos cuya colonia era de morfología y aspecto similar a la de *C. difficile*. La observación del carácter organoléptico que hizo sospechar que no se trataba del microorganismo objeto de estudio fue la ausencia de olor a establo de caballos.

A partir de las muestras recogidas de vacas durante los saneamientos, no se aisló ningún *C. difficile* ni ningún otro tipo bacteriano debido, probablemente, a la doble selección a la que estuvieron sometidas estas muestras (shock alcohol y medio CLO).

Microscópicamente, los aislados se mostraron como cocos grampositivos, bacilos grampositivos esporulados o no esporulados, en algunos casos ramificados, y bacilos gramnegativos. De éstos, nos centramos en los bacilos grampositivos, anaerobios, esporulados, por sus características comunes con *C. difficile*. En total se obtuvieron 367 cepas que cumplían las citadas características.

Los resultados de las pruebas bioquímicas rápidas confirmaron que ninguno, excepto dos aislados procedentes de sendas muestras de *F. atra*, coincidía con los perfiles bioquímicos de *C. difficile*. Los dos aislados cuya identificación por API id32A resultó como *C. difficile*, presentaban el mismo perfil bioquímico, dónde todas las

pruebas fueron negativas excepto la presencia de Prolina Arilamidasa que resultó positiva. El porcentaje de identificación obtenido es de 69'2%, con un índice T de 0'96. Este resultado, según los estándares de apiweb (BioMeriex), corresponde a "Buena identificación en el Género", y coinciden con el perfil de alguno de los aislados encontrados en cerdos. Ambas cepas, en base a los caracteres macroscópicos, microscópicos y bioquímicos, pueden considerarse como pertenecientes a la misma especie, pero han demostrado ser anaerobias facultativas al crecer en presencia de oxígeno.

3.2.2. Confirmación por PCR

De las 22 cepas que se contrastaron por PCR para confirmar que ninguna era *C. difficile*, en ninguna se observó amplificación ni del gen *tpi*, ni de los que codifican para las toxinas. Estos resultados confirman los obtenidos mediante el método de identificación bioquímica, en el sentido de que no se trata de *C. difficile*.

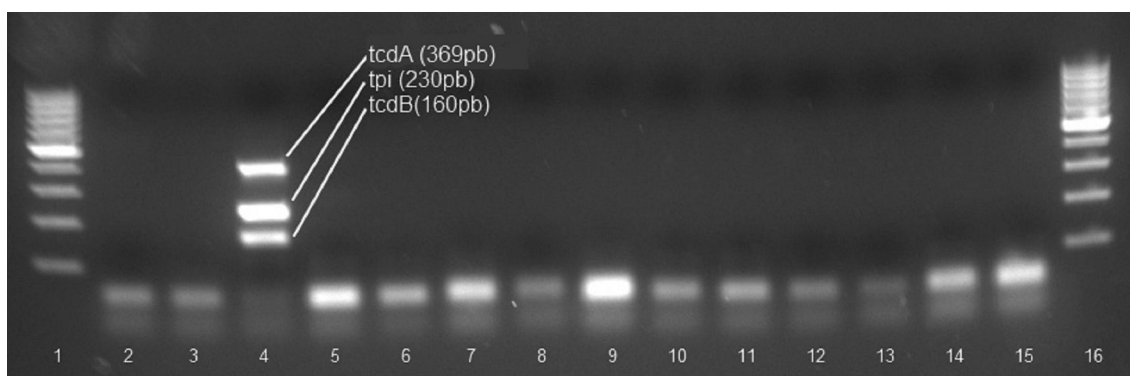


Figura 16. PCR múltiple (*tpi*, *tcdA* y *tcdB*) para la confirmación de *C. difficile* de los aislados obtenidos de Doñana. En el primer y último carril se ve el ladder. El resto son, respectivamente, el control negativo con agua destilada, el control negativo (*Clostridium sp.*), el control positivo NT135600 (el único en el que se observa amplificación: una banda de ~160 pb del fragmento del gen *tcdB*, una banda de ~230pb, del fragmento del gen *tpi* y una banda de ~369pb del fragmento del gen *tcdA* cuando presenta una mutación) y 11 muestras de ADN procedentes de aislados de Doñana.

3.2.3. Aislamientos e identificación de microorganismos

3.2.3.1. Identificación bioquímica

Como se ha referido previamente, no se ha aislado ningún *C. difficile*, pero sí otras bacterias cuyo perfil concuerda con el de los clostridios. La identificación de éstos

se llevó a cabo, como también se ha señalado en el punto anterior, mediante observación microscópica y tiras APIs id32A.

En total se aislaron 367 cepas de microorganismos con forma bacilar y reacción positiva a la tinción de Gram, provenientes de la flora fecal de la fauna salvaje y de los animales del centro de recuperación. A 285 (77%) de estas cepas se les realizó la tira API, obteniendo 79 perfiles bioquímicos diferentes compatibles con clostridios, cuyos valores están en los anexos, además de 8 perfiles compatibles con otros géneros de bacilos grampositivos como *Actinomyces sp.*, *Bifidobacterium sp.*, *Capnocytophaga sp.*, *Eggerthella sp.*, *Gemella sp.*, *Prevotella sp.*, *Propiobacterium sp* y *Veillonella sp.* Tal diversidad de resultados fue agrupada como se indica a continuación:

- ✓Especies de *Clostridium* concretas (*C. acetobutylicum*, *C. clostridioforme*, *C. botulinum*, *C. fallax* o *C. perfringens*)
- ✓Especies pertenecientes al género *Clostridium*
- ✓Especies que probablemente pertenecen al género *Clostridium* o están muy próximas (en esta categoría se incluyen la identificaciones con baja discriminación, los perfiles dudosos y las identificaciones no válidas, que denominamos en el presente trabajo como *Clostridium-like*)
- ✓Especies que no son *Clostridium*
- ✓Especies cuyo resultado es Perfil Inaceptable

Como se ha especificado en material y métodos, a las 82 cepas restantes no se les realizó la tira API porque sus características morfológicas, macroscópicas y microscópicas, indicaban que se trataban de especies sobre las que ya se había realizado la tira API.

De los 285 aislados, como puede apreciarse en el gráfico que se muestra abajo, 91 (32%) presentan un perfil inaceptable, 13 (5%) no pertenecen al género *Clostridium*, 81 (28%) están muy próximas a los clostridios catalogados en la base de datos de BioMerieux, y que se engloban en la presente tesis bajo la denominación de *Clostridium-like*, el 20 % (58 aislados) son *Clostridium sp.* Los otros 42 aislados, se han identificado como *C. acetobutylicum* (5 aislados-2%), *C. clostridioforme* (31 aislados-11%), *C. botulinum* (1 aislado-0%), *C. fallax* (1 aislado-0%), *C. perfringens* (2 aislados-1%) y *C. beijerinckii/butyricum* (2 aislados-1%).

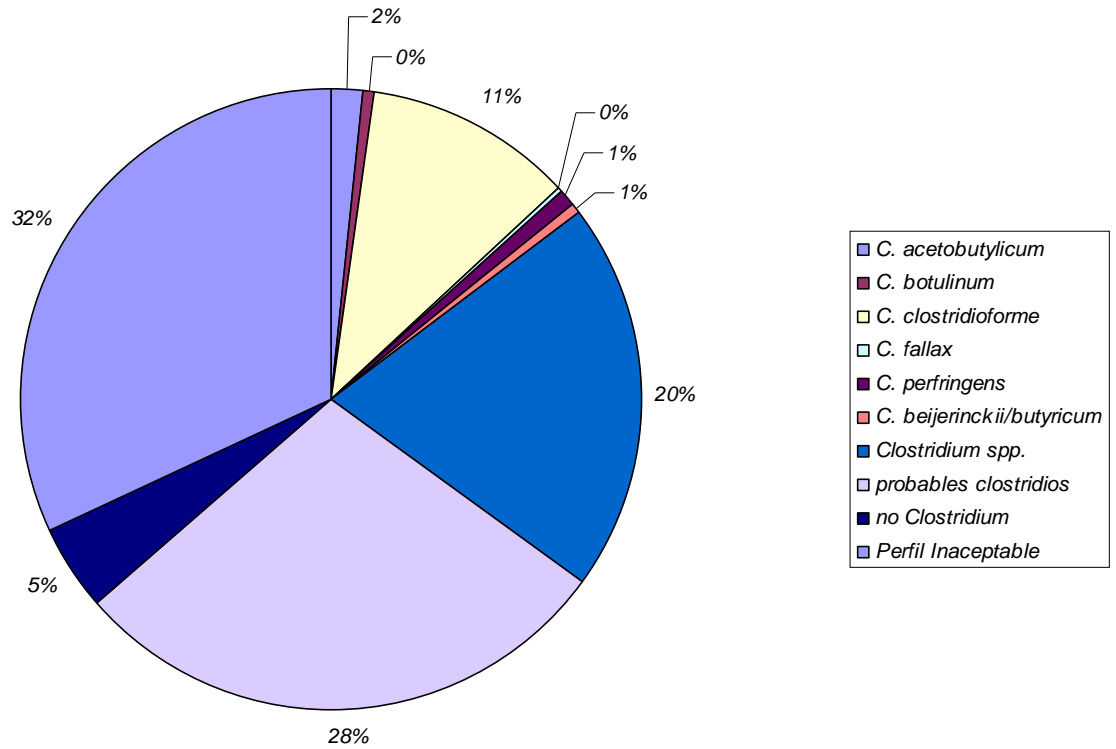


Figura 17. Representación gráfica mediante diagrama circular de los aislados bioquímicamente cercanos al género *Clostridium*.

	n	<i>C. acetobutylicum</i>	<i>C. clostridioforme</i>	<i>C. botulinum</i>	<i>C. fallax</i>	<i>C. beijerinckii/butyricum</i>	<i>C. perfringens</i>	<i>Clostridium</i> sp.	<i>Clostridium</i> -like	PI	bg+
vaca	45		5					11	13	11	47
jabalí	40	1	2					4	3	7	28
ciervo	22	1	3					5	3	4	18
gamo	20		2		1			6	12	4	30
caballo guardas	19		2					5	9	10	33
caballo retuertas	27	1	7			2		10	5	6	33
caballo Rocío	39		6	1				8	24	7	65
conejo	10	1								1	2
jineta	9							1		3	7
lince	1		1							1	2
tejón	1									1	1
nutria	1								1		1
zorro	5									3	7
meloncillo	4						1			7	8
gato	23						1		7	21	48
golondrina	2							1			1
perdiz	8		2					2	2		7
ganso	99		1					3		2	19
focha	28	1						2	2	2	8
sapo	1									1	1

Tabla XVI. Tabla que muestra los aislados totales obtenidos. La primera columna es la especie animal de la que procede la muestra. La segunda (n), indica el número de muestras analizadas. En el resto de columnas se desglosan las especies de aislados obtenidos. PI significa, aislados con perfil inaceptable. bg+, significa número total de aislados bacilos grampositivos.

Los clostridios identificados con género y especie, y de forma veraz, así como los identificados como *Clostridium sp.*, fueron aislados de las muestras procedentes de 14 especies animales: vaca, caballo, jabalí, conejo, ciervo, gamo, jineta, lince, meloncillo, gato, golondrina, perdiz, ganso y focha, con el valor absoluto que se indica en la tabla XVI y gráfico siguientes:

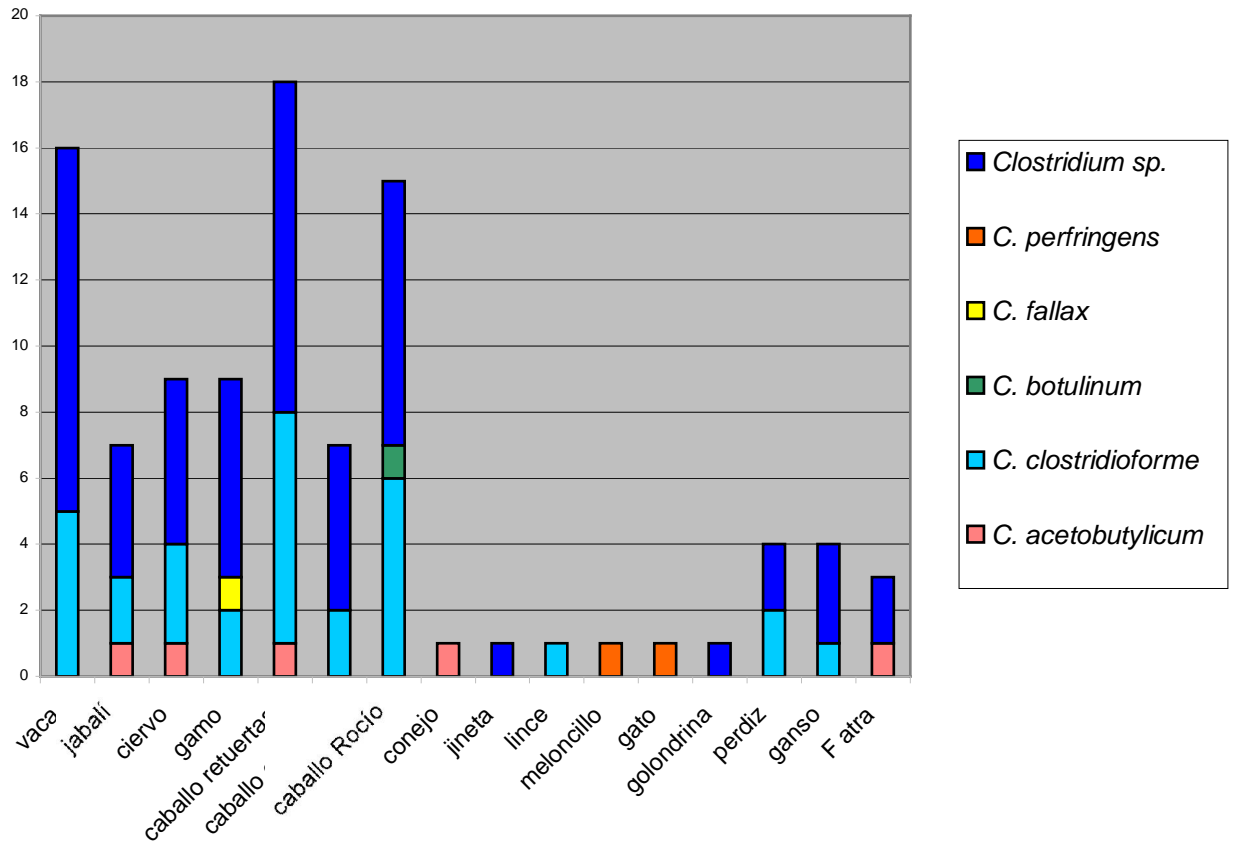


Figura 18. Número absoluto de cepas identificadas a nivel de género y especie. En el eje de abcisas se representan las especies animales muestreadas. En el eje de ordenadas aparece el número absoluto de microorganismos aislados. Cada uno de los colores del gráfico representa a una especie de clostridio, tal y como se indica en la leyenda adyacente. Por tanto, el gráfico muestra, para cada animal, el número total de aislados identificados a nivel de especie con tira API y sus respectivas especies.

Como puede observarse, en casi todas las especies animales encontramos clostridios o microorganismos muy similares bioquímicamente a éstos, lo que sugiere que el nicho que ocupan los citados microorganismos en el intestino del hospedador es muy similar y puede ser considerado beneficioso para el citado hospedador, ya que se conservan en diferentes especies animales.

3.2.3.2. Identificación por secuenciación de *Clostridium*-like

La identificación por secuenciación parcial (~ 500pb) de los 19 microorganismos aislados de muestras fecales procedentes de Doñana, denominados anteriormente como clostridium-like, confirmó que no se trataban de *Clostridium* sp.

animal de procedencia	número de cepas	identificación por secuenciación ADN ribosómico 16S
caballo	7	<i>Paenibacillus amylolyticus/ barcinonensis/pabuli</i> *
perdiz	1	
gamo	3	
gato salvaje	2	<i>Lactobacillus animalis/murinus</i>
gamo	1	<i>Bacillus benzoevorans</i>
focha común	1	
caballo	1	<i>Paenibacillus xylanilyticus/illinoisensis</i> *
caballo	1	<i>Lactococcus lactis</i>
caballo	1	<i>Weissella soli</i>
jabalí	1	<i>Bacillus circulans</i>

Tabla XVII. Organismos identificados mediante secuenciación del gen ribosómico 16S. * secuencia gen completo

Paenibacillus amylolyticus, *P. barcinonensis* y *P. pabuli* son indistinguibles en base a la secuencia de las 500 primeras bases del gen ribosómico. Lo mismo ocurre con *Paenibacillus xylanilyticus* y *P. illinoisensis* y con *Lactobacillus animalis* y *L. murinus*. Por tanto, éste fue el criterio de elección de las cinco cepas procedentes de caballo para secuenciar el gen ribosómico 16S completo, intentar diferenciar entre *P. amylolyticus*, *P. barcinonensis* y *P. pabuli* (4 cepas) o entre *P. xylanilyticus* y *P. illinoisensis* (1 cepa).

Con tres de las cepas *P. amylolyticus/barcinonensis/pabuli*, los resultados obtenidos fueron inconclusos, es decir, la secuencia final obtenida fue una secuencia parcial del gen, por lo que en ninguno de los tres casos se pudo diferenciar la especie.

Con las otras dos cepas, la secuenciación obtenida fue casi completa, lo que permitió una identificación concluyente:

- cepa *P. amylolyticus/barcinonensis/pabuli*:

la secuencia obtenida del gen ARN 16S tiene una longitud de 1409 pb. Tras el análisis mediante el BLAST resultó una homología del 99% con *Paenibacillus barcinonensis* cepa JSC_SF93 16S (DQ870733.1) con una cobertura del 99% y una similitud del 99%. Además muestra una similitud del 98% con *P. amylolyticus* cepa PCL1756 (DQ313379.1) y del 97% con *P. pabuli* (DQ412046.1). Como la mayor similitud es con *P. barcelonensis*, se determina que esa es la identidad de la cepa estudiada.

- cepa *P. xylanilyticus/illinoisensis*:

la secuencia obtenida tiene una longitud de 1430 pb. El análisis con el BLAST mostró una homología del 99% con el gen ribosómico completo de *Paenibacillus xylanilyticus* cepa XIL14 (AY427832.1), con una cobertura del 98%. La siguiente coincidencia es del 98% con *P. illinoisensis* (AB073192.1). Como la mayor coincidencia es con *P. xylanilyticus*, se concluye que ésta es la especie de la cepa estudiada.

3.2.3.3. Estudio de las prevalencias

El cálculo de las prevalencias se realizó en base a la identificación bioquímica, debido a que mediante secuenciación se identificaron pocos aislados. La prevalencia de cada uno de los microorganismos identificados con género y especie del género *Clostridium* aislados en el presente trabajo, para cada uno de los animales estudiados en base al número de muestras analizadas, se muestra en la tabla XVIII y figura 19. Para la construcción tanto de la tabla como de la figura, hay que señalar que sólo se han tenido en cuenta aquellos animales para los que se ha obtenido algún aislado perteneciente al género *Clostridium*. Del mismo modo se ha eliminado el aislado obtenido del linco, por proceder de una única muestra y no ser representativo en un análisis estadístico de los datos.

	<i>Clostridium sp.</i>	<i>C. acetobutylicum</i>	<i>C. clostridioforme</i>	<i>C. botulinu</i>	<i>C. fallax</i>	<i>C. perfringens</i>	<i>C. Beijerinckii/ butyricum</i>
vaca	0'355			0'111			
caballo guardas	0'37			0'11			
jabalí	0'175	0'025		0'05			
conejo	0'1	0'1					
ciervo	0'409	0'455		0'136			
gamo	0'45			0'1	0'05		
golondrina	0'5						
caballo retuertas	0'74	0'04		0'26			0'07
caballo Rocío	0'385			0'154	0'027		
jineta	0'111						
perdiz	0'5			0'25			
meloncillo	0'25					0'25	
focha	0'107	0'036					
gato	0'043					0'043	
ganso	0'04			0'01			

Tabla XVIII. Prevalencias de los microorganismos identificados como *Clostridium sp.*, y de aquellos identificados a nivel de género y especie. Los datos están calculados en tanto por 1. Como en casos anteriores.

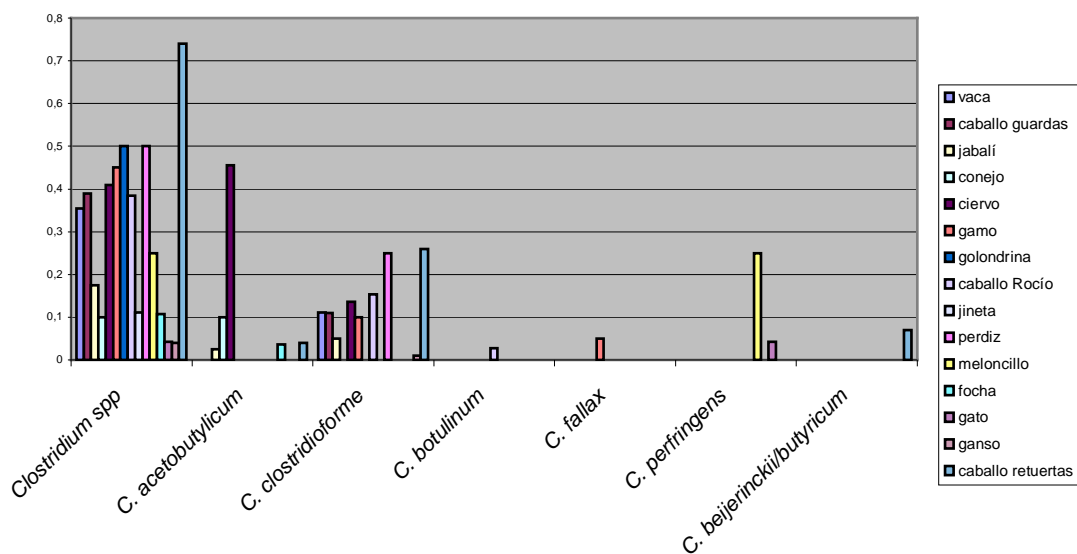


Figura 19. Figura que muestra las prevalencias de la tabla XVIII, agrupadas por especie bacteriana y animal de procedencia. En ella se puede comparar las diferentes prevalencias de estos microorganismos según el animal de origen. La leyenda adjunta, indica el color de las barras que hace referencia a cada especie animal.

Por tanto, los ciervos presentan las mayores tasas de *C. acetobutylicum*, seguido de los conejos. Por otra parte, los caballos de retuertas muestran los mayores valores para *C. clostridioforme* (0'26%), seguido por las perdices (0'25%). El siguiente grupo

con mayor prevalencia, es el de los caballos del área de El Rocío (0'15%). Para *C. perfringens*, el valor más alto lo observamos en el meloncillo (0'25%).

En *Clostridium sp.*, la prevalencia observada es bastante alta oscilando entre 0'1 y 0'5 para casi todos los animales, exceptuando a la población del caballo de retuertas, donde la prevalencia es del 74% y las poblaciones de gatos y gansos, con valores de 4'3 y 4%, respectivamente.

Además se han hallado otras especies como *C. perfringens*, *C. botulinum* y *C. fallax*, representantes patógenos del género *Clostridium*. También se han aislado algunos representantes de la especie *C. beijerinckii/butyricum*.

3.2.3.4. Estudio estadístico de los resultados

Pese al escaso número de aislados obtenidos de cada especie de microorganismos, se ha realizado un estudio estadístico comparativo para analizar si existía alguna relación entre las especies animales y los microorganismos del género *Clostridium* hallados en su materia fecal.

Usando como referencia el número total de aislados obtenidos frente a aquellos *Clostridium sp* (incluyendo todas las bacterias identificadas a nivel de especie como pertenecientes al género *Clostridium*).

$$\chi^2 = 53'8, \text{ con } 19 \text{ grados de libertad, y un p-valor} = 0,$$

por lo que se puede rechazar la hipótesis nula con un 99% de confianza. El resultado indica que existe alguna clase de relación entre la especie animal y los clostridios totales aislados.

Utilizando como referencia el número de muestras recogidas sobre las que se ha aislado, o no, *Clostridium sp.*:

$$\chi^2 = 94'19, \text{ con } 19 \text{ grados de libertad, y un p-valor} = 0,$$

por lo que podemos rechazar la hipótesis nula al 99% de confianza. Este resultado coincide con el obtenido mediante la aproximación anterior, por lo que se puede afirmar

que existe relación entre la presencia de *Clostridium sp* y la especie animal de la que procede la muestra. Aún así, y en ambos casos, tal y como indica el propio programa estadístico, hay que valorar estos resultados con prudencia debido a que hay valores menores de 5.

3.2.3.5. Perfiles bioquímicos

Como se ha mencionado con anterioridad es este mismo apartado, se han aislado 79 perfiles bioquímicos diferentes, compatibles en diferente grado cada uno de ellos con los perfiles bioquímicos de los clostridios. Para valorar la importancia de esta diversidad, que se desglosa en los anexos, se ha calculado el número de cepas diferentes por especie animal, hallando a continuación el ratio promedio de cepas para cada perfil bioquímico.

	cepas totales "clostridios"	cepas bioquímicamente diferentes	ratio cepas T/cepas bioquímicas
vaca	29	15	1'933
caballo guardas	16	13	1'231
caballo retuertas	25	14	1'786
jabalí	10	9	1'111
conejo	1	1	1
ciervo	12	12	1
gamo	21	16	1'312
golondrina	1	1	1
caballo Rocío	39	25	1'56
jineta	1	1	1
perdiz	6	5	1'2
lince	1	1	1
nutria	1	1	1
meloncillo	1	1	1
focha	5	4	1'25
gato	8	7	1'143
ganso	4	4	1

Tabla XIX. Cepas totales "clostridios", es el número total de aislados que tras ser analizados bioquímicamente con tiras API32A son compatibles en alguna medida con el género *Clostridium*, es decir, se agrupan las bacterias *Clostridium sp* (especie específicas y a nivel de género) más las denominadas *Clostridium-like*. Cepas bioquímicamente diferentes hace referencia a las cepas con perfil bioquímico diferente aisladas. Ratio cepas T/cepas bioquímicas, es el cociente entre las cepas totales de "clostridios" y los diferentes fenotipos bioquímicos.

Se compara el número de cepas bioquímicamente diferentes observadas con el número de fenotipos bioquímicos diferentes encontradas en total, para cada especie. La hipótesis nula de partida es que no existe relación entre el número de cepas bioquímicamente diferentes y la especie animal en la que se han encontrado. El resultado obtenido es:

$$\chi^2 = 118,7, \text{ con } 16 \text{ grados de libertad, y un p-valor} = 0,$$

por lo que podemos rechazar la hipótesis nula al 99% de confianza.

3.2.3.6. Resultados en mamíferos

En concreto, las proporciones obtenidas en mamíferos, en base al total de bacilos anaerobios grampositivos aislados en cada caso, fueron las siguientes:

%	C. <i>acetobutylicum</i>	C. <i>clostridioforme</i>	C. <i>botulinum</i>	C. <i>fallax</i>	C. <i>perfringens</i>	C. <i>beijerinckii</i> <i>/butyricum</i>	<i>Clostridium</i> sp.	Clo- like	PI	Act.	Bif.	Egg.	Gem.	Prev.	Prop.	Vei	?
vaca		11					23	28	23	2		2					11
jabalí	4	7					14	11	24	7	4		4				25
ciervo	6	17					27	17	22								11
gamo		7		3			20	40	13								17
caballo	1	15	1			2	23	38	23		1		1	1		1	24
carnívoros		2			3		2	11	47	2						2	31

Tabla XX. Valores de los aislados obtenidos dentro de la clase *Mammalia*, expresados en porcentajes. Clo-like: *Clostridium*-like, PI: perfil inaceptable, Act: *Actinomyces* sp, Bif: *Bifidobacterium* sp., Egg: *Eggerthella* sp., Gem: *Gemella* sp., Prev: *Prevotella* sp., Prop: *Propionibacterium* sp., Vei: *Veillonella* sp. ?: no se le ha realizado la tira API.

Como se puede observar en la tabla, sólo se han calculado las proporciones de aquellos grupos en los que el número de aislados obtenidos e identificados fue lo suficientemente numeroso como para que el porcentaje tuviera sentido. Para ello se ha elegido como criterio umbral que el número de aislados totales fuera mayor de 10, y que hubiesen sido identificados bioquímicamente más del 50% de las cepas diferentes obtenidas. Por esta razón, y debido a que pertenecen a la misma especie, los datos de caballos se han agrupado, aunque se estudiarán por separado en el apartado siguiente (1.2.4). Así mismo, para no dejar de valorar los aislados obtenidos de carnívoros, un grupo de animales muy importante en el mantenimiento del ecosistema del Parque Nacional, los datos de éstos se han agrupado en su Clase (jineta, lince, nutria,

meloncillo y gato) debido al reducido número de muestras recogidas, entre otras razones, por el escaso número de estos animales dentro del Parque.

Como indican los resultados, y en base a los organismos identificados, *Clostridium clostridioforme* se ha aislado de todos los grupos de mamíferos estudiados. En total se han encontrado 27 aislados de este microorganismo en los 6 grupos de animales. El siguiente microorganismos encontrado, por orden de abundancia absoluta, es *C. acetobutylicum*, con 3 aislados, aunque encontrados sólo en 3 especies animales (jabalíes, ciervos y caballos).

En un intento de dar coherencia al análisis estadístico realizado en el apartado anterior, se repitió analizando sólo los datos de los aislados procedentes de mamíferos, para ver si se seguía observando la relación entre las variables. Para ello, se eligieron los grupos de animales en los que el número total de *Clostridium sp.* obtenidos fue mayor de 5 aislados. El análisis se limitó a comparar los aislados procedentes de vaca, jabalí, ciervo, gamo, y las tres poblaciones de caballos. La hipótesis nula de partida es que no existe relación entre el número de *Clostridium sp.* y el animal en el que se han aislado.

Analizando la diferencia en base a las observaciones por número total de aislados, el resultado es

$$\chi^2 = 18,7, \text{ con 6 grados de libertad, y un p-valor} = 0,004,$$

por lo que podemos rechazar la hipótesis nula al 95% de confianza.

Analizando la diferencia en base a las observaciones por número total de muestras analizadas, el resultado es:

$$\chi^2 = 11,86, \text{ con 6 grados de libertad, y un p-valor} = 0,065,$$

por lo que también se puede rechazar que no hay relación al 90% de confianza.

Debido a que *C. clostridioforme* fue el microorganismo aislado con mayor prevalencia, se estudió si existía alguna relación entre el aislamiento de *C. clostridioforme* y la especie animal de la cual se ha obtenido. Por cuestiones matemáticas de representatividad, nos limitamos a estudiar las muestras de vacas y

caballos. La hipótesis nula es que no existe relación entre el aislamiento de esta especie y el animal.

Para ello, primero comparamos en estas dos especies animales si sigue existiendo relación en cuanto al número total de clostridios aislados y la especie animal, estudiando sólo los resultados en estas dos especies.

El análisis en base al número de aislados, da un resultado de:

$$\chi^2 = 0, \text{ con 1 grados de libertad, y un p-valor} = 0,94,$$

por lo que no se puede rechazar la hipótesis nula de que no hay relación entre la especie animal y la presencia de *Clostridium sp.*

El análisis en base al número de aislados, da un resultado de:

$$\chi^2 = 0,14, \text{ con 1 grados de libertad, y un p-valor} = 0,71,$$

por lo que no podemos rechazar la hipótesis nula, indicando que no hay ningún tipo de relación entre las variables.

El análisis en base al número de muestras indica que se no puede aceptar la existencia de una relación entre la especie animal y los microorganismos. Pese a ello, se analizan los datos para determinar si existe relación entre *C. clostridioforme* y el animal, vaca o caballo, del que ha sido aislado. La hipótesis nula es que no existe tal relación.

En base al número de aislados,

$$\chi^2 = 0, \text{ con 1 grado de libertad, y un p-valor} = 1,$$

por lo que no se puede rechazar la hipótesis nula.

En base al número de muestras estudiadas,

$$\chi^2 = 0, \text{ con 1 grado de libertad y un p-valor de 1,}$$

por lo que tampoco podemos rechazar la hipótesis nula.

De este modo, no se puede establecer ninguna relación entre la mayor o menor presencia de *C. clostridioforme* y la especie animal, vaca o caballo en este caso, estudiada. Esto significa que no existen diferencias significativas entre el número de *C. clostridioforme* aislados en caballos y los aislados en vaca. Sin embargo, sería necesario ampliar este estudio con otros animales en los que se pueda encontrar a este microorganismo.

3.2.4. Análisis de los resultados según la localización de las muestras

Para analizar el resultado en base a las localizaciones, con el objetivo de estudiar si el lugar de recogida de la muestra influye en la cantidad de clostridios aislados se han resumido los resultados de todos los perfiles bioquímicos en la tabla XXI.

	n	<i>C. acetobutylicum</i>	<i>C. botulinum</i>	<i>C. clostridioforme</i>	<i>C. fallax</i>	<i>C. perfringens</i>	<i>C. beijerinckii/</i> <i>butyricum</i>	<i>clostridium</i> sp	clo-like
Las Gangas	10						1 (50%)	1	
Caño Martinazo	42	2		8	1		2	14 (35%)	
Palacio	83			9				18 (33'3%)	
Pinar S. Antón	7			1				1 (20%)	
Rincón de la Bolija	2			1					
Pinar S. Agustín	6							2 (100%)	
La Frenera	4	1						1 (50%)	
Zaragalano	10			1				2 (66'6%)	
Matasgordas	27			2					
El Rocío	35		1	6				6 (20'7%)	
Laguna Sta. Olalla	13	1		3				5 (41'7%)	
El Rocío (pueblo)	5							2 (18'2%)	
Laguna Dulce	3								
Veta La Palma	3							1	
Veta La Palma	28	1						2 (40%)	
Casa de los Guardias	84			1				2	
Caracoles	15							1	
Pino muerto	8								
Centro Recuperación	32					2			
Cañada de las aves	13							7	
Laguna Orfeón	4								
?	2								

Tabla XXI. Tabla en la que se especifican el número total de aislados a partir de las muestras recogidas de los animales en una localización determinada de Doñana. n indica el número total de muestras analizadas de cada localización. ? localización desconocida.

Para estudiar si las diferencias en valores absolutos de *Clostridium* sp. observadas tienen significación estadística, las prevalencias de este género según la localización fueron analizadas mediante el test estadístico de la χ^2 . Para ello, no se han tenido en cuenta las 20 muestras de milano, de las que no se ha aislado ningún microorganismo, y al no conocerse la localización exacta de todas ellas, el resultado

podría llevar a error. Además, se han excluido todas las localizaciones en las que no se aislaron bacterias de las heces procedentes de las mismas. La hipótesis nula es que no existe relación entre el lugar en el que se han tomado las muestras y los microorganismos encontrados en ellas.

En base a las observaciones según el número total de aislados para cada localización:

$$\chi^2 = 43'25, \text{ con 15 grados de libertad, y un p-valor} = 0'0001,$$

por lo que podemos rechazar la hipótesis nula al 99% de confianza.

En base a las observaciones según el número total de muestras recogidas en cada lugar:

$$\chi^2 = 76'61, \text{ con 15 grados de libertad, y un p-valor} = 0,$$

por lo que podemos rechazar la hipótesis nula al 99% de confianza.

En ambos casos hay que tener en cuenta que muchas de las observaciones eran escasas (menos de 5) para confiar plenamente en el test estadístico.

Para aportar una mayor robustez al análisis estadístico, se han eliminado del mismo aquellas localizaciones en las que se aislaron menos de 5 microorganismos diferentes pertenecientes al género *Clostridium*, limitando el análisis a las zonas del Caño de Martinazo, Palacio, El Rocío (la zona de la marisma) y la Laguna de Sta. Olalla. En estas zonas el porcentaje de *Clostridium sp.* totales, respecto al número total de aislados es, respectivamente: 47'37%; 27'9%; 26'5% y 60%. Lo que resulta:

En base a las observaciones según el número total de aislados para cada localización:

$$\chi^2 = 11'71, \text{ con 3 grados de libertad, y un p-valor} = 0'0085,$$

por lo que podemos rechazar la hipótesis nula al 99% de confianza.

En base a las observaciones según el número total de muestras recogidas en cada lugar:

$$\chi^2 = 15,85, \text{ con 3 grados de libertad, y un p-valor} = 0,012,$$

por lo que podemos rechazar la hipótesis nula al 95% de confianza.

Con estos datos, podemos reafirmarnos en la idea de que hay cierta relación entre los *Clostridium sp.* aislados y el lugar de donde se recogió la muestra.

Así mismo, como en la mayoría de los lugares en los que se recogieron muestras se aislaron *C. clostridioforme*, se estudió estadísticamente si este hallazgo era dependiente del lugar de recogida de la muestra.

En base a las observaciones según el número total de aislados para cada localización:

$$\chi^2 = 9,31, \text{ con 8 grados de libertad, y un p-valor} = 0,31,$$

por lo que no podemos rechazar la hipótesis nula.

En base a las observaciones según el número total de muestras recogidas en cada lugar:

$$\chi^2 = 18,68, \text{ con 8 grados de libertad, y un p-valor} = 0,016,$$

por lo que podemos rechazar la hipótesis nula al 95% de confianza.

Estos valores indican que existe cierta relación entre el lugar de recogida de la muestra y la existencia en ella de *C. clostridioforme*, aunque hay que tomar tal aseveración con cierta precaución debido a que el valor matemático de las muestras en muchos casos era menor de 5 y el resultado del primero de los dos análisis nos impide rechazar la hipótesis nula.

3.2.5. Comparación de los resultados obtenidos en las tres poblaciones de caballos estudiadas

En nuestros estudios podemos distinguir claramente tres poblaciones de caballos, la raza de caballos salvajes que habitan Doñana, denominados caballos de retuertas, los caballos propiedad de los guardas, que viven en el Parque y los que pastan en las marismas cerca del Rocío, que son propiedad de los habitantes de esta población. Los datos desglosados obtenidos a partir de las tres poblaciones son los que se pueden ver en la tabla (XXII). Como se observa, la única especie de microorganismo que aparece en la flora fecal de las tres poblaciones es *C. clostridioforme*.

número aislados	n	A	C	B	Bo	F	P	<i>Clostridium</i> <i>sp.</i>	Clo like	PI	Bif	Gem	Prev	Vei	?
caballos retuertas	27	1	7	2				10	5	6				1	1
caballos Guarda	19		2					5	9	10		1			38
caballos Rocío	39		6		1			8	24	7	1		1		17

Tabla XXII. Microorganismos aislados en caballos. n: número de muestras analizadas. A: *C. acetobutylicum*; B: *C. beijerinckii/butyricum*; Bo: *C. botulinum*; C: *C. clostridioforme*; F: *C. fallax*; P: *C. perfringens*; Bif: *Bifidobacterium* sp., Egg: *Eggerthella* sp., Gem: *Gemella* sp., Prev: *Prevotella* sp., Vei: *Veillonella* sp. PI: Perfil Inaceptable; ?: API no realizada.

Al analizar los 43 perfiles bioquímicos diferentes obtenidos sólo para el caso de los caballos, coincidentes en mayor o menor grado con especies del género *Clostridium* (*Clostridium sp.* y *Clostridium-like*), no se observa ninguna coincidencia entre las tres poblaciones. Sin embargo, entre los microorganismos de la población de caballos de los guardas y del Rocío coinciden en tres perfiles bioquímicos (C11, C17 y C21) y entre los aislados de la población de caballos de retuertas y los del Rocío coinciden seis perfiles (A2, A7, A17, B4, C1 y C6). Por el contrario, entre los caballos de los guardas y los de retuertas, no hay ninguna coincidencia.

	A2	A4	A7	A12	A14	A15	A16	A17	A20	B1	B3	B4	B5	B7	B10	B11	B12	Bo2	C1	C3	C5	C6
caballo retuertas	1		1					1	1			2			1	1	1		1	2	1	2
caballo guardas		1								1	1		1	1								
caballo Rocío	1		1	1	1	1	1	2				2							1	2		1
total equinos	2	1	2	1	1	1	1	3	1	1	1	4	1	1	1	1	1	1	3	2	1	3

	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C15	C17	C18	C19	C21	C23	C24	C25	C26	C27	C29	H2	H4	F2	Pa1	PI	b g+	
caballo retuertas							9										1						6	15
caballo guardas	1	1			4			1			1		1					1	1				10	5
caballo Rocío			3	1	6	1		1	1	2	2	2		2	1	1				1	1	7	14	
total equinos	1	1	3	1	10	1	9	2	1	2	3	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	23	34	

Tabla XXIII. Listado de los diferentes perfiles bioquímicos obtenidos en las cepas aisladas de las poblaciones de caballos. Leyenda: A: *C. acetobutylicum*; B: *C. beijerinckii*; Bo: *C. botulinum*; C: *C. clostridioforme*; H: *C. hystolyticum*; F: *C. fallax*; Pa: *C. paraputrificum*; PI: Perfil Inaceptable; bg+: bacilo grampositivo. Los números indican el número de perfil bioquímico asignados ordinalmente por el investigador, para una fácil identificación. Los colores indican el grado de identificación del microorganismo en base al id calculado y al índice T, así **rosa** es muy buena identificación de la especie, **granate** es buena identificación de la especie, **azul** es buena identificación en el género, **marrón** es baja discriminación, **amarillo** es perfil dudoso, **verde** es identificación no válida. Caballos domésticos hace referencia a las muestras procedentes de El Rocío y caballos salvajes a las recogidas dentro de Parque.

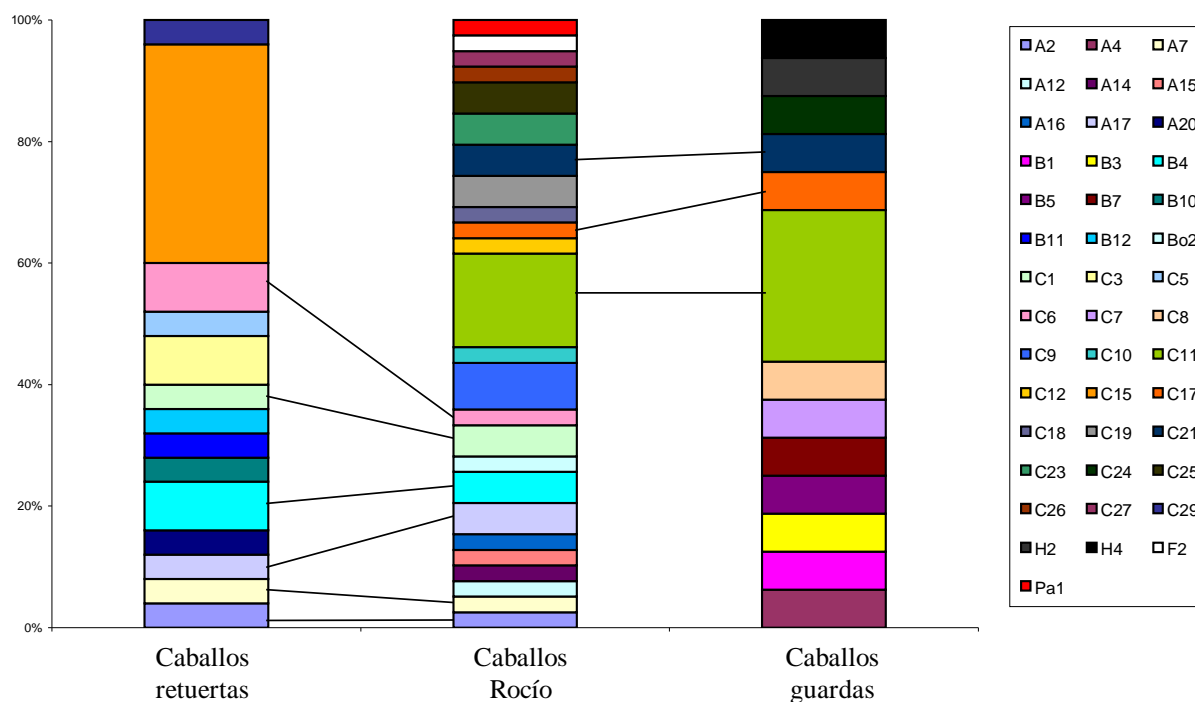


Figura 20. Diagrama de barras (porcentual) que compara los perfiles bioquímicos encontrados en las tres poblaciones de caballos estudiadas: de retuertas, de los guardas y de El Rocío. Las líneas que unen las columnas indican cuales son los perfiles bioquímicos compartidos entre los grupos.

Para calcular si hay diferencias significativas entre los clostridios aislados de las dos poblaciones se han analizado los resultados obtenidos mediante el test de la χ^2 , con corrección de Yates si procede. La hipótesis nula, como ya se ha especificado, es que no hay relación entre las variables, es decir, que la población de la que provienen los caballos no tiene importancia en cuanto al número de *Clostridium sp.* encontramos en su flora intestinal.

En base al número total de aislados en los caballos:

$$\chi^2 = 16.54, \text{ con 2 grados de libertad, y un p-valor} = 0.0003,$$

por lo que se puede rechazar la hipótesis nula al 99% de confianza.

En base al número total de muestras de caballo estudiadas:

$$\chi^2 = 9.62, \text{ con 2 grados de libertad, y un p-valor} = 0.0081,$$

por lo que podemos rechazar la hipótesis nula al 99% de confianza.

Estos datos indican que existe una relación entre el número de *Clostridium sp.* aislados y la población de caballos de la que se han aislado. Para determinar si las diferencias se dan entre todas las poblaciones, los valores obtenidos se han comparado dos a dos:

- caballos de retuertas vs. caballos de los guardas:

En base al número total de aislados en los caballos:

$$\chi^2 = 9.03, \text{ con 1 grado de libertad, y un p-valor} = 0.002,$$

por lo que se puede rechazar la hipótesis nula al 99% de confianza.

En base al número total de muestras de caballo estudiadas:

$$\chi^2 = 4.93, \text{ con 1 grado de libertad, y un p-valor} = 0.02,$$

por lo que podemos rechazar la hipótesis nula al 95% de confianza.

- caballos de los guardas vs. caballos del Rocío:

En base al número total de aislados en los caballos:

$$\chi^2 = 0, \text{ con 1 grado de libertad, y un p-valor} = 1,$$

por lo que no se puede rechazar la hipótesis nula.

En base al número total de muestras de caballo estudiadas:

$$\chi^2 = 0, \text{ con 1 grado de libertad, y un p-valor} = 1,$$

por lo que no podemos rechazar la hipótesis nula.

- caballos de retuertas vs. caballos del Rocío:

En base al número total de aislados en los caballos:

$$\chi^2 = 11,84, \text{ con 1 grado de libertad, y un p-valor} = 0,0006,$$

por lo que se puede rechazar la hipótesis nula al 99% de confianza.

En base al número total de muestras de caballo estudiadas:

$$\chi^2 = 6,76, \text{ con 1 grado de libertad, y un p-valor} = 0,009,$$

por lo que podemos rechazar la hipótesis nula al 99% de confianza.

Este análisis separado de los resultados obtenidos indica que el número de *Clostridium sp.* aislados en la flora fecal de la población de caballos de retuertas es significativamente mayor que el número de estos microorganismos identificados en las otras dos poblaciones.

3.3. Discusión de los resultados

3.3.1. *Clostridium difficile*

Para estudiar la presencia de *C. difficile* en la fauna salvaje española, se recurrió al estudio de la flora intestinal de las especies animales que habitan una de las zonas

protegidas de la península ibérica, como es el Parque Nacional de Doñana y su entorno. En Doñana se muestrearon las heces de muchas de las especies animales que habitan el Parque. Para analizar los resultados obtenidos hay que tener en cuenta diversos factores como las características de los animales o los diferentes procedimientos utilizados en el estudio.

El resumen de los resultados del muestreo realizado durante la campaña de saneamiento de las vacas de explotaciones ganaderas vecinas es: no presencia de *C. difficile* en estos animales. Teniendo en cuenta la edad de los animales muestreados, todos ellos adultos, el resultado concuerda con los datos obtenidos en ganado porcino en la presente tesis, y comentados en el capítulo anterior, dónde no se ha encontrado este microorganismo en animales mayores de 7 días. Además, es coherente con los resultados obtenidos hasta el momento en ganado, y de los cuales tenemos noticia (Songer et al., 2000; Keel y Songer, 2006; Rodriguez-Palacios et al., 2006; Avbersek et al., 2009). De esos resultados, volvemos a destacar el trabajo en vacuno de Rodriguez-Palacios et al. (2006) quienes, como ya se ha señalado, estudian la relación de este microorganismo con la edad de las vacas muestreadas.

El resto de muestras analizadas proceden del muestreo en el campo. En ellas tampoco se ha aislado *C. difficile*. El significado de este resultado debe analizarse tras una discusión breve del método utilizado y la elección de este nuevo método. Por ello a continuación analizaremos algunas características en las que difieren las muestras estudiadas con uno y otro método:

- En primer lugar, el tipo de muestra estudiada. Las muestras de cerdos y vacas, procedentes en ambos casos de explotaciones ganaderas, fueron recogidas directamente del recto de los animales muestreados. Las muestras procedentes del resto de fauna salvaje proceden de heces que han estado en contacto con el medio externo.
- En el estudio de la presencia de *C. difficile* en ambas ganaderías, porcino y vacuno, uno de los objetivos principales era determinar su estado sanitario. Por ello, y a fin de comparar los resultados obtenidos, se hizo necesario utilizar la misma metodología, homogeneizándolos de este modo.

- La población porcina estudiada presentaba la sintomatología propia de la diarrea neonatal porcina. La fauna salvaje no presentaba ningún signo ni síntoma apreciable: ni diarreas ni síntomas prodrómicos, como apatía (Weary et al., 2009). Si el agente causal de la diarrea era *C. difficile* se asume que tendrían un mayor número de unidades formadoras de colonias de este microorganismo. Es preciso recordar además que para el diagnóstico de esta patología se recomienda el análisis de heces líquidas o semisólidas (Delmée, 2001).

Por los argumentos recién esgrimidos, junto con las conclusiones obtenidas en el capítulo 1, sobre la conveniencia de los diferentes métodos para la recuperación de *C. difficile*, y a la luz de los resultados obtenidos, se puede afirmar que *C. difficile* no está presente en la flora fecal de ninguna de las 26 especies animales muestreadas, habitantes del ecosistema de Doñana. Estos resultados discrepan ligeramente con los encontrados en la bibliografía, donde existen ejemplos de aislamientos de este microorganismo del tracto digestivo de animales salvajes, como la foca de Weddells (McBee, 1960), en la década de los 60. Los ejemplos posteriores de aislamientos de este microorganismo en animales que no son de renta se circunscriben a muestras procedentes de clínicas veterinarias, de laboratorios o de zoológicos (Stevenson, 1966; Dabard et al., 1979; Borriello et al., 1983; Orchard et al., 1983; Jones, 1989; Riley et al., 1991; Perk et al., 1993; Weese et al., 2001a; 2001b; Baverud, 2004). En uno de los trabajos realizados en animales de zoológico encontraron *C. difficile* en los animales enfermos, pero no en muestras de animales sanos del mismo y otros zoológicos (Bojesen et al., 2006).

Los 22 aislados que fueron sometidos a una PCR múltiple, confirmaron que efectivamente no eran *C. difficile*, debido a la ausencia de los genes específicos de la bacteria que se trataron de amplificar: *tcdA*, *tcdB* y *tpi* (Lemee et al., 2004). *tcdA* y *tcdB*, son los genes que codifican para la toxina A y para la toxina B (I.4.1.2.) de *C. difficile*, respectivamente. Las toxinas no han sido descritas en ningún otro microorganismo hasta la fecha, por lo que la presencia de estos dos genes confirmaría que se trata de *C. difficile*. Sin embargo, la existencia de cepas de *C. difficile* negativas para ambas toxina, A y B (capítulo 2, Shin et al., 2009), hace necesario incluir en la reacción de amplificación otro gen complementario, presente en todas las cepas de *C. difficile*. En este caso el gen elegido fue el gen *housekeeping tpi*, que codifica para la proteína

triosafosfatisomerasa, una proteína estructural de *C. difficile*. El término *housekeeping* hace referencia a la necesidad implícita del organismo de poseer ese gen para su supervivencia. La reacción podía haberse simplificado buscando sólo la presencia del gen estructural, pero en caso de que las cepas hubieran sido positivas, se hubiera obtenido información adicional sobre su toxigenicidad y toxinotipo (Capítulo 2; Rupnik et al., 1998).

Como ha podido observarse en los resultados, la identificación bioquímica concuerda con la confirmación mediante biología molecular posterior.

Por tanto, hasta la fecha, el único caso de aislamiento de *C. difficile* a partir de muestras fecales de un mamífero que vive en libertad, sin sintomatología, ocurrió en 1960, en una foca del antártico (McBee, 1960). A partir muestras de heces de aves y mamíferos marinos de la antártida, sólo aísla microorganismos anaerobios, todos pertenecientes al género *Clostridium*. En el mismo artículo explican la posibilidad de que la flora fecal de estos mamíferos sea reducida debido a que las focas se alimentan de una especie de calamar, el cual se alimenta a su vez de algas que sintetizan antibióticos. Por lo tanto, la presencia de *C. difficile* en estos animales podría estar ligada al consumo de sustancias antibióticas naturales.

Como hemos visto, el resto de animales salvajes proceden de lugares en los que se presupone una gran interacción con el ser humano, incluyendo la población de langostas del desierto, de la que se aísla *C. difficile* (Stevenson, 1966). Ésta se compone de animales de laboratorio, es decir, son artrópodos criados en cautividad.

También se suelen citar como salvajes los *C. difficile* aislados con los que Hafiz desarrolló su tesis obtenidos de caballos, burros y camellos de Afganistán. Por un lado, no se especifica que estos animales fueran salvajes y, por otro, en la descripción de los mismos en su trabajo de tesis apunta que desprenden un olor a dulce fruta madura. Ateniéndonos a este dato es plausible dudar de que fueran *C. difficile*, ya que el olor característico de estos microorganismos es más similar al de un establo de caballo, aunque el resto de características que menciona coinciden con la descripción del microorganismo realizada por Hall y O'Tool (1935).

Otros aislamientos en “animales salvajes” que se suelen esgrimir para reforzar la idea de que *C. difficile* puede encontrarse en la fauna salvaje, son los aislados por Borriello et al. (1983) que, además de en animales domésticos, encuentra *C. difficile* en heces de un ganso y de un pato, los cuales no se especifica si eran mascotas o no, pero se sobreentiende por el contexto. Un poco después, Levett (1986) menciona haber encontrado a este microorganismo en heces de serpiente, sin más especificaciones.

Si unimos estos dos hechos: el no aislamiento de *C. difficile* en los animales muestreados en Doñana, y en que en prácticamente todos los casos de aislamientos en fauna salvaje de la bibliografía, incluido el de la foca de Weddells, hay un contacto directo con sustancias antibióticas, parece que en fauna salvaje este microorganismo sólo se encontraría tras una disrupción previa de la flora intestinal, fundamentalmente por antibióticos. Lo cual, estaría en concordancia con la patogenia del microorganismo descrita en la introducción de la presente tesis. Para asegurarnos de este hecho tendríamos que demostrar que efectivamente ninguna sustancia antibiótica cruza el umbral del Parque Nacional de Doñana. Esto nos induce a considerar a *C. difficile* como una bacteria de la civilización, debido a que la gran mayoría de los casos probados de infección por esta bacteria se han producido en un contexto con gran presencia del ser humano y el modo de vida industrializado actual.

En un análisis más detallado de las causas de la ausencia de *C. difficile* en la fauna de Doñana hay que tener presentes otros dos factores, como son la edad y la salud de los animales. La edad se destaca como un factor fundamental en la prevalencia de este microorganismo, como ya se ha adelantado en el estudio de *C. difficile* en ganado porcino, en el de la ganadería de vacas y en la bibliografía (Songer et al., 2000; Keel y Songer, 2006; Rodríguez-Palacios et al., 2006; Avbersek et al., 2009). La edad de los animales muestreados en Doñana no fue determinada, en la mayoría de las ocasiones debido al método de recogida de las mismas, indicado en el punto 3.1.1.3. del presente capítulo. Sin embargo, la observación de las poblaciones muestreadas indicó que los individuos eran en su mayoría adultos: jóvenes y maduros. Como excepción, cabe resaltar que una de las muestras recogidas en caballos del pueblo de El Rocío si pertenecía a un potro, a partir de la cual no se aisló *C. difficile*. Por tanto, la causa de la ausencia de *C. difficile* podría deberse a que los animales son mayores para excretar *C. difficile* en elevadas proporciones, asumiendo que sea un microorganismo normal de la

flora intestinal, como apuntaban algunos autores (Borriello y Honour, 1981; Songer, 1996), argumento que se discutirá a continuación.

Con respecto a la salud de los animales, ninguno de los animales presentaba síntomas de diarrea o algún signo externo que indicase enfermedad, como apatía (Weary et al., 2009), tal y como se ha destacado anteriormente. Esta inexistencia de sintomatología asociada también podría explicar la ausencia de *C. difficile* en heces, ya que este microorganismo se asocia con cuadros de diarrea: asociada a antibióticos en el hombre, espontánea como se ha observado en hámsters y otros roedores, o con otra sintomatología como hepatitis en avestruces (Shivaprasad, 2003). Los individuos sin sintomatología podrían no excretarlo en suficiente cantidad como para detectarlo, o como ya se ha apuntado y más tarde se desarrollará, el microorganismo podría no ser habitante del tracto intestinal.

Otro punto a tener en cuenta para explicar la ausencia del microorganismo en estos animales podría ser la latitud de Doñana, sobre todo una vez analizados los resultados en ganado porcino. Como veíamos en el capítulo anterior, existen diferencias significativas entre la prevalencia de *C. difficile* dependiendo de la región geográfica en la que se encontraban los animales a muestrear. Como las tres regiones muestreadas están situadas a tres latitudes diferentes, se puede extrapolar que al encontrarse Doñana a una latitud de 37° Norte, es posible que esto implique que no haya *C. difficile*. Sin embargo, como ya se mencionó en el capítulo anterior, existen referencias bibliográficas que desmienten esta hipótesis (Cave et al., 2002; Magdesian et al., 2002; Simango, 2006).

Otro factor que podría influir, como se explicó en el capítulo dedicado al ganado porcino (Capítulo 2), es la época del año en la que se realizó el muestreo, porque como ya se ha mencionado, existen autores que refieren que el aislamiento de *C. difficile* podría estar determinado por la época del año (Norman et al., 2009), siendo mayor en los meses fríos. En este sentido, debido a que el muestreo dentro del Parque se llevó a cabo en diferentes fechas, en el transcurso de las cuatro estaciones del año, no creemos que pueda ser un sesgo que explicara el no aislamiento de *C. difficile*.

Hay que tener en cuenta que en este trabajo, la hipótesis de partida es que *C. difficile* no es un microorganismo frecuente o abundante en la flora intestinal normal de la fauna salvaje de Doñana, como no lo es de la flora normal humana (Barbut y Petit, 2001, Kuiper y Tüll, 2006; Baverud, 2002). Esta hipótesis es contrastable y rechazable mediante el aislamiento del microorganismo. Ya que incluso considerando a *C. difficile* un microorganismo fastidioso de aislar, pertenece a ese 20-40% de especies intestinales cultivables (Walk y Young, 2008). Por tanto, y aplicando el principio de la parsimonia o “navaja de Ockham”, la explicación más sencilla de las propuestas es la que acepta nuestra hipótesis de partida, debido a que en ninguna de las 553 muestras estudiadas procedentes de Doñana se ha encontrado este microorganismo.

Aunque la ausencia de evidencia no es evidencia, sí se puede afirmar que los resultados obtenidos no han podido refutar nuestra hipótesis de partida de que *C. difficile* no es un habitante habitual de la flora fecal de los animales salvajes.

Podría argumentarse que el método de recuperación ha influido en la no recuperación, pese a que los estudios previos (Borriello y Honour, 1981; Marler et al., 1992; Freeman y Wilcox, 2003) no indican que pueda perjudicar al aislamiento, sino que indican lo contrario. Además hay que incidir de nuevo en que de las muestras procedentes de vaca, sometidas al shock en etanol, tampoco se recuperó ningún *C. difficile*.

Por otro lado, si se busca una explicación aún más sencilla acerca de cómo es posible que *C. difficile* esté presente en ciertos animales en ciertos momentos, se puede recurrir a la sentencia: “*Alles is overal: maar het milieu selecteert*” (*Everything in everywhere: but the environment selects; Todo está en todos los lugares: pero el ambiente selecciona*) de los holandeses Baas-Becking y Beijerinckii, propugnada en la primera mitad del siglo XX (Quispel, 1998). Mediante este axioma se asegura que cualquier microorganismo puede estar presente en cualquier hábitat, si éste está provisto de las condiciones necesarias para el crecimiento de dicho organismo. Para el caso concreto de *C. difficile*, las condiciones adecuadas son anaerobiosis, ausencia de competencia y nutrientes en abundancia, por lo que, en teoría, cualquier intestino descolonizado podría ser el hábitat ideal de *C. difficile*. En estas circunstancias, si la bacteria llegase a ese hábitat, crecería salvo si esas son las mismas circunstancias que

necesitan otros microorganismos que ya estaban allí “esperando” previamente. Congruentemente con esta línea de pensamiento, no sería raro encontrar cualquier microorganismo, incluso el tan esquivo *C. difficile*, creciendo en ambientes que no constituyen su nicho, o en lugares como el intestino de los animales.

Como se ha razonado, existen diferentes hipótesis que podrían ofrecer una explicación sobre la presencia del microorganismo en “nuevos hábitats”. En contraposición a estos argumentos, tenemos el dato de que *C. difficile* no es un organismo habitual de la flora normal de los animales estudiados, lo que junto con la bibliografía que explica el posible carácter zoonótico de *C. difficile* (Borriello et al., 1983; Songer, 2004; Rodríguez-Palacios et al., 2006; Keel et al., 2007a; Pirs et al., 2008; Rupnik, 2007; Jhung et al., 2008; Indra et al., 2009; Songer et al., 2009), nos permite esbozar el ciclo de vida del microorganismo, seguros de que la fauna salvaje no está implicada en su dispersión o es un reservorio de la enfermedad. El ciclo quedaría como se representa a continuación:

Clostridium difficile

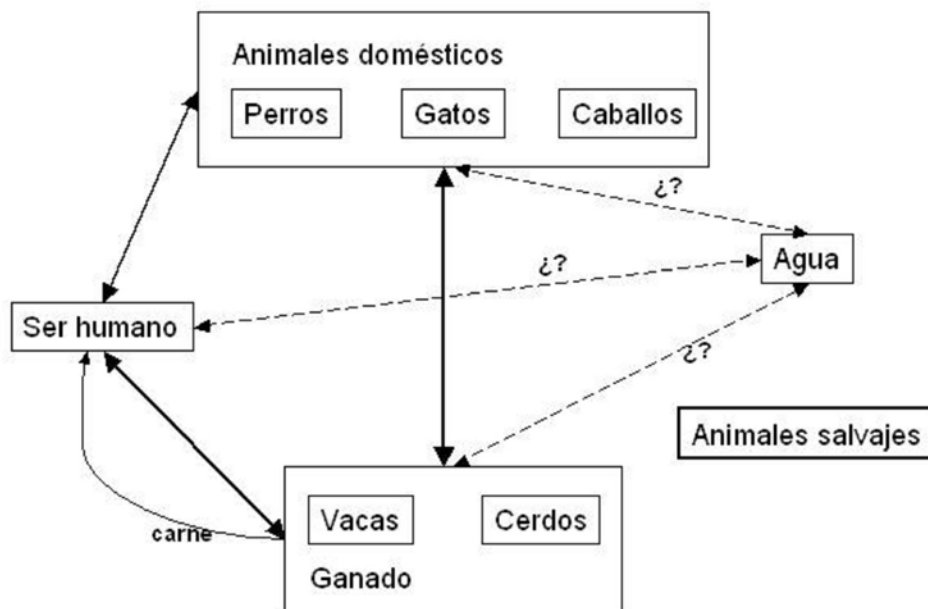


Figura 21. Ciclo vital de *C. difficile*. Las flechas con línea continua indican la trasmisión de los microorganismos entre las especies. Las líneas discontinuas, una probable transmisión. La ausencia de líneas, la ausencia de trasmisión del microorganismo.

Al observar gráficamente todos los personajes implicados en la patología y dispersión de *C. difficile*, claramente se observa que el microorganismo ésta en ambientes o animales con gran contacto con el ser humano. De hecho, He et al., (2010) afirman que debió de producirse un cambio en la interrelación microorganismo-hospedador de *C. difficile*, hace tres décadas, que contribuyó a que el microorganismo evolucionase hacia una potenciación de la virulencia. Los datos obtenidos en este trabajo y presentados en el capítulo anterior (capítulo 2), muestran que también existen cepas que han perdido virulencia. Por otro lado, se ha demostrado reiteradamente la importancia de las circunstancias ecológicas intestinales en el desarrollo de la infección por *C. difficile* (Walk y Young, 2008), que podrían concurrir en los mamíferos que interaccionan en mayor medida y que son los mismos que comparten la susceptibilidad a ser portadores de *C. difficile*.

3.3.2. *Clostridium-like*

Analizando la ausencia de *C. difficile* en la fauna salvaje, hay que resaltar la presencia de multitud de especies microbianas diferentes con caracteres fenotípicos muy similares a los de esta bacteria. Entre estas características, es preciso destacar la capacidad de estos microorganismos para crecer en el medio selectivo para *C. difficile*. El ejemplo más significativo son los dos aislados procedentes de dos fochas (*Fulica atra*) diferentes. Estos aislados presentaban similar aspecto macroscópico, excepto que no desprendían olor, al microscopio óptico eran bacilos grampositivos y las pruebas bioquímicas (identificación= 69,2%; T=0,96; “Buena identificación en el Género”) indicaban una alta probabilidad de que se tratara de *C. difficile*. Este hecho se refuerza con que algunas cepas de *C. difficile* provenientes del ganado porcino presentaban el mismo perfil bioquímico. Sin embargo, los dos aislados de focha no poseían una característica fundamental de esta especie, el tipo de respiración: no eran anaerobios estrictos.

De hecho, todas las especies bacterianas que se han aislado en este contexto eran capaces de crecer en el medio selectivo para *C. difficile*, es decir, son resistentes a cefoxitina y cicloserina, ya que fueron aisladas en este medio. Como se ha visto en el apartado de resultados, muchas eran bacilos grampositivos. Por pruebas bioquímicas, estos aislados se identificaron en su mayoría como *Clostridium sp.*, de diferentes

especies (*C. acetobutylicum*, *C. clostridioforme*, *C. botulinum*, *C. fallax* y *C. perfringens*), aunque como después analizaremos, muchos con perfiles dudosos o identificación no válida.

Detallando más los microorganismos encontrados, observamos que en casi todas las especies animales muestreadas encontramos a los denominados “*Clostridium-like*”, a clostridios o a ambos. Estos microorganismos parecen compartir bastantes características fenotípicas, lo que es consecuente con el hecho de que su nicho es el mismo. Esta idea es coherente con los estudios de la microbiota intestinal que indican que muchas funciones de los microorganismos que habitan el mismo son redundantes (Ley et al., 2006). De este modo es lógico encontrar microorganismos que hayan convergido evolutivamente* al vivir durante millones de años en un hábitat tan específico como el tracto intestinal. Incluso se considera favorable para el funcionamiento correcto del intestino que las bacterias que lo pueblan no sean especialistas, sino que muestren variabilidad metabólica, de modo que ninguna especie sea una “especie clave”* (keystone specie).

Como puede observarse, en casi todas las especies animales encontramos clostridios o microorganismos muy similares bioquímicamente a éstos, lo que sugiere que el nicho que ocupan los citados microorganismos en el intestino del hospedador es muy similar y puede ser considerado beneficioso para el citado hospedador, ya que se conservan en diferentes especies animales. Incluso se podría hipotetizar que muchas de las especies aisladas están ocupando el nicho que en otras especies, como el ser humano, ocupa *C. difficile*.

Aunque no se ha determinado el nombre de todos los microorganismos aislados, presumiblemente todos forman parte del *phylum Firmicutes*. Este grupo se ha demostrado muy presente en la flora intestinal de todos los animales estudiados hasta el momento (Bäckhed et al., 2005; Ley et al., 2008b).

* Convergencia evolutiva: mecanismo evolutivo mediante el cual dos organismos lejanos filogenéticamente muestran características fenotípicas similares debido a que han estado sometidos a las mismas presiones ambientales durante mucho tiempo. Uno de los ejemplos típicos, que proviene del mundo animal, es la comparación de las alas de las aves con las de los murciélagos.

* Especie clave: especie de ser vivo imprescindible para el funcionamiento de un ecosistema y cuya desaparición causaría la desaparición de todo el ecosistema.

Entre las especies identificadas mediante pruebas bioquímicas, encontramos diferentes prevalencias, tomando todas las muestras en conjunto. Así, el microorganismo con mayor prevalencia es *C. clostridioforme*, aproximadamente un 13%. Los datos sugieren que este microorganismo es un habitante habitual del tracto intestinal de los animales, lo que coincide con los resultados del estudio de la flora de otras especies, como los humanos, en los que se considera comensal (Ohkusa et al., 2009). En medicina humana han sido aislados a partir de muestras clínicas de tejidos blandos y sangre (Alexander et al., 1995).

Estudiando los valores obtenidos, podemos afirmar que los ciervos presentan las mayores tasas de *C. acetobutylicum*, seguido de los conejos. Respecto a *C. clostridioforme*, la mayor prevalencia se encuentra en la población de caballos de retuertas (0'26%), seguido por la tasa hallada en perdices, aunque debido al bajo número de muestras analizadas (8) hay que observar el dato con la debida cautela. El siguiente grupo con mayor prevalencia, es el de los caballos del área de El Rocío, donde alcanza un 0'15%.

Para *C. perfringens*, el valor más alto lo observamos en el meloncillo, pero pese al alto número de aislados, el bajo número de muestras analizadas (4) nos exhorta a mantener prudencia en el momento de analizar los datos, aunque tan alta prevalencia podría tener sentido en el contexto de que se trata de un animal carnívoro, que se alimentará posiblemente de cadáveres colonizados por este microorganismo.

En *Clostridium sp*, la prevalencia observada es bastante alta oscilando entre 0'1 y 0'5 para casi todos los animales, aunque en la población del caballo de retuertas, la prevalencia total alcanza casi el 75%. Esto es consecuente con el hecho de que las bacterias pertenecientes a los Firmicutes, son uno de los grupos más representados en la flora intestinal (Rajilić-Stojanović et al., 2007; Ley et al., 2008b). En este contexto, es importante señalar que en gansos, pese al amplio número de muestras analizadas, la prevalencia es baja, lo que puede indicar que en estas aves, los clostridios resistentes a cefoxitina y cicloserina no son un grupo importante en su flora, un dato reseñable debido al carácter migratorio del ganso.

Hay que resaltar además, que de todos los valores de prevalencia expuestos, los más preocupantes son los que hacen referencia a *C. perfringens*, *C. botulinum* y *C. fallax*, por ser las bacterias más patógenas encontradas, y entre estos tres microorganismos, el segundo tendría más importancia por haberse aislado de caballos de un área urbana, en contacto con el ser humano.

3.3.2.1. Análisis estadístico

En base a las prevalencias encontradas, el análisis estadístico muestra que existe cierta relación entre el número de microorganismos encontrados en cada hospedador, y la especie de éste. Tras sumar las prevalencias para cada especie, se observa que el género *Clostridium* está muy presente. La mayor presencia la hallamos entre los caballos de retuertas con una prevalencia del 74%. A éstos le siguen las perdices (50%), los gamos (45%) y los ciervos (41%) (tabla XVIII). La menor prevalencia la encontramos en el ganso (5%) Las diferencias intrínsecas entre las especies animales, e incluso las poblaciones, que pueden contribuir a las diferentes proporciones de especies de *Clostridium* como componente de su flora normal son variados, principalmente:

- diferencias histológicas o estructurales del tracto intestinal.
- diferencias bioquímicas, como diferencias en los receptores de anclaje de los microorganismos o en el glucocalix de la mucosa intestinal.
- diferencias etológicas (alimentación o hábitat). Las diferencias en cuanto a la alimentación son las más estudiadas en adultos, habiéndose observado diferencias en la composición microbiana según la dieta (Mackie et al., 1999; Blanco et al., 2007). Recientemente se ha observado que las bacterias intestinales de los humanos japoneses presentan enzimas para digerir las algas que éstos utilizan en la cocina, y que otras microbiotas humanas no presentan (Hehemann et al., 2010).

Entre las 19 especies animales estudiadas, encontramos mamíferos, aves y anfibios. Dentro de estas tres clases, se han estudiado animales pertenecientes a diferentes órdenes y familias. Por ejemplo, entre los mamíferos encontramos animales

herbívoros, carnívoros y omnívoros. Diferentes comunidades bacterianas en cada uno de los hospedadores es consecuente con estudios previos sobre la flora intestinal de diversos animales (Rajilić-Stojanović et al., 2007; Walk y Young, 2008), donde se observa que los grandes grupos de microorganismos como los *phyla* se mantienen, mostrando en cambio una gran variabilidad a nivel de especie.

3.3.2.2. *Perfiles bioquímicos*

El número total de perfiles bioquímicos observados en los bacilos grampositivos resistentes a cefoxitina y cicloserina aislados asciende a 79. Además, se puede aumentar con el perfil PI, donde se engloban a todos aquellos microorganismos etiquetados como perfil indeterminado. Si sólo se tuviera en cuenta la bioquímica y la definición morfológica o fenotípica de especie, se podría hablar de 79 especies diferentes. Sin embargo, aunque las capacidades metabólicas de los microorganismos son fundamentales para identificarlas, hay que tener presente que dentro de cada especie existe cierta variabilidad. Igualmente, diferentes especies pueden presentar las mismas capacidades metabólicas.

El estudio de la diversidad metabólica o bioquímica de los microorganismos de la microflora es importante porque es fundamental en la relación de ésta con el hospedador. De hecho, una de las presiones selectivas que determinan la presencia o ausencia de ciertos microorganismos son los requerimientos metabólicos del hospedador, que muchas veces son satisfechos gracias a las enzimas microbianas (Hehemann et al., 2010). Para ver la importancia de los diferentes perfiles bioquímicos en este caso, se calculó el ratio número total de aislados / número total de cepas bioquímicas, para cada especie animal muestreada. Como puede verse en la tabla de resultados (tabla XIX), el ratio en casi todos los casos está próximo a 1. Esto indica que casi cada uno de los aislados estudiados presenta un perfil bioquímico diferente. A priori, tal observación parece chocar con la redundancia metabólica propia de la flora intestinal (Turnbaugh et al., 2007; Ley et al., 2008a), pero si se analiza en detalle la confirma. En algunos casos, los perfiles bioquímicos difieren solamente en una de las pruebas bioquímicas. Por tanto, todos los microorganismos son diferentes entre sí, pero la comunidad microbiana presenta redundancia funcional, lo que indica una gran plasticidad del metabolismo microbiano, e indirectamente, redundancia en el

microbioma del hospedador (Turnbaugh et al., 2007). Adicionalmente, se ha de considerar que el conjunto de microorganismos estudiados se reduce a un pequeño grupo que en líneas generales es muy similar.

Estadísticamente se ha observado que existe algún tipo de relación entre el número de cepas bioquímicamente diferentes para cada hospedador y el citado hospedador en el que éstas se han encontrado. La explicación, en este caso, es consecuente con la observación anterior de que el número de Clostridios de la flora también depende del animal estudiado, ya que volvemos a encontrarnos con las diferencias implícitas de cada especie animal, mencionadas anteriormente, que repercuten en la composición de la microbiota. A priori, podría ser un factor clave la alimentación del animal y la flora de los alimentos que consumen, puesto que la capacidad metabólica global del intestino puede condicionar los nutrientes que el animal puede incorporar y los microorganismos exógenos pueden aportar genes novedosos por transferencia horizontal de genes (Hehemann et al., 2010).

3.3.2.3. Clase mamíferos

Debido a que la mayoría de los animales estudiados pertenecen a la clase *Mammalia*, nos centramos en la interpretación de los resultados obtenidos a partir de las muestras de estos animales. Como se explicó en el apartado de resultados, todos los carnívoros se agruparon para su estudio.

Como se ha observado, de todos los grupos de mamíferos se ha aislado algún Clostridio, excepto en las liebres y perros. El más común es *C. clostridioforme*, hallado en 5 especies animales, seguido de *C. acetobutylicum*, en 4. La diferencia en abundancia es de 28 *C. clostridioforme* frente a 4 *C. acetobutylicum*. También se han encontrado algunas especies patógenas “estrictas” como *C. perfringens*, *C. fallas* o *C. botulinum*. Además, el número de microorganismos identificados como *Clostridium sp.* asciende a 83 aislados, cifra ligeramente inferior que la del número de *Clostridium-like* encontrados.

Para el análisis estadístico, por consideraciones matemáticas, sólo se tuvo en cuenta a aquellos mamíferos para los que se habían aislado más de 5 microorganismos,

por lo que se excluyó al grupo de carnívoros del análisis. El resultado obtenido arroja un resultado contradictorio sobre la existencia de relación entre el número total de *Clostridium sp.* aislados y la especie animal. La discrepancia se produce porque estudiando las observaciones en base al número total de aislados, la diferencia es significativa mientras que en base al número de muestras analizadas, no lo es. Aún así, se aprecian grandes diferencias en la proporción, encontrando la mayor en ciervos (50%) y la menor en la población de caballos de los guardas (21%). Analizando estos dos grupos extremos, esta diferencia significativa puede deberse a que animales diferentes presentan características implícitas específicas ya mencionadas como, por ejemplo, la alimentación. Sin embargo, en este caso el hábitat no tendría que ser un factor muy determinante, pues las muestras de ciervo fueron recogidas de diversos entornos dentro del Parque, aunque por otra parte el hábitat determina la alimentación del animal.

Este resultado coincide con el obtenido cuando se estudiaron los clostridios aislados en todos los animales muestreados. Como en este caso el análisis se ha centrado en los mamíferos, excluyendo a carnívoros, podemos ver que las diferencias que determinan la diferente proporción de clostridios siguen existiendo aunque los animales sean más próximos evolutivamente o tengan hábitos alimenticios similares.

Restringiendo el análisis a los datos obtenidos a partir de las muestras de dos especies animales, por representatividad matemática, vacas y caballos, se analizó si el número de *C. clostridioforme* también estaba relacionado con la especie animal muestreada. En este caso, el resultado claramente indica que no existe ninguna relación entre el número de *C. clostridioforme* aislado y la especie animal. La no diferencia es explicable si se considera que *C. clostridioforme* es un habitante habitual del intestino de mamíferos y aves (Ohakusa et al., 2009).

3.3.2.4. *Relación con el hábitat exacto del animal*

Según los resultados, las diferentes zonas en las que se recogieron muestras parecen presentar, asimismo, cierta relación con el número de clostridios aislados en ellas. Lo que indica que en cada hábitat predomina una especie de microorganismo en la flora de los animales que lo habitan. Este resultado, aislado, puede inducir la idea de que

los microorganismos encontrados son fruto de contaminaciones, es decir, son microorganismos ambientales. Sin embargo, la relación entre los microorganismos y la especie animal estudiada, desmiente esta hipótesis de las contaminaciones, reforzando la idea de que en cada zona habita preferentemente una especie animal con su flora intestinal particular.

Cuando el análisis se limita a las zonas de Caño de Martinazo, Palacio, El Rocío y la Laguna de Santa Olalla, también se observan diferencias significativas que indican una relación entre el número de *Clostridium* sp. aislados y la localización. Como se ve en los porcentajes, la proporción es mayor en las muestras recogidas cerca de la Laguna de Santa Olalla (60%) y menor en las de El Rocío (27%). Al estudiar específicamente la posible relación para *C. clostridioforme*, para estos cuatro puntos, el resultado ha sido indeterminante. En base al número de aislados, sí podríamos aceptar la existencia de una relación, pero en base al número de muestras, no.

Para analizar a qué se deben las diferencias halladas para las diferentes localizaciones, hay que tener en cuenta muy diversos factores:

- Abióticos
 - o presencia de agua: Según las observaciones realizadas, *Clostridium* se aísla preferentemente en animales que habitan cerca de lugares donde el agua es permanente, como las lagunas.
 - o localización geográfica (latitud): no se sostiene debido a que la zona de Palacio se encuentra más cerca de la Laguna de Santa Olalla que de la zona de El Rocío, con la que coincide sin diferencias significativas en porcentaje de clostridios.
- Bióticos
 - o poblaciones animales: Las poblaciones animales que habitan en cada una de estas zonas es ligeramente diferente. Por ejemplo, muchas de las muestras de caballos se recogieron en las inmediaciones del Palacio o Martinazo.

- interrelaciones
 - alimentación (comunidad vegetal): Diferente composición de la vegetación, base de la alimentación de la mayoría de los animales muestreados. Según Sousa (1998), la vegetación depende del nivel de humedad, predominando el llamado monte blanco en las zonas con menor humedad edáfica y monte negro en las zonas con mayor grado de humedad. La hipótesis de la importancia de la alimentación en la composición de la microbiota en los adultos ha sido ampliamente estudiada (Mackie et al., 1999; Blanco et al., 2007).
 - humanos: La presencia humana puede suponer una presión selectiva a tener en cuenta, ya que los clostridios aislados son resistentes a cefoxitina y cicloserina. La selección de las poblaciones resistentes a antibióticos sólo es posible en presencia de éstos, si no es una característica intrínseca de la especie microbiana. Sin embargo, las dos zonas con mayor presencia humana son las zonas con el valor medio de presencia de estos clostridios. Una de estas zonas son las inmediaciones de El Rocío, un núcleo urbano. La otra zona es la de las inmediaciones de El Palacio, que es el lugar en el que viven los guardas y los investigadores dentro del Parque.

3.3.2.5. *Equus caballus*

Entre los caballos estudiados podemos distinguir tres poblaciones diferenciadas: los caballos de retuertas, los caballos de los guardas de la reserva y caballos domésticos de El Rocío. Esto nos ha permitido terminar el análisis comparativo, estudiando las diferencias entre tres poblaciones de una misma especie animal, pero que habitan lugares diferentes, con una etología también diferente. Estos tres grupos son:

- a) los caballos de retuertas, la raza de caballos salvaje de Doñana, genéticamente diferenciada (Vega-Pla et al., 2006);

- b) los caballos de los guardas del Parque, un grupo de caballos domésticos utilizados para los desplazamientos dentro de Doñana, que viven estabulados cerca de la zona de Palacio;
- c) y por último los caballos de El Rocío, que son propiedad privada pero pastan en las marismas que limitan con el núcleo urbano.

Los resultados arrojan algunas observaciones interesantes:

- En las tres poblaciones de caballos se han aislado microorganismo del género *Clostridium*.

- La única especie común, entre las identificadas, es *C. clostridioforme*. Además, sólo en la población de équidos de El Rocío se ha aislado un patógeno estricto, *C. botulinum*.

- Entre los microorganismos aislados de la población de caballos de retuertas se han observado 14 perfiles bioquímicos diferentes. En los microorganismos encontrados en la población de caballos del Rocío se encontraron 25 perfiles diferentes y en los de los guardas 13. No hay ningún perfil bioquímico igual para los microorganismo de la flora intestinal de las tres poblaciones. Sin embargo, en el conjunto de perfiles bioquímicos hallados en la flora de la población de El Rocío se muestran tres coincidencias con perfiles encontrados en la microbiota de los caballos de los guardas, y seis coincidencias con perfiles de los microorganismos aislados de los caballos de retuertas. Ninguna coincidencia exacta se ha observado entre los caballos de los guardas y los de retuertas.

- El análisis estadístico muestra que existen diferencias entre el número de aislados pertenecientes al género *Clostridium* entre las tres poblaciones (p -valor $<0,01$). En el análisis por parejas, se evidencia que la población con un significativamente mayor número de *Clostridium sp.* era la de los caballos de retuertas.

El conjunto de estas observación muestra que la diversidad de microorganismos es mayor en los animales de El Rocío. En esta diversidad se consideran tanto la riqueza (número de componentes diferentes) como la abundancia relativa (número de individuos

relativo). Respecto a la riqueza, como puede observarse, el mayor número de perfiles bioquímicos encontrados ha sido en la población de caballos de El Rocío. La existencia de patrones de microorganismos diferentes en el conjunto de estas poblaciones equinas, se corresponde con datos previos en los que se muestran diferencias a nivel prácticamente individual (Rajilić-Stojanović et al., 2007; Walk y Young, 2008).

En lo que concierne a la abundancia relativa, el porcentaje de clostridios aislados, como se ha comentado anteriormente, es significativamente mayor en los caballos de retuertas (60,6%) frente al 21 y 23% de los caballos de los guardas y de El Rocío, respectivamente. Esto confirma la importancia genética de la población para determinar la composición de la flora intestinal, pues la población de caballos de retuertas se ha mantenido aislada en el tiempo y es genéticamente diferente (Vega-Pla et al., 2006).

Pero los datos, así mismo, también muestran la fuerte influencia del hábitat de cada animal. Cada población equina habita en una zona diferente. Los caballos de retuertas suelen encontrarse preferentemente en la zona de caño de Martinazo, donde la proporción de clostridios fue del 47%, mayor que en la zona de Palacio (donde se encuentran los caballos de los guardas) o de El Rocío, donde las proporciones fueron del 28 y 27 % respectivamente. Por tanto, la mayor presencia del género *Clostridium* en el ecosistema intestinal de los caballos parece estar influenciada por dos factores, la raza o población animal y el hábitat en el que viva.

Esta influencia del hábitat, concretamente en lo referente a la alimentación, podría ser responsable de la mayor riqueza bioquímica de los caballos de El Rocío, debido a la influencia demostrada de los alimentos en la microbiota (Mackie et al., 1999; Blanco et al., 2007). Una posible explicación a este hecho, es que la población de caballos de El Rocío tiene un mayor contacto con el ser humano y otros animales domésticos. Esto puede provocar que la carga inicial de microorganismos en el intestino (incorporada tras el nacimiento) sea más diversa al tener un mayor número de fuentes de obtención de los mismos.

Además, los caballos de El Rocío comparten un mayor número de perfiles bioquímicos con los caballos de retuertas. Estos resultados parecen indicar que existe

una mayor interacción entre los caballos de retuertas y los del Rocío, que entre los caballos del retuertas y los de los guardas. Para determinar exactamente este punto, habría que estudiar el comportamiento de las tres poblaciones de caballos y las implementaciones que sus dueños hacen en su alimentación.

3.3.2.6. Confirmación de la identidad mediante secuenciación

Diecinueve de los microorganismos aislados, bacilos anaerobios, grampositivos, resistentes a cicloserina y cefoxitina, identificados por tira API con perfil dudoso (uno de ellos con perfil no válido) dentro del género *Clostridium*, fueron identificados mediante secuenciación. Los resultados indican que estas 19 cepas pertenecen mayoritariamente al género *Paenibacillus* (12 aislados de 19). Este género se constituyó tras confirmar la heterogeneidad de algunas especies del género *Bacillus* (Shida et al., 1997); por tanto, los primeros representantes de este género son antiguos *Bacillus*.

P. amylolyticus (Nakamura, 1984) es un bacilo grampositivo esporulado descrito como habitante del suelo (Shida et al., 1997), y aislado también en leche (Huck et al., 2007). Si sólo se tiene en cuenta el gen ribosómico, es indistinguible de *P. barcinonensis* y *P. pabuli*. *Paenibacillus barcinonensis* (Sánchez et al., 2005) y *P. pabuli* (Nakamura, 1984) son bacilos grampositivos esporulados aislados del suelo y del suelo y forraje, respectivamente. Con la secuencia completa, *P. barcelonensis* muestra una homología del 97.1% con *P. pabuli* y del 96.9% con *P. amylolyticus* (Sánchez et al., 2005). Como las homologías son del 97% o mayores, puede pensarse que es la misma especie (Drancourt et al., 2004). Si sólo tenemos en cuenta los primeros 500 pb, la homología entre ellas aumenta hasta hacerlas indiferenciables. El modo de identificarlas sin dudas sería mediante la hibridación del genoma completo. En este estudio han sido aisladas de muestras de heces procedentes de caballo, gamo y perdiz. Por tanto, en este caso, es posible afirmar la descripción de dos nuevos nichos ecológicos para esta especie, los tractos intestinales de estas tres especies animales.

Por otro lado, incidiendo en la identificación fenotípica, en la descripción de la especie *P. amylolyticus* (Shida et al., 1997) se recalca que reduce los nitratos mientras que ni *P. barcinonensis* ni *P. pabuli*, lo hacen. Por lo que en base a nuestros primeros

resultados, tras la secuenciación parcial del gen ribosómico 16S, y gracias a las pruebas bioquímicas realizadas mediante la tira API para la identificación bioquímica de las cepas, se podían diferenciar 7 cepas positivas para nitratos y 4 negativas. En base a esta característica, las 7 cepas positivas fueron identificadas como *P. amylolyticus*. La posterior secuenciación del gen ribosómico completo, desmintió el resultado bioquímico, identificando al menos a una de las cepas como más cercana a *P. barcelonensis*. Esta experiencia ilustra la variedad fenotípica dentro de una población de microorganismos, y recalca la idoneidad de utilizar principalmente metodologías de tipo molecular para la identificación de las cepas, secuenciando, en la medida de lo posible, el gen ribosómico completo.

P. xylanilyticus, descrita por Rivas et al. en 2005, es un bacilo grampositivo esporulado, filogenéticamente muy próximo a *P. illinoisensis*, bacilo grampositivo esporulado (Shida et al., 1997), con una homología del 99.3%, aislados del ambiente del laboratorio y del suelo, respectivamente. La gran homología impide diferenciar a las dos especies sin la correspondiente hibridación de su genoma con el genoma del microorganismo tipo. En el presente trabajo, han sido aislados a partir de heces de animales, con lo que podemos ampliar el número de los lugares en los que se encuentran los citados microorganismos.

W. soli, bacilo corto grampositivo, ha sido descrito también a partir de muestras ambientales de suelo (Magnusson et al., 2002). En nuestro estudio, esta especie ha sido aislada a partir de heces recién excretadas, y por tanto podemos describir el tracto intestinal como un nuevo nicho para esta especie. El género *Weisella* está constituido por microorganismos quimiorganotrofos fermentadores obligados, que comparten sustrato y requerimientos con los *Lactobacillus*. Evolutivamente son *Firmicutes* que se incluyen en la “rama *Clostridium*” (Björkroth y Holzapfel, 2006). Son microorganismos con muchos requerimientos nutricionales, y que se asocian raramente al tracto intestinal de animales (Björkroth y Holzapfel, 2006).

Lactobacillus animalis (Dent y Williams, 1982) y *L. murinus* (Hemme et al., 1980), ambos bacilos grampositivos, han sido descritos como parte de la flora normal de diferentes animales. Estos dos microorganismos son muy similares fisiológicamente y presentan el mismo porcentaje total de G-C en su genoma (Dent y Williams, 1986), lo

que complica su diferenciación. El primero se puede encontrar en el tracto intestinal de perros (Dent y Williams, 1986), entre otros animales, y el segundo fue descrito a partir de aislados de microorganismos intestinales de ratas y ratones (Hemme et al., 1980). En estas dos especies animales parecen ser el microorganismo mayoritario, respectivamente. También se han encontrado en heces de pollo y rata (Hammes y Hertel, 2006). En el presente estudio, las cepas pertenecientes a esta especie han sido aisladas a partir de heces de gato asilvestrado, por lo que se puede ampliar el rango de animales en los cuales podemos encontrar a estas bacterias. Por tanto, en la flora intestinal de los gatos encontramos microorganismos propios de la microbiota de perros y ratones.

Los *Lactobacillus* en ratones y perros colonizan las zonas del epitelio escamoso estratificado cercanas al final del tramo del estómago. Allí, se reproducen continuamente y las células vegetativas son arrastradas a todas las zonas del intestino (Hammes y Hertel, 2006). La presencia de este tipo epitelial en el tracto digestivo de gatos nos permite asumir que al igual que sucede en ratones y perros, posiblemente estarán colonizados por *Lactobacillus*. Por tanto estos microorganismos, pese a estar colonizando a estas especies animales, se consideran transeúntes del intestino.

Todos los microorganismos que acabamos de mostrar fueron aislados a partir de muestras de heces de animales salvajes del Parque de Doñana, un hábitat diferente al previamente descrito en la literatura. En las descripciones de estos microorganismos, se apunta que se aislaron de muestras ambientales, y en algún caso, como en el de los *Lactobacillus*, en muestras fecales de animales diferentes. En el caso de los *Paenibacillus* sp. o *Weissella soli*, se puede establecer la relación entre los dos habitats, debido a que los animales depositan sus heces sobre el suelo. Así, podemos aumentar el número de eslabones conocidos en el ciclo de vida de cada microorganismo. Por ello, y en base a los resultados, proponemos las siguientes ciclos vitales para los microorganismos:

Weissella soli

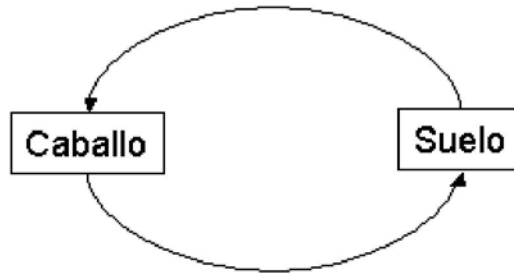


Figura 22. Ciclo de vida de *W. soli*.

Lactobacillus animalis y
L. murinus

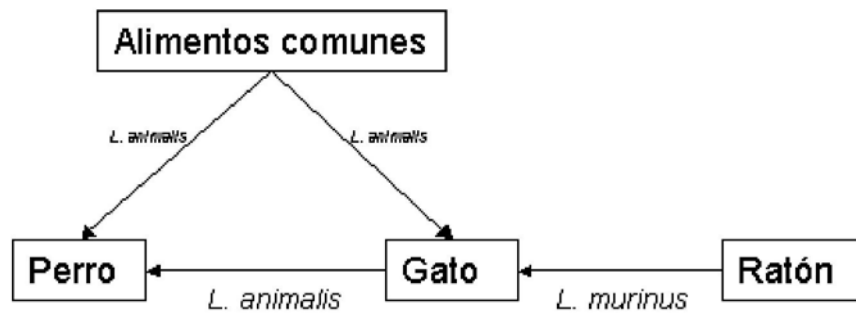


Figura 23. Ciclo de vida de *L. animalis* y *L. murinus*.

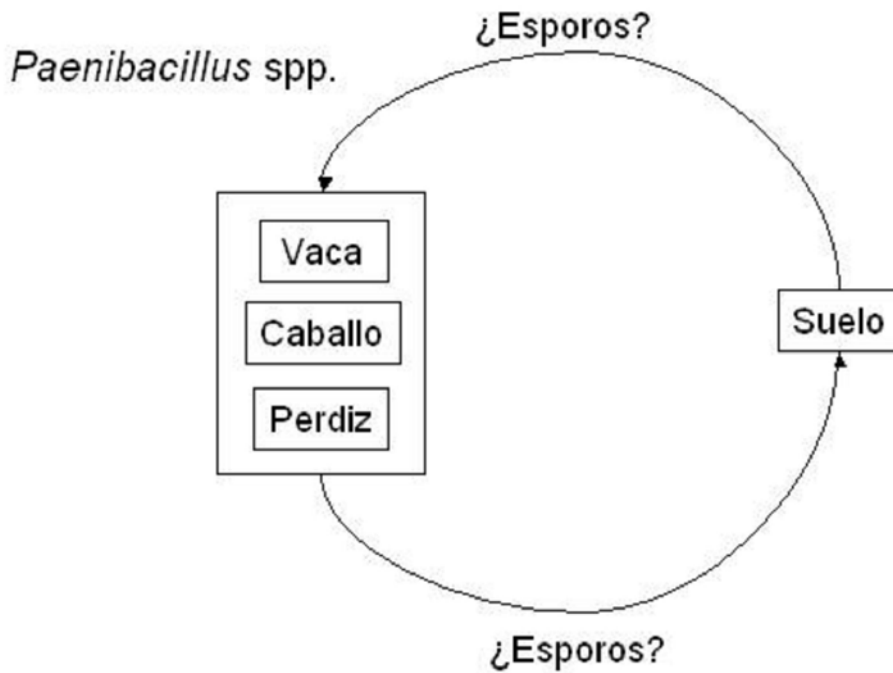


Figura 24. Ciclo de vida de *Paenibacillus*.

La interrelación del microorganismo con diferentes hospedadores y ambientes, introduce la incógnita de cuál es el verdadero hábitat de estos microorganismos. El tracto intestinal es un sistema en el que encontramos flora autóctona, flora alóctona y flora transeúnte. La flora autóctona, es aquella propia del intestino, desde la primera sucesión ecológica. La flora alóctona, está compuesta por microorganismos que en condiciones normales no vivirían en el tracto intestinal, pero que han podido colonizarlo. La flora transeúnte está conformada por aquellos microorganismos que “están de paso”, que no son capaces por algún motivo de colonizar la mucosa intestinal. A día de hoy, es muy difícil establecer una clara distinción, entre la flora autóctona y la flora alóctona (Mackie et al., 1999), debido principalmente a la heterogeneidad que se observa entre hospedadores, con filotipos presentes exclusivamente en el individuo estudiado (Rajilić-Stojanović et al., 2007).

En el caso del género *Paenibacillus*, la existencia de formas de resistencia, esporos que favorecen la dispersión, plantea la duda de si es posible que el microorganismo que se aísla provenga de una forma vegetativa o de un espora. La diferencia es crucial porque determinaría si estamos aislando microorganismos que pueden vivir en el hábitat muestreado o microorganismos contaminantes o transeúntes. Como en nuestro caso los microorganismos fueron aislados de heces de animales ¿es posible que el intestino sea un lugar adecuado para la vida de *Paenibacillus* o las condiciones son demasiado exigentes y sólo es un lugar de paso? Una forma para determinarlo indirectamente es conociendo las condiciones que determinan la germinación de los esporos. Basándose en estudios realizados con *Bacillus* y posteriormente confirmados para *P. polymyxa*, parece que un factor determinante es la presencia de nucleósidos y azúcares simples, elementos que se encuentran abundantemente en el tracto intestinal (Huo et al., 2010).

Capítulo 4

4.- Identificación y caracterización microbiológica mediante biología molecular

La identificación por métodos moleculares, que se basan en la identificación del microorganismo mediante la detección de una región concreta del genoma del organismo estudiado, es un campo en plena expansión. A lo largo de la presente tesis, se han utilizado dos de ellos, la PCR y la secuenciación del gen que codifica para el ARN 16S.

De éstos dos métodos, el más sencillo y económico es la PCR o reacción en cadena de la polimerasa. Esta técnica molecular consiste en la amplificación exponencial de un fragmento conocido de ADN, mediante el uso de primers específicos para esa secuencia y los componentes necesarios para ello: nucleótidos, ADN polimerasa, sales, etc... La técnica permite la identificación del microorganismo en cuestión porque se amplifica una secuencia conocida y específica de dicho microorganismo, de un tamaño molecular conocido. En el caso concreto de *C. difficile*, *tcdA*, *tcdB* y *tpi*, son los más utilizados (Fluit et al., 1991; Kato et al., 1991; Lemee et al., 2004). Al observar el tamaño del producto de amplificación obtenido, si es igual al de nuestro gen elegido, podemos asegurar que ese es el microorganismo de sospecha. Además, esta técnica es muy útil para la caracterización molecular de un organismo, es decir, para conocer si el organismo que se está estudiando contiene, o no, un gen determinado.

Por otro lado, es una técnica muy sensible, lo que revierte en que son necesarias muy pocas copias de la secuencia original que se esté buscando en la muestra inicial para poder detectarla. Por ello, la PCR se utiliza para la detección de muy diversos microorganismos en muestras clínicas (Klouche y Schröder, 2008).

En el presente trabajo, se ha puesto a punto la PCR utilizada en los capítulos 2 y 3, para la confirmación de la identidad de *C. difficile*, para que pueda ser utilizada directamente sobre materia fecal.

4.1. Material y Métodos

4.1.1. Muestras

4.1.1.1. Procedencia de las muestras

Heces de suido, previamente analizadas por cultivo microbiológico (capítulo 2) para detectar la presencia del microorganismo *C. difficile*. En total se analizaron 32 muestras fecales, procedentes de animales con y sin diarrea, en los que se había encontrado al microorganismo o no. Las muestras utilizadas se especifican en la tabla siguiente:

	animales con diarrea	animales sin diarrea	total
cultivo <i>C. difficile</i> +	10	12	22
cultivo <i>C. difficile</i> -	3	7	10
total	13	19	32

Tabla XXIV. Muestras de heces porcinas analizadas. Se diferencian las muestras que proceden de animales con diarrea de aquellos sin sintomatología. Además se diferencian las muestras que fueron positivas por cultivo para *C. difficile*.

4.1.1.2. Extracción del ADN

La extracción del ADN de la muestra de heces se llevó a cabo mediante el procedimiento semi-automatizado. Se introdujeron 20 mg de heces sólidas o 20 µl de heces diarreicas en un Eppendorff, junto con 180 µl del Buffer de lisis y 20 µl de proteinasa K. A continuación el procesado continuó siguiendo las instrucciones del fabricante, tal y como se ha explicado en el capítulo 1, para extracción del ADN mediante el ADN-QuickGene-810.

4.1.2. PCR

4.1.2.1. Muestras

- ✓El ADN extraído de las 32 muestras fecales descritas previamente.

- ✓Controles positivos: ADN extraído de las cepas NT77577 y NT135600 de *C. difficile*, cedidas por el H.G.U. Gregorio Marañón. Ambas cepas son productoras de toxinas A y B.

- ✓Controles negativos: Agua miliQ estéril, en sustitución del ADN del microorganismo, para detectar posibles contaminaciones.

4.1.2.2. Metodología

La identificación de *C. difficile* ha sido basada en las PCRs descritas por Kato et al. en 1991 y Lemee et al. en 2004. En este caso se realizaron dos PCRs, una simple para determinar la presencia del gen *tcdA*, y otra doble, para determinar la presencia de los genes *tcdB* y *tpi*.

- Primers (Isogen Life Science, Maarssen, Netherlands) (Kato et al., 1991; Lemee et al., 2004):

NK2 R (5'CCCAATAGAAGATTCAATATTAAGCTT3')

NK3 F (5'GGAAGAAAAGAAGCTTCTGGCTCACTCAGGT3')

- El producto de amplificación que se espera es de un tamaño de 252 pb.

tpi-F (5'-AAAGAAGCTACTAAGGGTACAAA-3')

tpi-R (5'-CATAATATTGGGTCTATTCCTAC-3')

- El producto de amplificación que se espera es de 230 pb.

*tcdB*F (5'-GGAAAAGAGAATGGTTTTATTAA-3')

tcdB-R (5'-ATCTTTAGTTATAACTTTGACATCTTT-3')

- El producto de amplificación será de un tamaño de 160 pb.

- Reacciones de amplificación:

PCR duplex (*tcdB* y *tpi*):

La mezcla de reacción está constituida, para un volumen final de 25 µl, por:

- dNTP 250 µM de cada desoxinucleótido (dNTP)
- tpi-F 17'5 pmol
- tpi-R 17'5 pmol
- tcdB-F 35 pmol
- tcdB-R 35 pmol
- AmpliTaq Gold DNA Polimerasa (Applied Biosystems, Madrid, Spain) 1'5 U
- MgCl₂ 2'5 mM
- Buffer: Tris-HCl 10 mM (pH= 8'3)
KCl 50 mM

Se añade 1 µl de ADN problema.

Amplificación:

- desnaturalización 3 min 95°C
- amplificación 11 ciclos 30 seg a 95°C
30 seg a 65°C, disminuyendo un grado en cada ciclo hasta llegar a 55°C
30 seg a 72°C
- amplificación 34 ciclos 30 seg a 95°C
30 seg a 55°C
30 seg a 72°C

PCR simple (*tcdA*):

La mezcla de reacción está constituida, para un volumen final de 30 µl, por:

- dNTP 250 µM de cada desoxinucleótido (dNTP)
- NK2 10 pmol
- NK3 10 pmol
- AmpliTaq Gold DNA Polimerasa (Applied Biosystems, Madrid, Spain) 1'5 U
- MgCl₂ 2'5 mM
- Buffer: Tris-HCl 10 mM (pH= 8'3)
KCl 50 mM

El ADN añadido es de 1 µl.

Amplificación: desnaturalización 5 min 95°C

- amplificación 45 ciclos 15 seg a 95°C
20 seg a 50°C
40 seg a 72°C

En todas las reacciones se incluyeron controles positivos (*C. difficile* A⁺B⁺) y negativos (agua miliQ).

Los productos de amplificación se observaron tras una electroforesis a 95V en un gel de agarosa al 1´6%. Los fragmentos de amplificación se tiñeron con bromuro de etidio (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) y se observaron bajo luz UV. El tamaño de cada fragmento fue determinado por comparación con el patrón de tamaños de fragmentos génicos (*lader*), cargado en cada uno de los geles.

4.2. Resultados

En las 22 muestras de heces de cerdo, a partir de las cuales se había aislado *C. difficile*, se detectó amplificación de los fragmentos de los genes *tpi* y *tcdB*. El gen *tcdB* sólo se detectó en 21 de las muestras utilizando la PCR descrita por Lemee et al. (2004). En la muestra restante, se confirmó la presencia del gen *tcdB* utilizando la PCR alternativa descrita por Fluit et al. (1991), y detallada en el capítulo 2. Mediante la PCR simple, se confirmó también la presencia del gen *tcdA* en el ADN extraído de las muestras de heces (Kato et al. 1991). Además, estos resultados coinciden con los del toxinotipo descrito para estas cepas a partir de cultivo puro del microorganismo (capítulo 2).

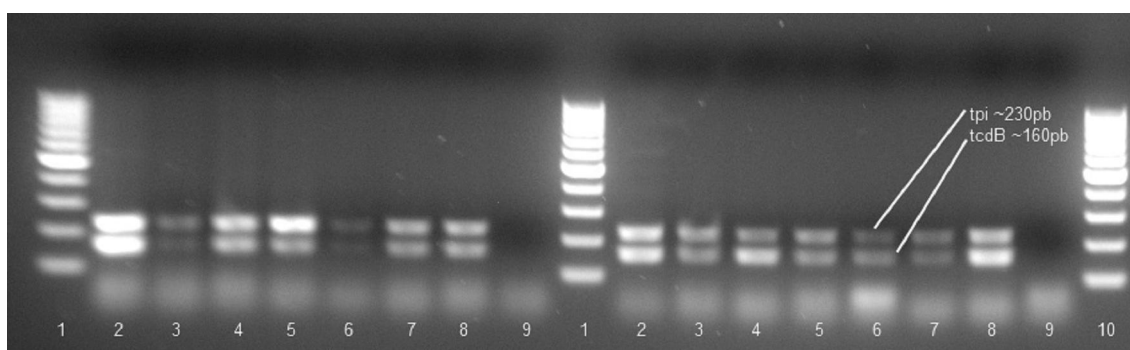


Figura 25. PCR dúplex para los genes *tpi* y *tcdB* (Lemee et al., 2004), para detectar la presencia de *C. difficile* en heces de cerdo. En la parte izquierda de la imagen, las muestras de ADN han sido aisladas directamente de las heces de los cerdos. En la parte de la derecha, el ADN procede de los aislados de *C. difficile* obtenidos a partir de esas muestras de heces. En ambas zonas, en el primer carril está el *lader*, a continuación un control positivo, después 6 muestras de ADN, obtenido directamente de heces y procedente de cultivo puro del microorganismo, respectivamente. En el último carril se dispuso el control negativo con agua miliQ.

Del mismo modo, en las 10 muestras de heces negativas por diagnóstico microbiológico, no se produjo amplificación de ninguno de los tres genes específicos citados. Por tanto, la técnica de PCR aplicada sobre el ADN extraído de las heces directamente confirmó los resultados obtenidos por diagnóstico microbiológico, y caracterización posterior de las cepas.

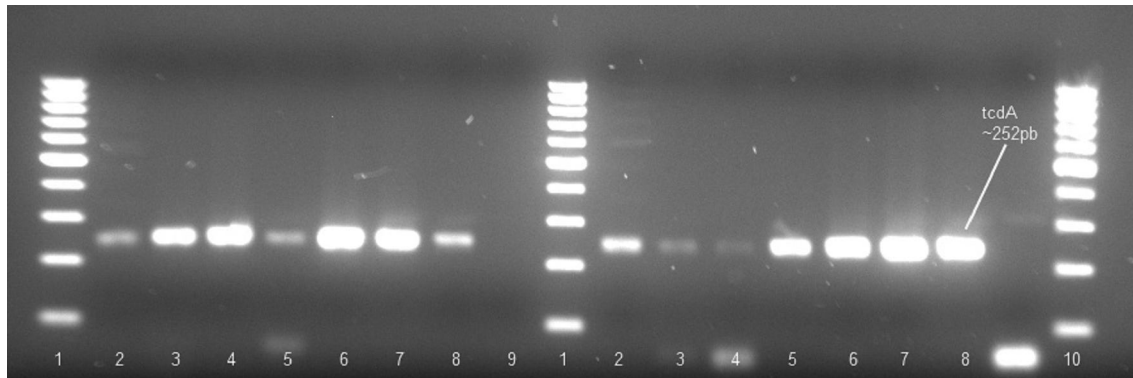


Figura 26. PCR simple para el gen *tcdA* (Kato et al., 1991) para detectar la presencia de *C. difficile* en heces de cerdo. En la parte izquierda de la imagen, las muestras de ADN han sido aisladas directamente de las heces de los cerdos. En la parte de la derecha, el ADN procede de los aislados obtenidos a partir de esas muestras de heces. En ambas zonas, en el primer carril está el ladder, a continuación un control positivo, después 6 muestras de ADN, obtenido directamente de heces y procedente de cultivo puro del microorganismo, respectivamente. En último lugar se puso el control negativo. Las muestras de ADN proceden de las mismas muestras fecales o aislados bacteriano que las de la figura anterior, en el mismo orden.

4.3. Discusión de los resultados

Una de las mayores dificultades para el diagnóstico de *C. difficile* en medicina veterinaria es encontrar un diagnóstico rápido, sensible y específico, que pueda realizarse de forma rutinaria. En la actualidad, la mayoría de métodos de diagnóstico comerciales están diseñados para su uso en medicina humana y su sensibilidad disminuye si son utilizados para el diagnóstico veterinario (Yaeguer et al., 2002).

La PCR es un método rápido, sensible y específico que ha sido ampliamente utilizado en medicina humana (Klouche y Schröder, 2008). Para *C. difficile*, uno de los métodos de diagnóstico rápido consiste en una PCR a tiempo real del gen *tcdB* [GeneOhm *C. difficile tcdB* (Becton-Dickinson)]. Aunque se han descrito multitud de PCR llevadas a cabo sobre heces humanas directamente (Gumerlock et al., 1993;

Wolfhagen et al., 1994; Alonso et al., 1999; Guilbault et al., 2002; Bélanger et al., 2003; van den Berg et al., 2005; van den Berg et al., 2007; Sloan et al., 2008), la novedad en este caso consiste en que se ha realizado directamente sobre heces de otros animales.

La PCR en materia fecal es compleja porque las heces están compuestas por multitud de componentes, la mayoría de ellos desconocidos, en una mezcla heterogénea. El problema sobreviene cuando muchos de estos componentes tienen la capacidad de inhibir la reacción de PCR (Lou et al., 1997), pero al ser componentes de naturaleza desconocida resulta complicado y laborioso detectarlos y bloquear su acción.

Como se explicó en el capítulo 1, en la presente tesis se ha valorado la idoneidad de dos métodos diferentes de extracción de ADN, uno manual y otro semi-automático, partiendo de colonias de microorganismos aisladas. Sin embargo, para extraer el ADN de muestras de heces, la única opción ha sido el método semi-automático, porque en este método la muestra se ve sometida a varios lavados que eliminan las sustancias contaminantes que pudieran interferir en la reacción de PCR.

Como se ha descrito en los resultados obtenidos tras aplicar la PCR sobre el ADN extraído directamente de las heces de los animales, la amplificación sólo tuvo lugar en las 22 muestras positivas a *C. difficile* por cultivo. Las 10 muestras negativas por cultivo también resultaron negativas por reacción de PCR. Estos datos indican una sensibilidad del 100%, porque todas las muestras positivas fueron positivas también por PCR, por lo que no se ha obtenido ningún falso negativo. Y una especificidad del 100% porque tampoco se ha obtenido ningún falso positivo, ya que todas las muestras negativas dieron negativas por PCR.

Además, la amplificación simultánea de tres genes nos permite, no sólo detectar la presencia o ausencia de *C. difficile* en la muestra, sino también parte de su toxinotipo (Rupnik et al., 1998) en caso de que esté presente. De este modo, tenemos una primera aproximación sobre las cepas presentes del microorganismo, lo que puede resultar de cierta utilidad como se vio en el capítulo 2. El único problema que podría surgir en este caso, es en la situación de que en un hospedador convivan dos cepas toxigénicamente diferentes, ya que la amplificación de los genes de las toxinas de una de las cepas eclipsará la ausencia de los mismos en la otra cepa. Sin embargo, esto sólo se puede

evitar mediante un cultivo microbiológico tradicional en el que se aíslan diferentes clones del microorganismo, ya que incluso la prueba de citotoxicidad también ocultaría esta posibilidad.

Una aproximación igual de válida y más sencilla, hubiera sido la amplificación de uno de los genes únicamente, por ejemplo el gen estructural *tpi*, presente en todas las cepas. En este caso se hubiera perdido información relativa a la toxigenicidad de la bacteria.

Una ventaja añadida es la rapidez del método de PCR. Se puede tener un resultado definitivo en menos de 8h, mientras que con otras técnicas como en el ensayo de citotoxicidad o el aislamiento del microorganismo por cultivo, se necesitan un mínimo de 24 y 48 horas, respectivamente. Además, con la PCR directa se obtiene información sobre la presencia del microorganismo y su toxicidad. Por contra, en el cultivo hay que esperar un mínimo de 48h para que se desarrolle el microorganismo, y detectar la toxigenicidad por PCR o mediante la prueba de citotoxicidad posteriormente.

Por tanto, parece que el diagnóstico de *C. difficile* por PCR directamente de heces de animales es posible, sin perder la sensibilidad y especificidad que nos proporciona el método tradicional de aislamiento microbiano y con la misma información, al amplificar simultáneamente los genes que codifican para las toxinas.

Capítulo 5

5.- Variaciones en la biodiversidad del ecosistema intestinal del ganso común.

Las aves migratorias se consideran un importante vehículo de transporte de semillas, pequeños animales como artrópodos e incluso microorganismos (Figuerola et al., 2010). Así mismo, estos animales podrían considerarse ecosistemas móviles cuyas condiciones se ven influenciadas por el ambiente en que estén inmersos en cada época del año. El Parque de Doñana es un enclave preferente para el estudio de las aves migratorias, ya que la estacionalidad a la que se ven sometidas las aguas de las marismas proporciona un espacio óptimo para las aves en invierno que llegan de las frías regiones del norte de Europa. Una de las especies clave de aves migratorias que llega cada año por miles al Parque es la población de ganso común (*Anser anser*) procedente del norte de Europa.

En esta parte del trabajo de investigación se ha tratado de comparar dos ecosistemas intestinales para observar si existen diferencias. Con el fin de minimizar las variables se ha tomado el mismo ecosistema, la microbiota fecal de los gansos, en dos momentos diferentes en el tiempo, separados por la estancia de estas aves en Doñana durante su invernada.

5.1. Material y Métodos

5.1.1. Muestras

Las muestras analizadas en el presente estudio son un total de 29 muestras fecales de ganso (*Anser anser*) del Parque Nacional de Doñana: 14 fueron recogidas el 23 de noviembre de 2007, poco después de la llegada de los animales al Parque, y las otras 15 el 22 de enero de 2008, cuando la población de gansos había pasado ya dos meses de invernada, previamente a su retorno al Norte de Europa. Las muestras del primer grupo se denominaron A y las del segundo B.

5.1.2. Aislamiento

El muestreo de microorganismos de la microbiota fecal fue llevado a cabo mediante el uso de diferentes medios de cultivo para cada muestra y en diferentes atmósferas. Así, las muestras fecales se introdujeron en 1 ml de PBS. El escobillón se agitó ligeramente en el eppendorf y tras retirarlo, se incubó 4 h a 37°C. A continuación, se sembraron 100 µl de la solución resultante en cada uno de los siguientes medios:

- 2 placas de Agar Columbia- Sangre (Tec-Laim. Madrid, España),
- 1 placa de Agar MacConkey (Tec-Laim),
- 1 placa de Agar Baird- Parker (Tec-Laim),
- 1 placa de Agar CLO (BioMérieux),

Todas las placas se incubaron en aerobiosis durante 24-72h, observando el crecimiento cada 24h, excepto una placa de agar sangre y la placa de agar CLO, que fueron incubadas en anaerobiosis durante 72h. La temperatura de incubación fue de 37°C en todos los casos.

5.1.3. Identificación

La identificación de los microorganismos se realizó mediante observación de las colonias aisladas en los diferentes medios selectivos y diferenciales utilizados, así como su capacidad de crecer en atmósferas aerobias o anaerobias. Además se recurrió a la observación microscópica y a pruebas bioquímicas:

- Tinción de Gram, se realizó con Violeta de Genciana, Lugol, Alcohol:Acetona (50:50), y Safranina (BioMerièux) siguiendo las instrucciones del fabricante.
- Prueba oxidasa. Se utilizaron bastoncillos de detección de oxidasa (Oxoid LTD., Basingstoke, Inglaterra). Estos bastoncillos están impregnados en un extremo con una solución de oxalato N,N-dimetil-p-fenildiamina, ácido ascórbico y α -naftol. Se utilizaron siguiendo las instrucciones del fabricante. La prueba se consideró positiva si en el extremo impregnado del bastoncillo, tras ponerla en contacto con una colonia aislada del microorganismos, aparecía una franja de color morado después 5 minutos.

- Prueba Catalasa. Se llevó a cabo con peróxido de hidrógeno al 10%. Una gota de este compuesto químico se puso en una superficie limpia. A continuación se tomó una colonia aislada del microorganismo de estudio con el asa de siembra y se impregnó en el peróxido de hidrógeno. La prueba se consideró positiva si aparecían burbujas como resultado de la liberación de oxígeno.
- Prueba de la coagulasa. Se realizó depositando un gota de plasma de conejo (Sthaph-ase, BioMerèux) en una superficie limpia. A continuación se tomó una colonia aislada del cultivo puro del microorganismo a estudiar y se mezcló con el plasma. La prueba se consideró positiva si se formaron coágulos blancos.
- Oxidación/Fermentación de la glucosa: Para cada microorganismo, se utilizaron dos tubos de caldo glucosado con indicador de pH (rojo fenol). En cada uno de ellos, se sembró una colonia aislada del microorganismo de estudio, y en uno de los tubos se crearon condiciones de anaerobiosis con la adición de aceite de parafina. El resultado se consideró de oxidación si se produjo variación en el pH del tubo cultivado en aerobiosis. Se consideró de fermentación si se produjo viraje en el tubo cultivado en anaerobiosis.
- Anaerobiosis facultativa: Todos los microorganismos crecidos en condiciones de anaerobiosis fueron resembrados en agar sangre, e incubados 24-48h a 37°C, en condiciones de aerobiosis. Fueron considerados microorganismos anaerobios facultativos aquellos capaces de crecer en ambas condiciones.
- Tiras rápidas API 20E (BioMèrieux): Esta tira está constituida por una batería de 20 pruebas bioquímicas para enterobacterias. La inoculación de los pocillos se llevó a cabo siguiendo las indicaciones del fabricante. El análisis de los resultados obtenidos se realizó como se ha detallado en el capítulo 2, en relación a las tiras rapid 32ID.

-Los bacilos gramnegativos, oxidasa negativo, fueron identificados mediante tiras API 20E.

-Los cocos grampositivos se identificaron mediante la utilización de pruebas bioquímicas: catalasa, oxidasa, coagulasa y oxidación/fermentación de la glucosa, además de por su capacidad de crecimiento en Baird-Parker.

-Los bacilos grampositivos, se dividieron en anaerobios estrictos, anaerobios facultativos y aerobios, esporulados o no.

5.1.4. Análisis estadístico de los resultados

5.1.4.1. Análisis estadístico básico

Para el cálculo de las medias aritméticas, las varianzas, las desviaciones típicas, la curtosis estándar, la asimetría estándar y los test comparativos de desviación estándar (F de Fisher), de medias (t de student), de medianas no paramétrico (U de Mann-Whitney) y de relación de variables (χ^2), se utilizó Statgraphics. Para todos los test comparativos, la hipótesis nula es que los valores a comparar no son diferentes o, en el caso de la χ^2 , que no existe relación entre las variables. Así mismo, en todos los casos, se rechazará la hipótesis cuando la probabilidad de que la hipótesis nula sea cierta (p-valor) sea menor de 0'05, lo que implica una confianza del 95% en la afirmación.

Los valores de asimetría estándar (AE) y curtosis estándar (CE), para cada conjunto de muestras analizadas, se utilizaron para determinar si la población respectiva sigue una distribución normal. La distribución de los valores se considerará normal si tanto la asimetría como la curtosis estándar muestran valores comprendidos entre -2 y 2.

El test de Fisher (F) se utilizó para determinar si las desviaciones típicas entre dos grupos de muestras pueden considerarse iguales o diferentes. Este dato, nos permite saber si las medias aritméticas pueden ser comparadas.

El test de la t de Student (t) se utilizó para comparar las medias aritméticas de grupos de valores paramétricos, de cada uno de los grupos de resultados estudiados.

Para poder tomar como válidos los resultados de este test, las varianzas deben ser iguales.

El test de Mann-Whitney-Wilcoxon (W) se utilizó para comparar las medianas de los resultados obtenidos, en caso de que la asimetría y curtosis estándar indiquen que los valores no siguen una distribución normal o que la F de Fisher indique que las varianzas no son iguales.

5.1.4.2. *Cálculo de la riqueza*

La riqueza de un ecosistema es el número de especies diferentes presentes en el mismo. Debido a que no se puede muestrear completamente un ecosistema para conocer la composición exacta del mismo, se toman diferentes puntos del mismo y en base a las observaciones en esos puntos se extrapola el número de especies de un ecosistema. En el presente trabajo se han calculado dos estimaciones de riqueza: Chao2 y Jackknife de segundo orden, mediante el programa estadístico PAST. Éstas dos estimaciones han demostrado ser las que menos errores presentan cuando se trabaja con muestras pequeñas (Colwell y Coddington, 1994; Durso et al., 2010). Precisamente, por el alto grado de error debido a la extrapolación a partir de pocos datos, se han calculado los dos índices para tener dos opiniones.

5.1.4.3. *Cálculo de la abundancia*

El cálculo de las abundancias se realizó sólo en base a los aislados obtenidos en agar sangre para todas las muestras. En el momento de la observación de las placas, se asignó un valor a los diferentes aislados en base a la abundancia:

número de colonias en la placa	valor asignado
1 colonia	1
2-5 colonias	2
6-10 colonias	3
11-20 colonias	4
> 20 colonias	5

Tabla XXV. Equivalencia entre el número de colonias observadas en la placa y el valor dado para clasificar esa abundancia.

La comparativa de abundancias se realizó:

- mediante la representación gráfica de los resultados obtenidos,
- calculando las medias ponderadas de la abundancia por cada especie diferente aislada, y
- comparando estadísticamente las medias ponderadas.

La representación gráfica se realizó con el programa informático de dibujo Paint.net. Adjudicando un diámetro de pincel a cada uno de los valores de abundancia dados en el momento de la observación, y un color a cada uno de los grandes grupos de microorganismos. A continuación se dibujó un punto por cada taxón específico aislado, del diámetro correspondiente a la abundancia y de color correspondiente a la clase de microorganismo.

La media ponderada de abundancias se realizó calculando la media de las abundancias /especie, mediante la siguiente fórmula matemática:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i w_i}{\sum_{i=1}^n w_i}$$

Siendo x, los valores de abundancia obtenidos y w el número de especies con cada una de las abundancias. La media ponderada se hizo para cada una de las muestras.

La comparación de las medias ponderadas se realizó mediante Statgraphics, calculando los mismos parámetros que se han descrito en el punto (1.1.4.2).

5.2. Resultados

5.2.1. Microorganismos aislados en total

La siguiente tabla, refleja el número de microorganismos diferentes aislados en cada punto de muestreo, para cada medio.

muestra	total especies diferentes aisladas	aislados diferentes en A. sangre	aislados diferentes en A. sangre en anaerobiosis	aislados en A. MacConkey	aislados en A. Baird-Parker	aislados en A. CLO
1	6	5	2	2	-	-
2	1	1	-	-	-	-
3	3	3	1	2	-	-
4	5	5	3	-	-	-
5	1	1	-	-	-	-
6	6	6	3	2	-	-
7	4	4	3	-	1	-
8	5	5	3	2	-	-
9	4	4	2	2	-	-
10	6	5	4	2	1	-
11	1	1	1	-	-	-
12	6	5	5	1	1	1
13	5	5	3	-	-	-
14	4	4	2	2	-	-
total	57	54	32	15	3	1

75	3	2	1	2	-	-
76	2	1	1	2	-	-
77	3	3	1	3	-	-
78	4	3	1	-	1	4
79	4	3	2	3	1	-
80	4	4	4	2	1	3
81	5	5	5	2	1	1
82	6	5	4	2	3	1
83	6	6	6	-	-	-
84	2	3	3	3	-	2
85	6	5	3	1	1	1
86	5	3	1	2	3	4
87	5	5	3	2	2	1
88	6	5	3	1	2	-
89	4	3	2	2	1	2
total	65	56	40	27	16	19

TOTAL	122	110	72	42	19	20
--------------	------------	------------	-----------	-----------	-----------	-----------

Tabla XXVI. Número de especies diferentes aisladas en cada uno de los medios de cultivo utilizados. Las muestras numeradas del 1-14 pertenecen a los gansos del grupo A. Las del 75 al 89, a los gansos del grupo B.

5.2.1.1. Análisis matemático

Con el número de especies diferentes aisladas, se va a comparar el número medio de especies crecidas por placa. Se asume como hipótesis inicial que, debido a que las condiciones de procesado e incubación de todas las muestras ha sido el mismo, y de que todas las muestras son heces pertenecientes a la misma especie animal, si la flora

fecal de los gansos fuera igual a su llegada al Parque (A), como tras su estancia de dos meses en el mismo (B), el número medio de aislados por placa sería el mismo. Para ello se comparan los resultados en los diferentes medios:

- ✓ Comparación del número total de especies diferentes aisladas/medio, en el conjunto de todas las condiciones de cultivo, a partir de las muestras A y B:

Tras determinar que los resultados siguen una distribución normal (AE: -1´14; -0´52; CE: -0´59; -0´77) y que las varianzas podían considerarse iguales ($F=1´85$; p-valor=0´27), se compararon las medias obtenidas. El test estadístico de la t de Student indica que las medias son iguales ($t=-0´42$; p-valor=0´67).

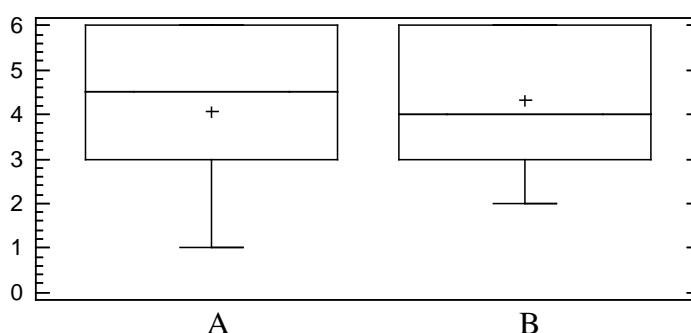


Figura 27. Gráfico de cajas que compara el número de microorganismos aislados totales en ambas poblaciones de gansos, A y B.

Por lo tanto, podemos concluir que el número medio de especies aisladas por cada punto de muestreo, en total, en ambos ecosistemas, es el mismo. Esto nos permite comparar los resultados cualitativos obtenidos, la riqueza de especies que encontramos en ambos ecosistemas, y la abundancia de las mismas, ya que partimos de la base de que el número medio de especies aisladas es el mismo.

Para estudiar, en base a las diferentes variables manejadas en el aislamiento, si existen diferencias en la microflora encontrada se compararon tal y como sigue:

- ✓ Aislados en agar sangre y aerobiosis, entre las muestras de gansos A y B:

AE	A=-1´44	B=-0´30	distribución normal
CE	A=-0´36	B=-0´49	
	F =1´53	p-valor=0´44	varianzas iguales
	t =0´09	p-valor=0´93	

Por tanto, al 95% de confianza, no existen diferencias significativas en el número medio de especies aisladas en agar sangre para los dos ecosistemas intestinales.

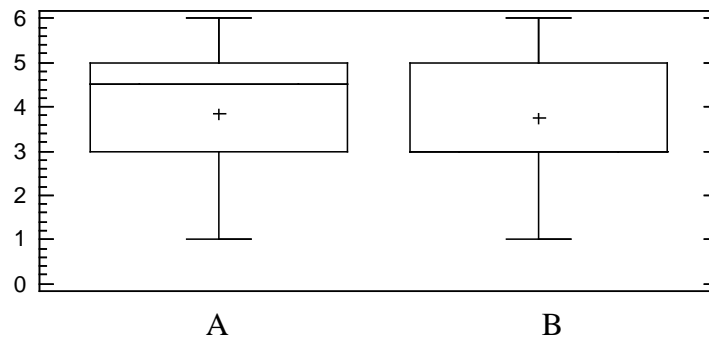


Figura 28. Gráfico de cajas que compara el número de especies microbianas diferentes aisladas en agar sangre en aerobiosis, entre los dos grupos de gansos, A y B.

✓ Aislados en agar sangre y anaerobiosis, entre las muestras de gansos A y B:

AE	A=-0'06	B=1'00	distribución normal
CE	A=-0'21	B=-0'27	
	F=0'82	p-valor=0'72	varianzas iguales
	t=0'67	p-valor=0'51	

Por tanto, al 95% de confianza, no existen diferencias significativas en el número medio de especies aisladas en agar sangre en anaerobiosis, para los dos ecosistemas intestinales.

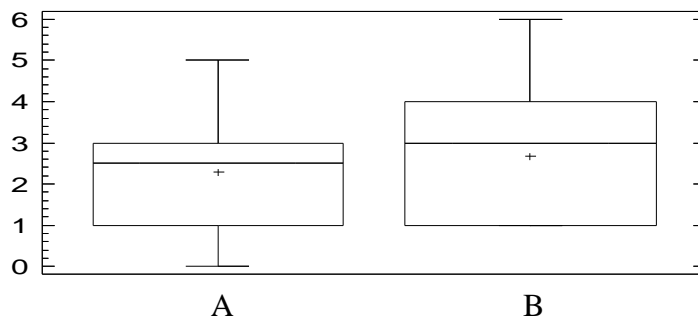


Figura 29. Gráfico de cajas que compara el número de especies microbianas diferentes aisladas en agar sangre, en anaerobiosis, entre los dos grupos de gansos, A y B.

✓ Aislados en agar MacConkey, entre las muestras de gansos A y B:

AE	A=-0'25	B=-1'16	distribución normal
CE	A=-1'69	B=0'13	
	F=1'12	p-valor=0'83	varianzas iguales
	t=-2'02	p-valor=0'052	

Por tanto, al 95% de confianza, no existen diferencias significativas en el número medio de especies aisladas en agar sangre para los dos ecosistemas intestinales. Al 90% de confianza, sí se pueden establecer diferencias.

- ✓ Aislados en agar Baird Parker, entre las muestras de gansos A y B:

AE	A=2'39	B=1'18	distribución no normal
CE	A=0'38	B=-0'24	
	W=158'5	p-valor=0'009	

En base a los datos numéricos, al 95% de confianza, existen diferencias significativas en el número medio de especies aisladas en medio Baird-Parker, en ambos ecosistemas.

- ✓ Aislados en agar CLO, entre las muestras de gansos A y B:

AE	A=5'71	B=1'51	distribución no normal
CE	A=10'69	B=-0'20	
	W=163	p-valor=0'003	

Por tanto el número de microorganismos aislados en CLO es significativamente diferente en ambas poblaciones, al 95% de confianza.

El análisis completo de los aislados en CLO que resultaron ser *Clostridium* se ha realizado en el capítulo 3, junto con 70 muestras de gansos más.

- ✓ Aislados en agar sangre en aerobiosis vs. anaerobiosis:

En total:

AE	A=-1'33	B=0'82	distribución normal
CE	A=-0'71	B=-0'25	
	F=1'02	p-valor=0'95	varianzas iguales
	t=3'3	p-valor=0'002	

Grupo A:

AE A=-1'44 B=-0'06
CE A=-0'36 B=-0'21
F=1'4 p-valor=0'55 varianzas iguales
t=2'64 p-valor=0'01

Grupo B:

AE A=-0'30 B=1
CE A=-0'49 B=-0'27
F=0'76 p-valor=0'62 varianzas iguales
t=1'96 p-valor=0'06

En este caso, que al analizar el conjunto de las muestras, encontramos diferencias significativas con una confianza del 95% entre el número de microorganismos aerobios y el de anaerobios. El número de microorganismos que han crecido en condiciones de aerobiosis ha sido mayor que el de los que han crecido en anaerobiosis.

Al analizar los datos del grupo A y del grupo B por separado, obtenemos que en el primer caso existen diferencias entre el número de microorganismos que se han aislado en aerobiosis y aquellos que se han aislado en anaerobiosis, al 95% de confianza. Sin embargo, con los resultados del grupo B, no encontramos diferencias significativas al 95% de confianza.

✓ Aislados totales vs. aislados en agar sangre en aerobiosis, en total:

AE A=-1'33 B=-1'48
CE A=-0'7 B=-0'57
F=0'87 p-valor=0'71 varianzas iguales
t=-1 p-valor=0'32

Por tanto, el número de microorganismos diferentes aislados en total no es significativamente diferente del número de microorganismos aislados en agar sangre en aerobiosis.

5.2.2. Especies aisladas

Listado de la especies de microorganismos aislados en conjunto a partir de las 29 muestras estudiadas:

	Listado especies aisladas de la población A	Listado de especies aisladas de la población B
bacilos gramnegativos	<i>Pantoea sp.3</i> (1) <i>Providencia alcalifaciens</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Flavibacterium oryzihabitans</i> <i>Enterobacter cancerogenus</i> <i>Serratia rubidaea</i> <i>Pantoea sp.3</i> (2) <i>Pantoea sp.3</i> (3) <i>E. coli</i> <i>Pantoea sp3.</i> (4) <i>Serratia ficaria</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Pantoea sp3.</i> (5) <i>Enterobacter absuriae</i> <i>Enterobacter amnigenus</i> <i>Enterobacter cancerogenus</i> <i>Pantoea sp.2</i> <i>Acinetobacter / Pseudomonas</i> (1) <i>Acinetobacter / Pseudomonas</i> (2) <i>Acinetobacter / Pseudomonas</i> (3) <i>Enterobacter sakazakii</i> <i>Enterobacter amnigeneus</i> <i>Enterobacter cancerogenus</i>
cocos grampositivos	<i>Staphylococcus intermedius</i> <i>Staphylococcus sp.</i> (1) <i>Streptococcus sp.</i> / <i>Enterococcus sp.</i> (1) Cocos G+ (ox-/ferm-) (1) Cocos g+ (2) <i>Staphylococcus aureus</i> Cocos g+ (3) <i>Staphylococcus sp.</i> (2) <i>Staphylococcus sp.</i> (3) <i>Staphylococcus sp.</i> (4) Cocos G+; catal – (4) <i>Staphylococcus sp.</i> (5) <i>S. aureus</i> (no cto B-P) Cocos G+; catal – (5)	<i>Staphylococcus sp.</i> (6) <i>Staphylococcus sp.</i> (7) <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus sp. /Micrococcus sp.</i> (8)

bacilos grampositivos	<i>Actinomyces sp.</i> (1)	Bacilo G+ (14)
	Bacilo G+ (1)	Bacilo G+ (15)
	Bacilo G+ (2)	Bacilo G+ (16)
	Bacilo G+ (3)	Bacilo G+ (cocobacilo) (17)
	Bacilo G+ (4)	Bacilo G+ (18)
	<i>Bacillus sp.</i> (1)	Bacilo G+ (19)
	<i>Bacillus sp.</i> (2)	Bacilo/cocobacilo G+ (20)
	Bacilo G+ (5)	<i>Actinomyces sp.</i> (7)
	Bacilo G+ (6)	Bacilo G+ (21)
	Bacilo G+ (7)	Bacilo G+ (22)
	<i>Bacillus sp.</i> (3)	<i>Bacillus sp.</i> (9)
	<i>Actinomyces sp.</i> (2)	<i>Bacillus sp.</i> (10)
	Bacilo G+ (8)	Bacilo G+ (23)
	Bacilo G+ (9)	Bacilo G+ (24)
	Bacilo G+ (10)	<i>Clostridium (acetobutylicum)</i>
	<i>Actinomyces sp.</i> (3)	Bacilo G+ (25)
	<i>Actinomyces sp.</i> (4)	Bacilo G+ (26)
	<i>Bacillus sp. / Clostridium sp.</i>	Bacilo G+ (27)
	<i>Bacillus sp.</i> (4)	Bacilo G+ (28)
	<i>Bacillus sp.</i> (5)	Bacilo G+ (29)
	<i>Corynebacterium sp. / Bacillus sp.</i> (6)	Bacilo G+ (30)
	<i>Bacillus sp.</i> (7)	Bacilo G+ (31)
	<i>Bacillus sp.</i> (8)	Bacilo G+ (32)
	Bacilo G+ (11)	Bacilo G+ (33)
	Bacilo G+ (12)	Bacilo G+ (34)
	<i>Actinomyces sp.</i> (5)	Bacilo G+ (35)
	Bacilo G+ (13)	Bacilo G+ (36)
	<i>Actinomyces sp.</i> (6)	Bacilo G+ (37)
		<i>Actinomyces sp.</i> (7)
		Bacilo G+ (38)
		Bacilo G+ (39)
		Bacilo G+ (40)
		Bacilo G+ (41)

		Bacilo G+ (42)
		Bacilo G+ (43)
		Bacilo G+ (44)
		Bacilo/cocobacilo G+ (45)
		Bacilo G+ (46)
		Bacilo G+ (47)
		Bacilo G+ (48)
		Bacilo G+ (49)
		Bacilo G+ (50)
		Bacilo G+ (51)
		Bacilo G+ (52)

Tabla XXVII. Tabla con todas las especies diferentes aisladas, diferenciando bacilos gramnegativos, grampositivos y cocos grampositivos. Cuando el microorganismo no ha sido identificado a nivel de especie, se le ha asignado un número correlativo para hacer referencia que las observaciones microscópicas y bioquímicas indican que son microorganismos diferentes.

Pese a que se han aislado muchas especies que no se han llegado a identificar, se observa que entre las muchas identificadas, no siempre existe correspondencia entre los dos “ambientes”.

5.2.2.1. Análisis matemático

En un análisis gráfico de los porcentajes de microorganismos obtenidos, se aprecia que el área de bacilos gramnegativos es casi idéntico, variando los cocos grampositivos y los bacilos grampositivos (figura 30).

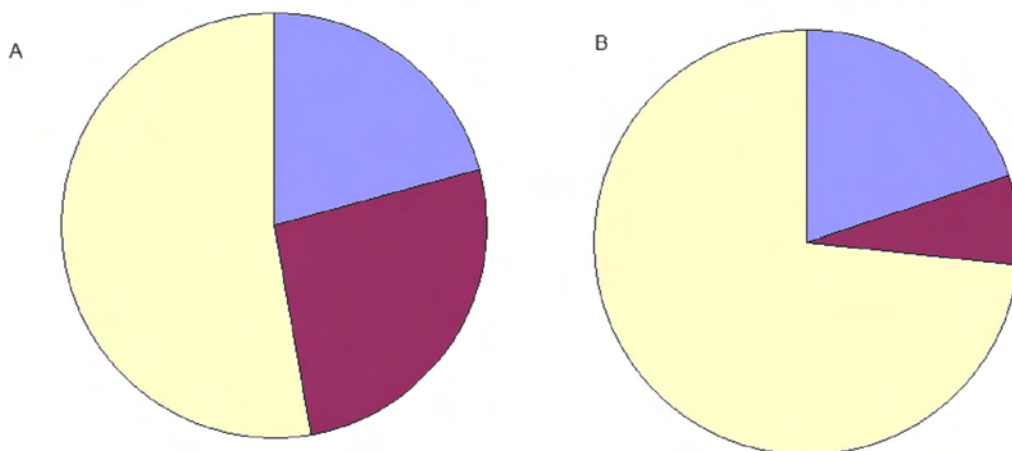


Figura 30. Representación gráfica del porcentaje de microorganismos diferentes aislados. En la imagen A se muestran los aislados en el conjunto del primer grupo de gansos, denominado A. En la imagen B, los resultados del grupo de gansos B. En ambas figuras, el azul representa el porcentaje de bacilos gramnegativos, el granate el de cocos grampositivos y el amarillo el de bacilos grampositivos.

Para determinar si la apreciación gráfica es significativa o no, se realizaron los siguientes test estadísticos:

✓ Diferencias en el número de bacilos gramnegativos, entre A y B:

AE	A=0'40	B=1'18	
CE	A=-0'86	B=-0'24	distribución normal
	F =0'55	p-valor=0'30	varianzas iguales
	t =-0'62	p-valor=0'54	

Por tanto, no hay diferencias en el número de bacilos gramnegativos aislados en uno y otro ecosistema.

- Diferencias en el número de enterobacterias, entre A y B:

AE	A=1'12	B=1'74	
CE	A=-0'49	B=-0'23	distribución normal
	F =0'42	p-valor=0'13	varianzas iguales
	t =-0'43	p-valor=0'67	
	$\chi^2=0'01$	p-valor= 0'93	

En este caso, no hay diferencias significativas en el número de aislados en uno y otro ecosistema, ni relación entre las variables estudiadas, al 95% de confianza.

✓ Diferencias en el número de cocos grampositivos aislados, entre A y B:

AE	A=0'54	B=1'25	
CE	A=-1'22	B=-1'28	distribución normal
	F =6'58	p-valor=0'001	varianzas diferentes
	W = 65	p-valor=0,06	
	$\chi^2= 8'62$	p-valor= 0'003	

Los resultados indican, por un lado, que no existen diferencias significativas en el número de cocos grampositivos aislados en uno y otro ecosistema, al 95% de confianza. Por otro lado, el resultado del test de la χ^2 indica que existe relación entre el número de cocos aislado y el ecosistema en el que se han aislado, al 99% de confianza.

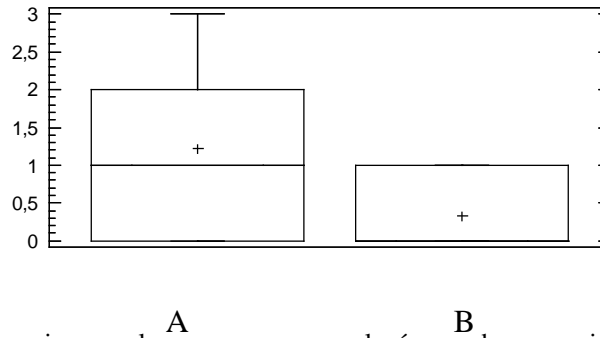


Figura 31. Gráfico de cajas, en el que se comparan el número de cocos aislados en los gansos de los grupos A y B. A: número de cocos de la población de gansos que llega al Parque. B: número de cocos de la población que está a punto de empezar de nuevo la migración.

✓ Diferencias en el número de bacilos grampositivos aislados, entre A y B:

AE	A=0'89	B=0'88	
CE	A=-0'3	B=0'43	distribución normal
	F=1'55	p-valor=0'42	varianzas iguales
	t=-1'67	p-valor=0'11	
	$\chi^2=3'6$	p-valor=0'06	

Estos resultados nos indican que las medias no son diferentes, y que, al 95% de confianza, hay que considerar que el número de bacilos grampositivos aislados en cada ecosistema es independiente del ecosistema.

Los resultados obtenidos en estos tres últimos ensayos matemáticos indican que el número de microorganismos pertenecientes a estos tres grandes grupos, de media, puede considerarse el mismo. Sin embargo, estudiando la relación entre el número de cada aislado total y el origen de la muestra, puede observarse que para los cocos existe algún tipo de relación, al menos, entre la presencia de estos microorganismos y la población de la que procede la muestra. Estos resultados indican que la proporción de microorganismos encontrados en el conjunto de las muestras para una y otra población, es diferente.

Además, en los grupos en los que el número medio de microorganismos no es significativamente diferente, se observan diferencias cualitativas por la presencia de especies diferentes.

5.2.3. Resultados en la Familia *Enterobacteriaceae*

Un ejemplo donde se observan diferencias cualitativas, y no cuantitativas (como se ha visto en el apartado 5.2.2.1.) es en el conjunto de los representantes de la familia *Enterobacteriaceae*. La especie encontrada, así como el número de veces, se refleja en la siguiente tabla:

Especie aislada	Gansos A (n° aislados)	Gansos B (n° aislados)
<i>Enterobacter amnigenus</i>	-	2
<i>Enterobacter asburiae</i>	-	1
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	1	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	4
<i>Enterobacter sakazakii</i>	-	1
<i>Escherichia coli</i> 1	1	-
<i>Pantoea sp</i> 2	-	1
<i>Pantoea sp</i> 3	4	1
<i>Providencia alcalifaciens</i>	1	-
<i>Serratia ficaria</i>	1	-
<i>Serratia rubidea</i>	1	-
Total	9	11

Tabla XXVIII. Especies de la familia *Enterobacteriaceae* aisladas en cada uno de los ecosistemas.

Se observa que el número de enterobacterias diferentes aisladas es ligeramente superior en el segundo grupo de observaciones. Así mismo, destaca la mayor variabilidad de géneros en el grupo de gansos A, contando 5, frente a 2 géneros diferentes encontrados en los gansos B, cuando han pasado más tiempo en el Parque.

Se realizó un análisis estadístico para estudiar si las diferencias en el número total de enterobacterias entre ambos grupos eran significativas. Los resultados, que se muestran a continuación, indican que no existen diferencias al 95% de confianza:

$$\begin{array}{l}
 \text{AE } A=2'45 \quad B=2'33 \\
 \text{CE } A=3 \quad B=2'47 \\
 \mathbf{W} = 23 \quad \text{p-valor} = 0'77
 \end{array}
 \quad \text{distribución no normal}$$

Debido a que el número de especies del género *Enterobacter* está representado en ambos grupos, se determinó si la diferencia en el número de aislados de este género,

para uno y otro ecosistema, puede considerarse significativa, utilizando el test estadístico de la χ^2 .

El resultado ($\chi^2 = 7.27$; p-valor = 0.007) indica que existe una relación, al 99% de confianza, entre el número de especies del género *Enterobacter* aisladas y el ecosistema del cual han sido aisladas, es decir, la población de gansos. Por tanto, el número de representantes del género *Enterobacter* es mayor en los gansos del grupo B.

5.2.4. Riqueza de los ecosistemas: extrapolación matemática

En total, se han aislado 57 especies diferentes del primer ecosistema y 65 especies del segundo. Como se trata de ecosistemas complejos, se ha realizado una extrapolación matemática para determinar la riqueza de cada uno de los grupos encontrados. Como se ha explicado en material y métodos, se han utilizado los test de riqueza Chao 2 y Jackknife de segundo orden (Colwell y Coddington, 1994).

Los resultados obtenidos son los siguientes:

		número aislados	extrapolación Chao 2	extrapolación Jackknife 2
total	A	57	464.11 (varianza: 25)	140.71
	B	65	1048.32 (varianza: 63)	176.59
enterobacterias	A	9	49.5 (varianza: 0)	25.07
	B	11	34.75 (varianza: 10)	28.19
cocos grampositivos	A	14	37.67 (varianza: 6)	34.99
	B	4	17.5 (varianza: 0)	14
bacilos grampositivos	A	28	420 (varianza: 0)	78
	B	44	1012 (varianza: 0)	123.2

Tabla XXIX. Resultados de abundancia de los diferentes grupos de microorganismos, para los grupos A y B, obtenidos mediante la extrapolación estadística, con los test Chao 2 y Jackknife 2.

Como se observa en todos los caso, el valor de abundancia que predicen ambos modelos matemáticos para cada grupo de microorganismos es considerablemente superior al número de microorganismos encontrados por el método de aislamiento en agar.

5.2.5. Abundancia del ecosistema

La medida de la abundancia de microorganismos encontrados se hizo sólo en base a los microorganismos aislados en agar sangre en aerobiosis. Como el análisis comparativo indica que el número de aislados diferentes no es significativamente diferente al número total de aislados, puede tomarse como referencia de la abundancia de los microorganismos existentes en el ecosistema intestinal.

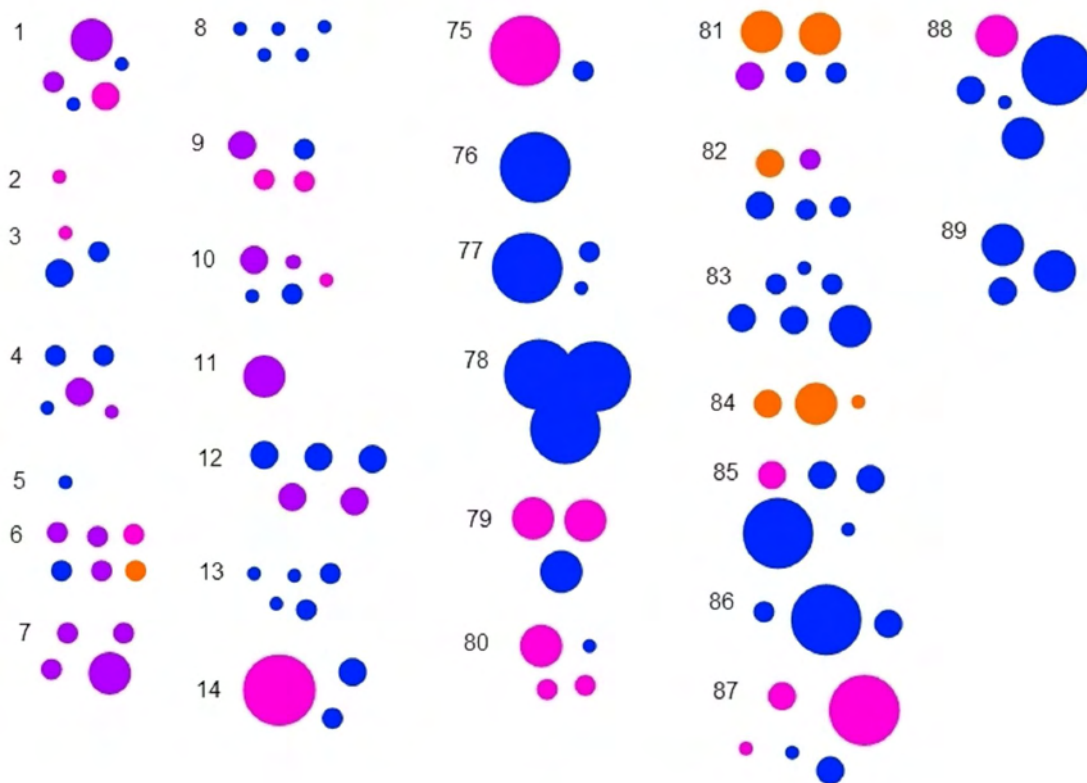


Figura 32. El número, indica el número de la muestra de ganso, del 1-14 pertenecen a los gansos del grupo A y del 75 al 89, a los gansos del grupo B. El diámetro de los diferentes círculos indica la abundancia de ese aislado en la placa, así 10 puntos de diámetro indica una colonia, 15 puntos, 2-5 colonias, 20 puntos, de 6-10 colonias, 30 puntos, de 10-20 y 50 puntos más de 20 colonias. Los colores indican qué tipo de microorganismo es, **rosa**: enterobacteria, **naranja**: otro bacilo gramnegativos, **morado**: cocos grampositivos y **azul**: bacilos grampositivos.

Como puede verse en la representación gráfica de las abundancias obtenidas, aunque el número medio de especies aisladas diferentes es el mismo en los dos ecosistemas, las abundancias son bastante superiores en el segundo, cuando las aves han pasado dos meses en Doñana.

5.2.5.1. Análisis matemático

Para confirmar que la observación visual tiene significación estadística, se han calculado las medias ponderadas de la abundancia de cada una de las placas observadas, obteniendo los resultados que se especifican en la tabla XXX.

Gansos grupo A		Gansos grupo B	
nº individuo ida	media ponderada	nº individuo regreso	media ponderada
1	2'2	75	3'5
2	1	76	5
3	2	77	2'67
4	1'8	78	5
5	1	79	4
6	2	80	2'25
7	2'5	81	3
8	1	82	2'4
9	2'25	83	2'5
10	1'6	84	2'67
11	4	85	3
12	3	86	3'33
13	1'4	87	2'6
14	3'33	88	3'4
		89	3'67

Tabla XXX. Medias ponderadas de abundancia. Calculadas para la flora fecal de cada individuo. 1-14 pertenecen a las muestras de los gansos del grupo A y del 75 al 89, a los gansos del grupo B

Comparando las medias ponderadas calculadas anteriormente, obtenemos que:

$$\begin{aligned}
 &AE \quad A=1'07 \quad B=1'61 && \text{distribución normal} \\
 &CE \quad A=0'05 \quad B=0'26 \\
 &F=1'09 \quad p\text{-valor}=0'87 && \text{varianzas iguales} \\
 &t=-3'62 \quad p\text{-valor}=0'001 \\
 &\chi^2=18'9 \quad p\text{-valor}= 0'0008
 \end{aligned}$$

Estos resultados indican que las abundancias de los microorganismos aislados son significativamente diferentes en uno y otro ecosistema. Por tanto, y en conjunto, los valores de abundancia observados en los gansos que han pasado dos meses en el Parque, son significativamente mayores. De este modo se confirma la conclusión obtenida en base a la representación gráfica (figura 32). Además, el test de la χ^2 indica que existe una relación entre la abundancia y el ecosistema analizado.

Aprovechando que tenemos tanto los datos de organismos aislados en agar MacConkey como el número de enterobacterias identificadas, se comprobó matemáticamente la especificidad del citado medio, partiendo de la hipótesis nula de que el número de microorganismos será el mismo.

$$\begin{array}{l} \text{AE } A=0'86 \quad B=2'47 \\ \text{CE } A=1'26 \quad B=2'26 \\ \text{W}=259'5 \quad \text{p-valor}=0'008 \end{array} \quad \text{distribución no normal}$$

De modo que los resultados, al 95% de confianza, indican que el número de microorganismos aislados en MacConkey es superior al número de enterobacterias, por lo que han crecido microorganismos que no pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* en el agar selectivo.

5.3. Discusión de los resultados

En el presente capítulo se han comparado dos ecosistemas intestinales diferentes. El objetivo ha sido observar la diversidad microbiana en dos hábitat naturales muy similares. Para ello, se ha tomado como objeto de estudio la microflora intestinal de una población de gansos. En la elección del tipo de población y muestra a estudiar se ha tratado de compensar la pérdida de información que supone el aislamiento e identificación de microorganismos por cultivo directo de la microbiota de una muestra, en detrimento del estudio de la biodiversidad por técnicas moleculares. Básicamente, las desventajas de la primera aproximación son debidas a que muchos microorganismos no puedan ser cultivados en el laboratorio como han demostrado diferentes autores (Hugenholtz et al., 1998; Amit-Romach et al., 2004; Eckburg et al., 2005; Rajilic-

Stojanovic et al., 2007; Walk y Young, 2008). De este modo, en lugar de comparar la flora de dos individuos diferentes de la misma especie, se ha optado por comparar el conjunto de la flora aislada de varios individuos de la misma especie, y de la misma población, que difieren en la estancia de éstos durante tres meses en el Parque Nacional de Doñana. Esta estancia corta y estacional se debe a la naturaleza migratoria de la población objeto de estudio: el ganso común, *Anser anser*.

Esta especie de ave migratoria se encuentra en las marismas de Doñana en los meses de invierno, entre finales de octubre a finales de enero-principio de febrero, cuando empieza su viaje de vuelta hacia las regiones de Europa del Norte, principalmente Dinamarca (Bernis, 1966). Durante su recorrido hacia el Guadalquivir estos ánsares se detienen en lugares favorables de los Países Bajos, en Francia, en especial en las zonas costeras del Atlántico y en multitud de biotopos húmedos de la Península.

El hábitat del ganso en verano e invierno es diferente, por ello nuestra hipótesis de partida para el presente trabajo, se basa en que la alimentación del hospedador será diferente, al menos en lo que respecta a los microorganismos ambientales asociados a los alimentos. Por tanto, la diferencia en el comportamiento de las aves en el lapso de tiempo en el que están invernando en Doñana, principalmente respecto a la ingestión accidental, o no, de microorganismos transeúntes y alóctonos, influirá en la composición de la microbiota intestinal del animal.

En este contexto, se ha definido cada ecosistema como el conjunto de los intestinos de los gansos en uno u otro momento en el tiempo. Y cada punto de muestreo, como cada uno de los gansos diferentes estudiados. Resumiendo, y utilizando una terminología puramente ecológica, se puede decir que: se ha realizado un estudio de la biodiversidad de dos ecosistemas diferentes, en los cuales se han muestreado 14 puntos en el primero y 15 puntos en el segundo. Estos 29 puntos se han escogido al azar. Para el muestreo de cada uno de estos 29 puntos se han utilizado diferentes métodos de muestreo, es decir, diferentes medios y atmósferas.

La explicación de por qué cada punto de muestreo es un animal diferente, en lugar de diferentes muestras del mismo animal, proviene del intento de eliminar la

variabilidad debida a cada individuo (Rajilić-Stojanović et al., 2007). Además, en esta primera aproximación, las diferencias se han establecido sólo en base al número de bacterias cultivables aisladas, obviando de forma consciente a más del 60% de bacterias que no se aíslan mediante métodos microbiológicos tradicionales (Hugenholtz et al., 1998; Amit-Romach et al., 2004; Eckburg et al., 2005; Rajilic-Stojanovic et al., 2007; Walk y Young, 2008), por ejemplo aquellas que necesitan requerimientos nutricionales específicos o preincubaciones previas. También se han pasado por alto a los microorganismos eucariotas. Uno de los casos más llamativos son los microorganismos del género *Arcobacter*, muy frecuentes en la flora fecal del ganso (Atabay et al., 2008). En este caso no ha sido aislado ningún representante del citado género por la no utilización del medios selectivos. En este trabajo, el único microorganismo con necesidades especiales de cultivo que se ha tratado de aislar ha sido *C. difficile*, debido a que se estaba buscando su presencia en la fauna salvaje.

La elección del ganso como el animal para estudiar la composición de su microbiota intestinal, se debe a dos motivos principalmente. El primero, es el comportamiento migratorio del ave, que siempre le ha proporcionado un supuesto papel como posible vector de enfermedades infecciosas como pueden ser clostridiosis por *C. perfringens*, salmonelosis, diarrea necrosante y distintas virosis como la influenza aviar o el virus del Nilo Occidental (Wobeser y Rainnie, 1987; Austin et al., 2004; Lillehaug et al., 2005; Atabay et al., 2008). El segundo es el aislamiento descrito de *C. difficile* en un ganso (Borriello et al., 1983). Este dato implica que *C. difficile* podría ser un habitante normal de la flora intestinal del ganso, justificándose de este modo el estudio del resto de microorganismos que comparten el mismo hábitat, en el marco del estudio del comportamiento ecológico de *C. difficile*. Si, por el contrario, asumimos que el animal en el que Borriello et al. (1983) realizaron el aislamiento procedía de una clínica veterinaria, y por tanto no era salvaje, cobra mayor importancia estudiar las diferencias microbiológicas entre los animales de la misma especie, domésticos y salvajes, para tratar de descifrar los factores que influyen en la colonización por parte de *C. difficile*. Y más aún, conociendo la importancia de los factores externos en la colonización, supervivencia y producción de toxinas por parte de *C. difficile* en el hospedador (Walk y Young, 2008).

En el presente trabajo se han aislado un total de 57 procariotas diferentes en el primer ecosistema y 65 en el segundo, como se ha descrito en los resultados. Estos resultados se compararon entre sí, para determinar si existían diferencias entre ambos ecosistemas y, de existir, cuáles eran.

La primera de la serie de comparaciones realizadas, ha sido el número medio de microorganismos aislados por muestra en cada uno de los ecosistemas. Este análisis matemático ayudará a interpretar tanto las diferencias cualitativas observadas como los valores de abundancia obtenidos. Además nos sirve de parámetro de control de la parte experimental, en ausencia de controles negativo y positivo. El resultado del citado análisis ha sido que el número medio de especies aisladas por cada punto de muestreo en total, y en ambos ecosistemas, es el mismo.

Esta misma comparación se ha realizado por cada uno de los medios de aislamiento utilizados, para estudiar las posibles diferencias entre uno y otro ecosistema. De este modo se ha obtenido que no hay diferencias entre el número medio de aislados en agar sangre en aerobiosis y anaerobiosis, ni en el número medio de aislados en agar MacConkey. Sin embargo, se observan diferencias en el número de aislados en Baird-Parker y en medio CLO. El agar Baird-Parker está diseñado para el aislamiento de estafilococos, aunque pueden crecer en él otros cocos e incluso algunas especies de *Bacillus*. El medio CLO está diseñado para el crecimiento de *C. difficile*, aunque como se ha descrito en el capítulo 3, pueden crecer otros microorganismos pertenecientes a diferentes géneros como *Clostridium*, *Paenibacillus* o *Weisella*.

Por otro lado, en un plano también cuantitativo, se han comparado el número medio de aislados en aerobiosis frente a los aislados en anaerobiosis. Mediante esta comparación se pretendió determinar qué tipo de microorganismo, en base a su tipo de respiración, es el predominante. Para el análisis de los resultados obtenidos hay que tener en cuenta que los microorganismos anaerobios facultativos serán los únicos que habrán crecido en ambas atmósferas. El intestino es un ecosistema con zonas anaerobias, microaerófilas y aerobias, con una microflora muy estudiada para otros animales incluido el hombre, dónde se han encontrado un gran número de anaerobios facultativos (Hugenholtz et al., 1998; Backhed et al., 2005; Ley et al., 2008b; Lu et al.

2009), por lo que cabrá esperar que los microorganismos anaerobios facultativos estén muy representados en nuestros ecosistemas de estudio también.

En la comparación del número medio de microorganismos aislados en agar sangre, en aerobiosis *versus* anaerobiosis, obtenemos que existen diferencias significativas en el número medio de aislados, siendo mayor el número de aerobios aislados por placa que el de anaerobios. Cuando el análisis se lleva a cabo diferenciando a los dos ecosistemas muestreados, se observa que cuando los gansos han pasado su periodo invernal en Doñana, las medias de aislados no son significativamente diferentes, mientras que en los gansos que acaban de llegar al Parque, sí lo son. Para llegar a esta conclusión, el límite de confianza ha sido del 95%; si se redujese al 90%, podríamos afirmar que existen diferencias significativas, dentro de cada ecosistema, entre el número de aerobios y anaerobios.

Sin embargo, en este caso concreto hay que tomar los datos con precaución debido a que los microorganismos anaerobios facultativos se caracterizan por su capacidad de crecer tanto en una atmósfera aerobia como en una anaerobia. Por ello, los resultados no se pueden dividir estrictamente entre microorganismos aerobios y microorganismos anaerobios, ya que en el cómputo global de aislados diferentes se habrán contabilizado microorganismos de ambos grupos.

Adicionalmente, se comparó el número de aislados totales con respecto al número de aislados en agar sangre en aerobiosis. En ese caso, el resultado indica que las medias son iguales, por lo que se puede asumir que en el agar sangre en aerobiosis encontramos representados a la mayoría de los aislados obtenidos mediante cualquier otro medio de aislamiento en nuestro experimento, excepto aquellos anaerobios estrictos. Este primer análisis matemático nos muestra que a nivel cuantitativo se observan pocas diferencias significativas entre los dos ecosistemas. Pero a esta mínima diferencia hay que añadir aquellas de carácter cualitativo. Éstas son las referidas a las especies concretas aisladas (tabla XXVII). Así, encontramos Enterobacterias del género *Enterobacter*, *Staphylococcus*, y Bacilos grampositivos como *Actinomyces* y *Bacillus* en ambos ecosistemas, además de los géneros *Serratia*, *Pantoea*, *Escherichia*, *Providencia*, *Stenotrophomonas*, *Flavibacterium* o *Streptococcus*, sólo en el primero, y *Pseudomonas*

y *Clostridium*, sólo en el segundo. También se encontraron un gran número de bacterias desconocidas.

En nuestro conocimiento, no se ha realizado ningún estudio de la flora fecal del ganso común, como el presente, pero sí podemos comparar los resultados con estudios realizados en el ganso canadiense. Los resultados obtenidos en el presente estudio coinciden parcialmente con los obtenidos por Damarè et al. (1979), quienes realizan un estudio de la flora fecal aerobia y anaerobia facultativa del ganso canadiense (*Branta canadensis*). Los géneros coincidentes son *Streptococcus*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Enterobacter* y *Pseudomonas*. Además identifican a otros microorganismos de los géneros *Arthrobacter*, *Lactobacillus*, *Klebsiella*, *Proteus* o *Alcaligenes*. En un estudio posterior, Lu et al. (2009) analizan los tipos bacterianos según su presencia en bibliotecas de ADN ribosómico de microbiota fecal de diferentes aves, entre ellas los gansos canadienses. En este trabajo no se identifican especies o géneros, sino órdenes taxonómicos mayores, entre los que observan *Actinomycetales*, “*Flavobacteriales*”, *Bacillales*, *Clostridiales*, *Pseudomonadales*, “*Enterobacteriales*”, presentes también en nuestras observaciones. Además encuentran otros microorganismos como *Rubrobacteriales*, *Bacteroidales*, “*Fusobacteriales*”, *Rhizobiales*, *Rhodobacterales*, *Burkholderiales* o *Campylobacterales*.

Como se ve, en los estudios de microflora, cada vez es mayor la tendencia de hacerlos en base a las secuencias de ADN que encontramos en las muestras y no con aislamientos tradicionales de los microorganismos. Dentro de esta tendencia, los microorganismos suelen identificarse en taxones superiores a los de especie como familias, órdenes o clases, como vemos en el trabajo de Lu et al. (2009). Así sabemos que los *Phyla* más representados en la flora gastrointestinal de los animales son los *Firmicutes*, y el conjunto de *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*, que en total representan más del 80% de las bacterias que se encuentran en las heces y mucus del epitelio (Backhed et al., 2005). Y en total, de las 55 divisiones bacterianas conocidas, sólo 12 se han descrito en la microflora del tracto gastrointestinal (Hugenholtz et al., 1998; Ley et al., 2008b). Este dato hace pensar a la mayoría de los autores que existe muy poca diversidad a nivel de grandes grupos taxonómicos, siendo por el contrario muy alta a nivel de especie, subespecie y cepas (Hugenholtz et al., 1998; Backhed et al., 2005; Ley et al., 2006).

Por ello se han comparado los diferentes grandes grupos de bacterias aisladas, de forma numérica primero, y a nivel de especie después. Comparando el número medio de bacilos gramnegativos aislados, se ha encontrado que no existen diferencias significativas en el número de aislados obtenidos, como tampoco se observan diferencias en el número de enterobacterias aisladas, la familia de gramnegativos más representada en la flora fecal. Este resultado coincide con el de la χ^2 , de modo que en este caso no se ha obtenido ninguna relación entre el número de bacilos gramnegativos aislados y la muestra de la cual proceden. Estos resultados pueden ser comparables con los de Alderisio y DeLuca (1999) quienes estudian el número de unidades formadoras de colonias (UFC) de coliformes fecales por gramo de heces, en gansos canadienses (*B. canadensis*). Estos autores encuentran gran variabilidad en cuanto al número de UFC, aunque no encuentran un patrón estacional que pudiera explicarlo y lo achacan a que la alimentación de estas aves se basa exclusivamente en el grano.

Con respecto al número de cocos grampositivos, aunque al 95% de confianza no se puede decir que existan diferencias, reduciendo el límite de confianza al 94%, se podría considerar que las diferencias son significativas. Para confirmarlo se realizó el test de la χ^2 , que nos ha indicado que existe algún tipo de relación entre el número de cocos y el ecosistema estudiado. Dado que se ha aislado un mayor número de cocos grampositivos en el conjunto de los gansos que acababan de llegar al Parque, eso indica que se han reducido durante su estancia, posiblemente debido a la ingestión de algún otro microorganismo que los ha desplazado del nicho intestinal.

En cuanto a los bacilos grampositivos, no se observan diferencias significativas en el número total de aislados. Sin embargo, cuando se analiza la posible existencia de una relación entre el ecosistema de procedencia y el número de estos bacilos, se ha obtenido que podría existir esa relación si se reduce el margen estadístico de confianza al 94%. En este caso, el número es más elevado en el segundo ecosistema, por lo que estos microorganismos se habrían incorporado al ecosistema durante la estancia en el Parque.

Por tanto, las diferencias con respecto a los tres grandes grupos identificados en uno y otro ecosistema se observan entre los cocos y los bacilos grampositivos. A la vista

de los resultados, durante la estancia de los gansos en el Parque, su ecosistema intestinal experimenta un proceso de sucesión ecológica en el que se los bacilos grampositivos sustituyen a los cocos grampositivos. La hipótesis más sólida es la de la ingestión accidental de éstos bacilos en el Parque y su posterior selección en el ecosistema intestinal. Los factores que podrían favorecer tanto la ingestión accidental como la selección, se describirán a lo largo de la presente discusión.

Por otro lado, las diferencias en especies se observan sólo con mirar el listado de especies aisladas para cada grupo. Las pruebas bioquímicas nos han permitido la identificación a nivel de especie de los microorganismos gramnegativos aislados pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. En este caso, tenemos prácticamente el mismo número de aislados en uno y otro ecosistema. Esto nos permite advertir claramente que en el primer ecosistema la diversidad en cuanto a géneros es mayor, pasando de 4, a 2 géneros. En contraposición, en el segundo ecosistema hay un género dominante en el ecosistema, *Enterobacter*, con 5 especies diferentes de este género frente a una presente en el primer ecosistema. En este caso hay que puntualizar que tres de las cinco especies, debido a su proximidad genética observada mediante hibridación del ADN, se reúnen en el complejo *E. cloacae* (*E. cloacae*, *E. absuriae* y *E. cancerogenus*) (Hoffman y Roggenkamp, 2003). Aún en el caso de identificar a todos los representantes del complejo como una misma especie, seguirá existiendo una diferencia de una frente a tres.

Además, el test matemático nos indica que para el género *Enterobacter* existe una relación entre su presencia y el ecosistema en el que se encuentra. Así tenemos que durante la estancia en el Parque, y en lo que respecta a las enterobacterias, disminuye la diversidad a nivel de género, aumentando a nivel de especie.

La alta variabilidad en especies observada por un lado, y la baja variabilidad de grandes grupos taxonómicos, por otro, coincide con los estudios de flora fecal llevados a cabo mediante estudios del gen ribosómico 16S en mamíferos (Bäckhed et al., 2005; Ley et al., 2006). Además, aparece una pérdida de variabilidad a nivel de especie que se da previsiblemente como resultado de la estancia de los gansos en el Parque de Doñana. Es plausible que durante la invernada, el cambio de dieta y de hábitat favorezcan la

sucesión ecológica dentro del intestino del ganso, estabilizando las poblaciones que encontramos en estos ecosistemas.

Como se ha especificado anteriormente, se han aislado 57 especies de procariotas diferentes en el primer ecosistema y 65 en el segundo. Sin embargo, se sabe que cuando se está tratando con ecosistemas complejos y taxones hipervariables, el número de organismos encontrados es inferior al número real (Colwell y Coddington, 1994; Eckburg et al., 2005; Rajilic-Stojanovic et al., 2007; Walk y Young, 2008). Por eso se realizó una extrapolación de la riqueza encontrada, tomada como número de especies diferentes, utilizando los dos métodos matemáticos no paramétricos que presentan menos desviaciones respecto del valor real en muestras pequeñas: Chao 2 y Jackknife de segundo orden (Colwell y Coddington, 1994). Estos métodos no paramétricos, muy utilizados en ecología de poblaciones, nos facilitan el análisis en los casos en los que sólo tenemos datos de la presencia o ausencia de una especie.

Se han realizado dos cálculos de extrapolación diferentes debido a que el número de especies aisladas ha sido bajo, y aunque estos métodos se han demostrado fiables para bajos números de muestras, los errores de extrapolación siempre son mayores. En general, los resultados obtenidos nos indican que el número real de microorganismos en los ecosistemas es de varios órdenes de magnitud superiores a los encontrados. En este caso concreto, los resultados obtenidos son diferentes, resultando mucho más altos los obtenidos con el método Chao 2 que con el Jackknife 2. En los siguientes párrafos se tomarán como una referencia para hacernos una idea de la riqueza microbiana que albergan los ecosistemas intestinales.

Cuando se analizan los resultados de forma global, es decir, incluyendo a todos los aislados diferentes encontrados, tanto en un ecosistema como en otro, las varianzas altas que se obtienen en el método Chao 2 indica que los datos presentan una alta dispersión por lo que cabe suponer que, en este caso, el error será mayor. En el ecosistema fecal de los gansos que acaban de llegar al Parque encontramos que se han aislado 57 especies diferentes, y según las extrapolaciones, habría de 3 a 9 veces microorganismos más (140'71 - 464'11). El ecosistema de los que ya han pasado la invernada, donde se han encontrado 65 especies, podría estar compuesto por un número de 3 a 16 veces superior (176'59 - 1048'32). En ambos casos, el número de especies

aisladas supone aproximadamente el 40% del número supuesto de microorganismos presentes en el ecosistema intestinal respectivo mediante el método de cálculo Jackknife de segundo orden. Este dato da consistencia al resultado, pues coincide con el número de microorganismos que se tiende a aislar con métodos tradicionales (Hugenholtz et al., 1998; Amit-Romach et al., 2004; Eckburg et al., 2005; Rajilic-Stojanovic et al., 2007; Walk y Young, 2008).

Cuando se calcula al respecto de la familia *Enterobacteriaceae*, los resultados finales son más cercanos. En el primer ecosistema, el valor real del número de aislados diferentes sería de 3 a 5.5 veces más (25.07 – 49.5) y en el segundo ecosistema, de 2.5 a 3 (28.19 – 34.75) veces más. Como se puede observar, el valor estimado para los *Enterobacteriaceae* en el segundo ecosistema obtenido mediante los dos análisis matemáticos diferentes es muy similar, así que en este caso, la estimación podría estar próxima al valor real.

Para el número de cocos grampositivos diferentes, también parece que los valores extrapolados son muy similares con los dos métodos, de forma que se ha obtenido que en el primer ecosistema, los cocos serían de 2.5 a 2.7 veces los 14 aislados (34.99 - 37.67). En el segundo, a partir de 4, el resultado es que habría de 3.5 a 4.3 veces más (14 – 17.5).

Respecto a los bacilos grampositivos, en el primer ecosistema, donde se han aislado 28, el cálculo indica que el número real es de 3 a 15 veces más (78 – 420). En el segundo, donde el número de aislados es de 44, los resultados apuntan a que realmente habría de 3 a 23 veces más (123.2 – 1012). A priori, los valores obtenidos extrapolando los datos parecen muy altos, sin embargo las varianzas son de cero en los dos casos, lo que indica que la dispersión de los datos es baja y por tanto la probabilidad de error será pequeña. Por tanto el resultado obtenido estará cercano al valor real.

Estos valores obtenidos a partir del cálculo de la riqueza se asemejan a los que se obtienen cuando el estudio de la flora bacteriana se hace mediante amplificación del gen ribosómico 16S y construcción de una librería genómica. Así por ejemplo, en el trabajo del ganso canadiense, a partir de 12 muestras se obtuvieron 447 secuencias génicas probables del gen ribosómico 16S para OTUs diferentes y a partir de 24

muestras, 302 secuencias génicas diferentes (Lu et al., 2009). Como se puede ver, la extrapolación de la riqueza del ecosistema por métodos no paramétricos, como los utilizados, representa una solución al inconveniente que plantea el aislamiento por metodología tradicional, en la realización de inventarios microbianos.

También se asemejan a los valores obtenidos en otras especies animales alejadas filogenéticamente como vacas o el ser humano, teniendo en cuenta que se utilizó Chao1, al menos en el primer caso. En este caso, las extrapolaciones se hicieron a partir de los OTUs diferentes obtenidos mediante secuenciación del gen ribosómico 16S, en muestras de humanos y vacas. Aún así, los valores son semejantes. La riqueza obtenida para el conjunto de muestras en cada uno de los dos ecosistemas en el presente trabajo son 464¹¹ y 1048³², respectivamente. A partir de las muestras de vacas, obtienen que las riquezas son, para cada uno de los 6 animales: 372, 600, 1393, 526, 612 y 320, respectivamente (Durso et al., 2010). En humanos los valores obtenidos son 164, 332 y 297 (Eckburg et al., 2005). La riqueza de la flora intestinal del ganso está dentro del rango de riqueza de las vacas y son mayores que las encontradas en humanos.

El estudio de ambos ecosistemas se completó con el estudio de la abundancia de los microorganismos crecidos en agar sangre. Esta medida se llevó a cabo sólo en agar sangre, debido a que se hipotetizó que en este medio, al ser un medio general, crecerían la mayor parte de los microorganismos cultivables que se fueran a aislar. La hipótesis ha sido confirmada previamente en los resultados: aislados totales obtenidos *versus* aislados en agar sangre en aerobiosis, ya que el número medio de aislados no se puede diferenciar en estos dos ecosistemas. Esto nos permite saber que el número de especies aisladas es el mismo en total y en agar sangre, y que, obviamente, todos los microorganismos que han crecido, pueden desarrollarse en agar sangre. Estas dos sentencias nos permiten comparar la abundancia de microorganismos cultivables en un medio general, representando a casi la totalidad de organismos aislados en el conjunto de los medios.

La interpretación de la abundancia de un ecosistema determinado se suele hacer mediante el cálculo de los índices de abundancia de Shannon o de Simpson, diseñados para el estudio de poblaciones animales o vegetales (Eckburg et al., 2005). Estos índices son útiles cuando manejamos una gran cantidad de muestras, ya que pueden utilizarse

como herramienta para analizar la frecuencia de los diferentes taxones encontrados, por ejemplo, en el estudio de microbiota mediante técnicas moleculares (Eckburg et al., 2005; Durso et al., 2010). Debido a que los resultados obtenidos en el presente trabajo son más limitados, para evitar errores se han implementados modos de comparación más sencillos.

Uno de estos métodos, de carácter visual, es la representación de los resultados mediante el gráfico proporcionado (figura 32). En este gráfico se observa que los aislados con mayores abundancias pertenecen al segundo ecosistema. Esta observación, unida al resultado obtenido de que el número de aislados, de media, es el mismo para los dos ecosistemas, indica que los microorganismos aislados del segundo ecosistema podrían estar más representados en el ecosistema de origen, ya que el número de colonias fue mayor. Para confirmar las observaciones matemáticamente, se estudiaron las medias ponderadas para cada uno de los puntos de muestreo (o individuos), y se compararon entre los dos ecosistemas. El resultado fue que eran significativamente diferentes. El análisis de la χ^2 indica que las abundancias están relacionadas con los ecosistemas de los cuales provienen las muestras.

La pregunta que cabría hacerse es por qué el crecimiento de los microorganismos es más abundante si las muestras proceden del segundo ecosistema. Para responder, primero hay que tener en cuenta que las especies microbiana no son exactamente las mismas, en uno y otro ecosistema, por lo que podría influir la diferente capacidad para crecer en agar sangre de unas respecto de otras. Sin embargo, algunas de las especies que encontramos sí ha crecido en ambos ecosistemas. Por ejemplo, *E. cancerogenus*, el cual ha crecido en la muestra 7 y en la 87. En la primera, el crecimiento es presencial, una colonia. En la segunda, tuvo una representación superior a 10 colonias. Debido a que se trata de la misma especie, asumimos que los requerimientos nutricionales son los mismos, por tanto los factores que determinarán esta diferencia en abundancia serían:

-El número de microorganismos de la muestra de partida. El número de microorganismos de la muestra de partida influye en la abundancia encontrada ya que el número de microorganismos que crecerán tras la siembra e incubación será proporcional a la cantidad de microorganismos que hubiera en la muestra.

-El resto de microorganismos crecido en el medio, que pudieran interferir en el crecimiento. En el caso concreto que se está analizando, los microorganismos que acompañan a *E. cancerogenus* en la muestra 7 son cocos grampositivos de diferentes especies. En la muestra 87 encontramos otras dos especies de *Enterobacter*: *E. amnigenus* y *E. cloacae* y dos bacilos grampositivos. Como se ha comentado anteriormente, estas tres especies de *Enterobacter* se clasifican dentro de un mismo complejo (Hoffman y Roggenkamp, 2003). Podría suceder que los cocos inhibieran más el crecimiento de *E. cancerogenus* o que al crecer entre bacterias tan próximas como son las otras especies de *Enterobacter* se protegiese y estimulase el crecimiento.

Resumiendo los datos expuestos anteriormente respecto a la diversidad de los dos ecosistemas, y la comparación derivada de esta observación, podemos decir que el número de bacilos gramnegativos se mantiene constante aunque cambian las especies. El número de cocos grampositivos se reduce y el de bacilos grampositivos aumenta, y además se ven especies diferentes. Este cambio en la composición del ecosistema se produce, como se ha descrito anteriormente, durante los meses de noviembre a febrero. En este periodo tan corto de tiempo los microorganismos llegarán por ingestión accidental de los mismos o cambios en la alimentación.

La dieta es uno de los factores clave en la proporción de microorganismos de la microbiota intestinal porque, además de establecer limitaciones nutricionales que pueden afectar al crecimiento de los microorganismos, con ella se ingieren microorganismos y sustancias naturales de forma accidental. El simple cambio de dieta puede favorecer el crecimiento de algunos microorganismos en detrimento de otros, derivando en un sobrecrecimiento bacteriano como ocurre en la enteritis necrosante de gansos salvajes observada por Wobeser y Rainnie (1987) y atribuida a un sobrecrecimiento de *C. perfringens*.

Respecto a la ingestión accidental, el ecosistema intestinal está constituido por microorganismos autóctonos y alóctonos, y como ya se introducía en el capítulo 3, es muy difícil diferenciar a unos de otros (Mackie et al., 1999). Esto indica que muchos microorganismos ingeridos accidentalmente pasarán a formar parte de la microbiota

como consecuencia de eventos de sucesión ecológica. Un ejemplo de cómo la ingestión de microorganismos no patógenos puede contribuir a la variación de la estructura del ecosistema microbiano intestinal de los animales es la demostración experimental de que la administración de *Lactobacillus* reduce el número de *Enterobacteriaceae* en gansos domésticos (Yaman et al., 2006), o que cambios en la dieta, se correlacionan con cambios en la composición de la microbiota (Mackie et al., 1999; Blanco et al., 2007).

El tercer punto es la ingestión de sustancias naturales, que tiene su importancia en el caso de los gansos, en el consumo de inhibidores de peptidasas presentes en legumbres y en algunos cereales (Wobeser y Rainnie, 1987). Estos inhibidores de peptidasas podrían ser clave en la inhibición de las peptidasas que hidrolizan proteínas secretadas por los microorganismos, como enzimas o toxinas.

El ganso es un animal herbívoro, con una digestión ineficiente, la cual debe ser compensada con una elevada ingesta de alimentos (Amat et al., 1991). Se ha observado que los gansos de Doñana se alimentan de los tubérculos y las semillas de las dos especies de juncos mayoritarias del Parque: *Scirpus maritimus* (*Bolboschoenus maritimus* [L.] Palla, *B. compactus* [Hoffm.] Drovar.) y *S. litoralis* (*Schoenoplectus litoralis* [Schrader] Palla), y de pasto de las praderas cercanas (Amat et al., 1991; García, 1996). Se conoce, asimismo, que *A. anser* digiere peor los tubérculos de *S. litoralis* que los de *S. maritimus* debido a la presencia de sustancias inhibitorias en los primeros, lo que implica que en condiciones de igualdad, los gansos consumen principalmente el tubérculo de *S. maritimus* (Amat et al., 1991), pero sin excluir a la otra planta de su dieta.

En estos animales se observan dos cambios etológicos asociados a su dieta. En primer lugar, durante el transcurso del invierno, la dieta cambia de estar dominada por los tubérculos a estar dominada por vegetación verde. Este cambio de dieta, de rica en carbohidratos a otra que incorpora una mayor cantidad de lípidos y proteínas al final del invierno también se ha observado, no sólo en especies de gansos, sino en casi todas las aves migratorias, como uno de los pasos previos a la migración (Bernis, 1966; Amat et al. 1991).

Por otro lado, la distribución de los juncos *S. maritimus* y *S. litoralis* es diferente. *S. maritimus* está distribuido por toda Europa, mientras que *S. litoralis* está relegado al área mediterránea (Global Biodiversity Information Facility. <http://www.data.gbif.org>). Esto implica el segundo cambio de dieta observado en los gansos, ya que la distribución de la planta propicia que *S. litoralis* sólo sea consumida en la “dieta de invierno” de los gansos.

Un tercer cambio, que en este caso proviene del hábitat del ganso, serán los microorganismos ambientales de este hábitat. Éstos microorganismos, tanto los del suelo como los de las marismas, estarán condicionados por el hábitat específico, por lo que, aunque no existe un estudio en profundidad de los mismos, es coherente proponer que serán diferentes a los del norte de Europa, simplemente por la hipótesis del ecotipo (Cohan, 2002).

Como estudio paralelo, y aprovechando los resultados del presente trabajo, se han comparado el número de enterobacterias crecidas con el número de microorganismos aislados a partir de agar MacConkey, para ver si el número de especies aisladas es el mismo. De este modo se pretendía conocer la capacidad del agar selectivo para aislar los microorganismos para los cuales es selectivo. Aunque el análisis comparativo ha tenido que hacerse mediante métodos no paramétricos, vemos que existen diferencias significativas en el número medio de aislados. Como el mayor número ha sido en MacConkey, se puede concluir que en este agar se ha aislado un mayor número de bacterias que las identificadas en total como enterobacterias. Una explicación es que hayan crecido microorganismos no enterobacterias en MacConkey, y que además se hayan tomado como diferentes aislados de MacConkey que en realidad eran la misma especie. Esta observación nos permite concluir que si el objetivo es estudiar la población de enterobacterias, aunque la siembra en MacConkey nos ayuda a una primera identificación, es necesaria una confirmación posterior, por ejemplo mediante tira API.

En un reciente trabajo que compara la microbiota intestinal de vacas para carne y vacas para leche, se concluye que las diferencias en diversidad (composición) observadas entre los animales individuales no pueden ser debidas a la dieta, género, edad o factores macroecológicos como el clima, ya que estos factores son los mismos

para todos los animales (Durso et al., 2010). Esto hace pensar, por tanto, que las características individuales de cada individuo tendrán gran importancia en los microorganismos que lo colonizarán. Esta conclusión válida, por un lado, el método de muestreo empleado en el presente capítulo de agrupar los resultados obtenidos de la flora fecal de varios individuos para poder comparar grupos de animales diferentes, ya que esto limita las variaciones intraespecíficas. Por otro lado, se sitúa en línea con las conclusiones desarrolladas en los capítulos anteriores sobre la variabilidad de las cepas de *C. difficile* dentro de una población animal (capítulo 2), o la influencia de la microflora gastrointestinal previa en la colonización de *C. difficile* (Walk y Young, 2008).

Capítulo 6

6.- Identificación de nuevas especies bacterianas

La identificación bioquímica de una cepa microbiológica resulta insuficiente, en muchas ocasiones, para conseguir identificar al microorganismo a nivel de especie. Esto se debe principalmente a dos motivos: el primero, de carácter sistemático, incide en que se trata de una identificación fenotípica, por comparación de caracteres morfológicos y bioquímicos, por lo que resulta en el mantenimiento de grupos parafiléticos a lo largo del tiempo, tal como ocurre con los clostridios. El segundo, de carácter práctico, se debe a que estudiando la flora normal de animales salvajes existe una alta probabilidad de encontrar bacterias desconocidas considerando la escasa proporción de microorganismos conocidos frente a los que se considera que existen (Curtis y Sloan, 2004).

La identificación por métodos moleculares, que se basan en la identificación del microorganismo por medio de una región concreta del genoma del organismo estudiado, es un campo en plena expansión. Una de las técnicas más empleadas al efecto es la secuenciación de un gen o un fragmento concreto del mismo.

La secuenciación consiste en la identificación de las bases nitrogenadas de un fragmento de ADN en el mismo orden en el que se encuentran en la molécula de ácido desoxirribonucleico. Una vez obtenida la secuencia, ésta se compara con las secuencias depositadas en las bases de datos internacionales para comparar y ver si hay alguna coincidencia. En caso afirmativo, podremos saber el nombre asignado al microorganismo. En caso negativo, nos encontraremos ante un microorganismo no descrito con anterioridad. Para poder comparar diversas especies de bacterias, es necesario secuenciar en todos los organismos el mismo gen. Por consenso, se utiliza el gen que codifica para el ARN ribosómico 16S, debido a que es un gen con una estructura muy conservada en todas las especies de microorganismos que contiene regiones muy variables (Woese et al., 1975). La secuenciación de este gen presenta la ventaja adicional de proporcionarnos información taxonómica del microorganismo (Ludwing, 2007).

6.1. Material y Métodos

6.1.1. Muestras

Las muestras son siete cepas de bacilos grampositivos anaerobio facultativos, aislados a partir de muestras fecales de gansos comunes salvajes (*Anser anser*) recogidas en el Parque Natural de Doñana. Concretamente:

Identificación bioquímica	Nombre cepa
<i>Bacillus sp.</i> (2)	DOAN 4/2
Bacilo grampositivo (5)	DOAN 4/5
Bacilo grampositivo (7)	DOAN 6/4
Bacilo grampositivo (8)	DOAN 8/2
<i>Bacillus sp.</i> (4)	DOAN 12/1
<i>Corinebacillus /Bacillus sp.</i> (6)	DOAN 12/5
<i>Bacillus sp.</i> (7)	DOAN 13/1

Tabla XXXI. Cepas aisladas de la flora fecal de gansos. Junto a cada identificación bioquímica se cita el nombre de la cepa asignado en el transcurso del trabajo.

6.1.2. Secuenciación

6.1.2.1. Extracción del ADN

La extracción del ADN de las muestras se realizó mediante el protocolo de extracción manual referido en el capítulo I.

6.1.2.2. Primers utilizados

Se utilizaron primers universales para eubacterias, basados en regiones muy conservadas del gen ribosómico 16S y que lo flanquea por ambos extremos:

8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')

1492R (5'-GGGTTACCTTGTTACGACTT-3')

- El producto de amplificación que se espera es de un tamaño de 1500 pb (Vickerman et al., 2007), lo que representa la casi totalidad del gen que codifica para el ARN ribosómico 16S.

6.1.2.3. Metodología

Para la mezcla de reacción se utilizaron microesferas PuReTaq™ Ready-To-Go™ PCR (GE Healthcare, UK), cada una de las cuales contiene:

- dNTP a 200 µM
- KCl a 50 mM
- MgCl₂ a 1'5 mM
- Buffer tris-HCl a 10 mM
- 2'5 U de TaqPolimerasa.

A las que se añadieron, por reacción, 4 µl de primer 8F a 25 pmol, 4 µl de primer 1492R a 25 pmol y 10 µl de ADN problema. Cada reacción se llevó a un volumen final de 25 µl con agua mili-Q estéril.

Se amplificó por PCR la casi totalidad del gen ARN 16S (~ 1500pb), en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, USA) programado como se especifica a continuación:

- desnaturalización inicial, durante 3 minutos a 94°C
- amplificación, durante 30 ciclos: desnaturalización, 1 minuto a 94°C
anillamiento, 1 minuto a 60°C
elongación, 1 minuto a 74°C
- elongación final durante 1 minuto a 72°C.

La amplificación se consideró correcta cuando, al observarse la electroforesis de una alícuota de la misma en un gel de agarosa al 1'6%, mediante tinción con Bromuro de Etidio y bajo luz UV, se observa una banda de 1500 pb.

Los amplicones se purificaron utilizando el kit de purificación de PCR QIAquick. Para ello se añadió al producto de PCR obtenido, el buffer PBI con un

volumen 5 veces superior al volumen del producto de la reacción. Esta mezcla se deposita sobre la columna de purificación, que se centrifuga durante 1 minuto a 13000 rpm. Después se le añaden 750 µl de buffer PE y se centrifuga de nuevo 1 minuto a 13000 rpm. Tras colocar un recipiente limpio y estéril bajo la membrana, se le añade el volumen de agua mili-Q estéril final, que dependerá de la concentración a la que estuviera previamente el producto de amplificación, y se centrifuga nuevamente 1 minuto a 13000 rpm. Este último paso, la dilución en agua mili-Q constituye una variación del protocolo del fabricante, por consideraciones técnicas de la secuenciación.

Los productos de amplificación purificados se secuenciaron mediante un secuenciador multicapilar "ABI Prism 3730" utilizando los mismos dos primers (8F; 1492R) que para su amplificación. De este modo el gen amplificado se secuenció desde sus dos extremos.

Las secuencias obtenidas fueron procesadas utilizando Applied Biosystems® Sequence Scanner Software v1.0; un software para la obtención del reverso y complementario (<http://www.vivo.colostate.edu/molkit/manip/>); y el programa de GenBank para detectar identidades mediante el BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). En este caso, al estudiar la secuencia completa del gen, la similitud para poder hablar de la misma especie es del 97% (Drancourt et al., 2000).

6.1.3. Análisis de las secuencias

Dos de las secuencias obtenidas (GU592670; GU592671), debido a su escasa homología con el resto de secuencias integradas en la base de datos PubMed, fueron sometidas a un análisis estadístico para verificar que no presentasen anomalías. Mediante este análisis se comparan dos secuencias, y se calcula la probabilidad de que la secuencia problema y la secuencia “patrón” pertenezcan al mismo gen.

En este caso se ha utilizado el programa informático Pintail (<http://www.bioinformatics-toolkit.org/Web-Pintail/>). Este programa calcula cuánto se diferencian dos secuencias, cuánto se espera que se diferencien en base a la estructura del gen, y la diferencia entre el valor real y el esperado (DE). En base a esos valores,

calcula la probabilidad de que dos secuencias que difieren X, puedan presentar esa diferencia entre el valor real y el esperado.

6.2. Resultados

Los aislados secuenciados parcialmente para su identificación, procedentes de la flora fecal de gansos, fueron 7. El ADN se amplificó correctamente, y a partir de él se obtuvieron fragmentos de aproximadamente 1500pb (Fig. 20). Las secuencias del gen RNA 16S obtenidas se pueden consultar en el “GenBank”. Éstas han sido introducidas como pertenecientes a un mismo grupo ecológico, bajo la denominación de “bacterias desconocidas de flora fecal de ganso”, debido a que fueron aisladas de la flora fecal de gansos diferentes, que invernan todos ellos en el Parque Nacional de Doñana. Los aislados pertenecen a 7 especies bacterianas desconocidas hasta el momento.

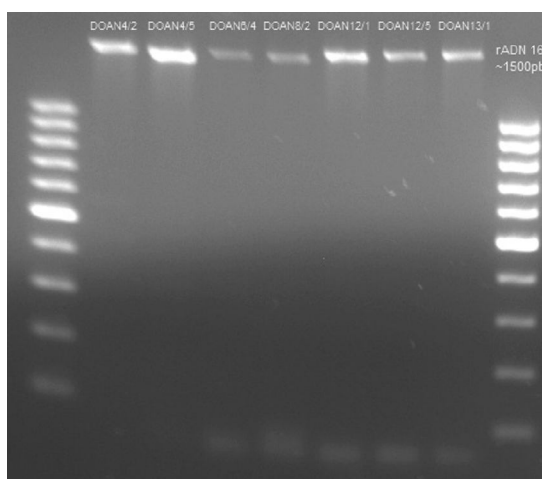


Figura 33. PCR de amplificación del gen ribosómico 16S. Primer y último carril con ladder. El resto de carriles, son los diferentes amplicones de ADN, del gen ARN 16S, de los aislados procedentes de gansos, DOAN4/2, DOAN4/5, DOAN6/4, DOAN8/2, DOAN12/1, DOAN12/5 y DOAN13/1, respectivamente.

6.2.1. Descripción de nuevas especies bacterianas

A continuación, se describirá a cada uno de los aislados, especificando el número de cepario (cepa-aislado-especie), el número de acceso del GenBank (Accession Number), caracteres macroscópicos, caracteres microscópicos, pruebas bioquímicas, secuencia del gen ARN16S introducida en el Gen Bank, fragmentos del mismo gen no introducidos en la base (desde extremo 1492R), los resultados de la herramienta BLAST, y la posible filogenia en base a las especies introducidas.

- Aislado DOAN 4/2 (GU592670)

El aislamiento de esta cepa se llevó a cabo en agar sangre. Las colonias son blanco grisáceas, aplanadas. Al microscopio óptico se ven como bacilos grampositivos, pequeños y esporulados. Respecto a la bioquímica, sólo se estudió su reacción frente al peróxido de hidrógeno, resultando ser catalasa positiva.

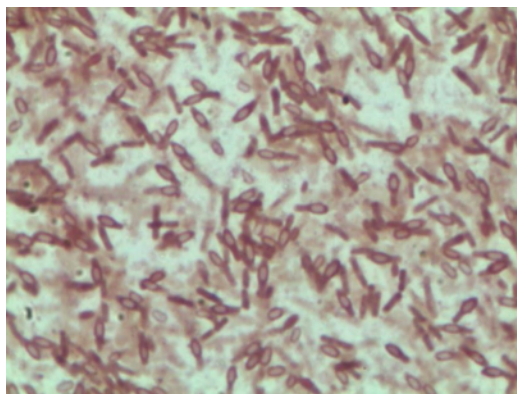


Figura 34. DOAN 4/2

El resultado de la secuencia que se explicitará a continuación se ha obtenido uniendo la secuencia obtenida del gen ARN 16S desde el extremo 3' (mediante el primer 8F) y desde el extremo 5' (mediante el primer 1492R). En total, se han amplificado 1333 pares de bases, repartidas en la siguiente proporción: 24'9% A (adeninas), 24% C (citosinas), 28'2% G (guaninas) y 19'7% T (timinas). El porcentaje de adenina-timina (A-T)= 44'6% y el de guanina-citosina (G-C) =52'2%.

```

1      ttcggggngg ntgccacnnc attgcaagnt cgcagancna gnctanncca aagcttgctt
61     cccaaagaat tagacggcgg acggggtgga gctaacacgg tgggctaacc gtgcctggta
121    agattgggat aactccgggg aaaccggagc taataccgga taacattttg aaccgcatgg
181    ttcaaaattg aaagacggct tcngctttca cttaccnatg gaccgcgggg gcattagctt
241    gttggggagg taaccgctca cccagggaac cattcnaac ccantnaaa gggggatcng
301    cccactggg  actgaaaccc cgtcnaact ccttcnggag ggagnagtag ggaatcttcc
361    ccaatggacg aaagtctnac ngaacaacnc cccagaacc  attaaggcct tccggnccta
421    aagttctntt gntaggggag aaccagtacc cnantaactg ctgggacctt gncngncct
481    aaccgaaaag ccncnggtaa ctncctgccc gcagccccgg taatacctnn gtggcaagcg
541    ttgtcccga  ttattgggcn  taaagcgggc gnangncgnt tcttaagtct taagtgaag
601    cccacggntc aaccgtggag ggtcattgga aacttgggaa cttgagtgca gaagaggaga
661    gtggatttcc acgtgtaacg gtgaaatgcy tagagatggg gaggaacacc agtggcgaag
721    gcgactctct ggtctgtaac tgacgctgag gcgcgaaagc gtggggagcg aacaggatta
781    gataccctgg tagtccacgc cgtaaacgat gagtgctaag tgttagaggg tttccgcctt
841    ttagtgctgc agcaaacgca ttaagcactc cgctgggga  gtacggtcgc aagactgaaa
901    ctcaaaggaa ttgacggggg cccgcacaag cggtgagca  tgtggtttaa ttcgaagcaa
961    cgcgaagaac cttaccaggt cttgacatcc ttcgctactt ctagagatag aaggttcccc
1021   ttcgggggac gaagtgacag gtggtgcatg gttgtcgtca gctcgtgctg tgagatgttg
1081   ggттаagtcc cgcaacgagc gcaacccttg atcttagttg ccagcattca gttgggactt
1141   ctaaggtgac tgccggtgac aaaccggagg aaggtgggga tgacgtcaaa tcatcatgcc
1201   ccttatgacc tgggctacac acgtgctaca atggatggta caaagggctg caagactgcg
1261   aagtcaagcc aatcccataa aaccattctc agtteggatt gcaggctgca actcgctgctg
1321   atgaagccgg aat

```

El número de acceso de la presente secuencia, en el GenBank es (GU592670). Tras analizarla mediante BLAST, el organismo cuyo gen ribosómico presenta mayor

similitud es *Bacillus humi* strain P2P3 (EU221387.1), con un 92% de identidad y un 92% de cobertura. Con el gen que presenta mayor cobertura, un 96%, es con la secuenciación parcial del gen ribosómico de una bacteria encontrada en hielo glacial G500K-19 (AF479330.1), con un porcentaje de similitud del 92% también. Con ese porcentaje de identidad tan bajo, no se puede incluir a este microorganismo dentro del género *Bacillus*, pero gracias al árbol filogenético construido con las herramientas del BLAST podemos situar a este especie bacteriana dentro del *Phylum Firmicutes*, y cercana al género *Bacillus*.

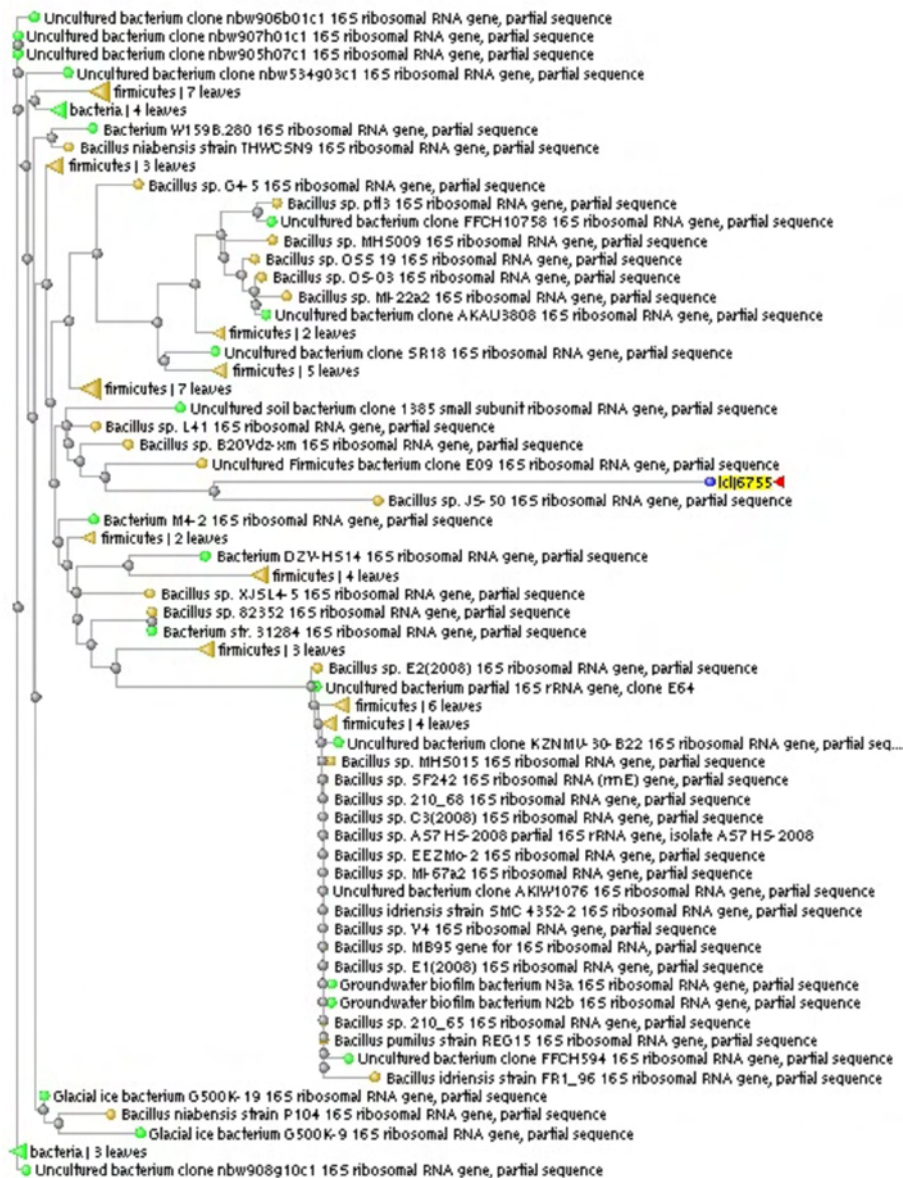


Figura 35. Árbol filogenético para la cepa DOAN 4/2, identificado en la imagen como lcl/6755 (resaltado en amarillo). El árbol ha sido construido siguiendo el método de unión de vecinos (Neighbor-joining), gracias las herramientas disponibles en el BLAST del nih (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Debido a la gran diferencia entre la secuencia de ARN ribosómico 16S obtenida de la cepa DOAN 4/2 y el resto de secuencias de ARN ribosómico 16S almacenadas en la base de datos del GenBank, hubo que someterla a un análisis adicional. Este análisis es un estadístico calcula que la probabilidad de que la diferencia encontrada esté dentro del rango de lo esperable. DOAN 4/2 (GU592670), comparada con la secuencia con la que presenta más homología, EU221387.1, muestra una distancia real de 7'64 y una diferencia entre la distancia real y la distancia esperada (calculada) de 7'83, siendo la probabilidad de que dos secuencias no anómalas presenten este valor de $p < 0'001$. Según el análisis, esto podría ser evidencia de anomalías en la secuencia analizada.

- Aislado DOAN 4/5 (GU592671)

El aislamiento de esta cepa se llevó a cabo en agar sangre. Las colonias son de color gris oscuro, aplanadas y grandes. Al microscopio óptico se ven como bacilos grampositivos. Las pruebas bioquímicas muestran que es catalasa positiva, coagulasa negativa y móvil. Además es anaerobia facultativa.

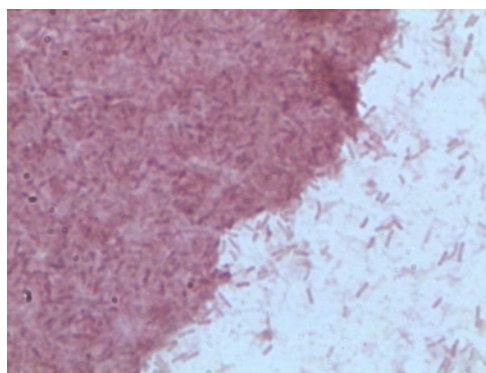


Figura 36. DOAN 4/5

El número de pares de bases secuenciados para el gen ribosómico 16S para esta bacteria, asciende a 1463, con la siguiente proporción: 24'1% A, 23'7% C, 29'3% G y 20'6% T (34 bases indeterminadas). El porcentaje conjunto de A-T=44'7% y de G-C=53%. La secuencia obtenida, a partir del extremo 3', es la siguiente:

```

1   atnccgcncc ctatcatgcn aggtcgcagt cggatcttca ttagcttgct tttgaagatc
61  ancggcggac gggtgagtaa cacggtgggc aacctgcctg taagactggg ataacttcgg
121 gaaaccgtga gctaataaccg gataatcctt tcctcacat gagggaaagc tgaagacgg
181 tttcggctgt cacttacaga tgggcctgcg tcgcactagc tagttggtga ggtaacggct
241 caccaaggca acgatgcgta gccgacctga gagggtgatc ggccacactg ggactgagac
301 acggcccaana ctacctacggg aggcagcagt agggaatctt ccgcaatgga cgaaagtctg
361 acggagcaac ggcgcgtgaa cgatgaaggc cttcnggtcg taaagtctg ttgtcagaga
421 agaacaagtn ccggagtaac tgccngtacc ttgacngtgc ctgaccagaa ngccncgggt
481 aactacatgn cncancncnc tgtaatacgt atgtggcaag cgttgactg aattattggg
541 tgtaaagcnc ggcgaggccg ntccttaagt ctgatgtgaa agccccggc tcaaccctgt
601 agggctcattg gaaactgggg aacttgagtg cagaaaagga gagcggactt cctcatgtat
661 cgntgaaatg cgtagagatg tggaggaaca ccagtggtg atcgcggttc tttcgcctg
721 ttactgacgc ttcaggcgtc gatcgtggg gagcgaacag gattacaacc cgtggtagtc
781 cacaccgtaa acgatgagtg ctaaatgtta gagggtttc tccttttagt ggcgagcaa
841 tngcattaag cactccgcct ggggagtacg gacgcaaggc tgaaactcna aggaattgac
901 gggggcccg acnagcggtg gagcatgtgg tttaattcga agcaacgcga agaacttac
961 caggctctga catcctgtga caaccctaga gatagggcgt tccccttcgg gggacagagt

```

1021 gacaggtggt gcatggtngt cgtcagctcg tgtcgtgaga tgttggggtta agtcctgcan
 1081 cgagcgcaac cttgatctt agttgccagc agtcagttgg gcactctaag gtgactgccg
 1141 gtgacaaacc ggaggaaggt ggggatgacg tcaaatacctc atgcccctta tgacgtgggc
 1201 tacacacgtg ctacaatgga tggaaacaaag ggtcgccgaa gccgcgaggt cgagccaatc
 1261 ccataaatcc attctcagtt cggattgcag gatgcaatct cgccatgcan gaagcaggaa
 1321 tcgctagtaa tngcggatca gcatgcnngc gtgaatacgt tcccgggctc tgtacaccac
 1381 cgccngtcac accntgagag tttgtaacac ccgaagtacg gtggggtaac ctttantgga
 1441 agccagccgn ttaaggtgnc aat

El número de acceso de la presente secuencia en el GenBank es GU592671. Tras analizar la secuencia con el BLAST, muestra que la mayor coincidencia es con la secuencia parcial del gen ribosómico 16S de *Bacillus selenatarsenatis* cepa S3-3 (FJ373030.1), siendo ésta del 93% con una cobertura del 99%. Es similar con el mismo porcentaje de identidad (93%) a otro representante del género *Bacillus*: *B. boroniphilus*, en este caso con una cobertura del 98%. Como en el caso anterior, el porcentaje de identidad es tan bajo que no podemos aceptar que este microorganismo pertenezca al género *Bacillus*. Sin embargo, el análisis filogenético que se muestra a continuación, lo incluye muy próximo a este género, incluyéndolo por tanto en el *Phylum Firmicutes*.



Figura 37. Árbol filogenético para la cepa DOAN 4/5, identificado en la imagen como lcl/6433 (resaltado en amarillo). El árbol ha sido construido siguiendo el método de unión de vecinos (Neighbor-joining), que se basa en emparejas OTUs (Unidades taxonómicas funcionales) (Saitou1987), y basándonos sólo en el gen ribosómico 16S, y realizado gracias a las herramientas disponibles en el BLAST del NIH (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

En el caso de DOAN 4/5, debido a la también gran diferencia con la secuencia más próxima, fue necesario llevar a cabo el análisis estadístico. Comparando ambas secuencias, muestra una distancia real de 6'77 y una diferencia entre la real y la esperada de 3'97, siendo la probabilidad de que dos secuencias no anómalas presenten este valor de $p < 0'05$. Según el programa, podría ser una diferencia asumible, y más si analizamos el gráfico en el que se representa la distancia en cada región de la secuencia (Fig. 38). En este gráfico podemos observar que en las zonas donde más distancia se observa, es en las zonas hipervariables del gen, aproximadamente en el nucleótido número 624.

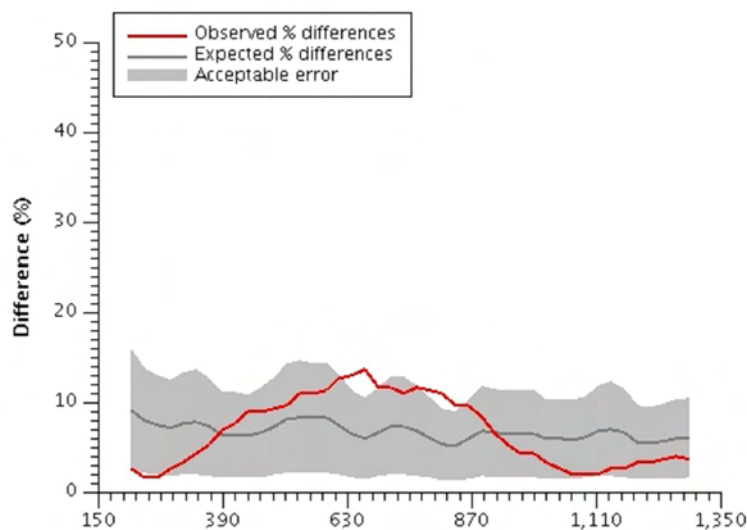


Figura 38. Gráfico que muestra el porcentaje de diferencia observadas y esperadas entre las cepas DOAN 4/5 y *Bacillus selenatarsenatis* cepa S3-3. En el eje de abscisas se representa el número de base nitrogenada y en el eje de ordenadas, el % de divergencia.

- Aislado DOAN 6/4.

El aislamiento de esta cepa se llevó a cabo en agar sangre. Las colonias son grandes, de color amarillo huevo. Al microscopio óptico se ven como bacilos grampositivos, pequeños, no esporulados. En las pruebas bioquímicas, además de la evidente presencia de pigmentos, se determinó que el

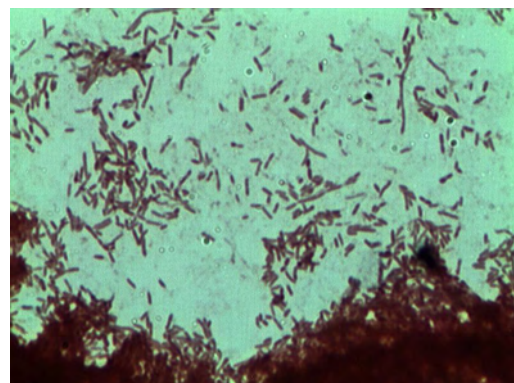


Figura 39. DOAN 6/4

microorganismo era catalasa positivo e inmóvil. Por su respiración es anaerobio facultativo.

La secuencia obtenida para el gen ribosómico 16S presenta un tamaño de 1399 pares de bases, distribuidas del siguiente modo: A=26.7%; G=29.4%; C=21.8%; T=21.7%, con un porcentaje de A-T= 48.5% y G-C=51.3%. La secuencia es la siguiente:

```

1      cgggggcgng aaacncatgc agtcgagggg tagaagtctt cggnccttga gaccggcgca
61     cgggtgctga acgcgtatgc aatctgcctt gtacaaaagg atagcccaga gaaatttggg
121    ttaatacctt atagtatact gatgtggcat cacattaata ttaaagattt atcgggtacaa
181    gatgagcatg cgtcccatta gctagttagt atggtaacgg cataccaagg caatgatggg
241    taggggtcct gagagggaga tccccacac  tggtagtgag acacggacca gactcntacg
301    ggaggcagca gtgaggaata ttggacaatg ggcgcaagcc tgatccagcc atgccgcgtg
361    caggatgacg gtcctatgga ttgtaaactg cttttatacg ggaagaaacc ctggctcgtg
421    agccagattg acggtaccgt aggaataagg atcgggtaac tccgtgccag cagccgcggg
481    aatacggagg atccaagcgt tatccggaat cattgggttt aaagggccg taggaggctt
541    tataagtcag tgggtgaaatc cggcagctca actgtcgaac tgccattgat actgtagagc
601    ttgaattatt gtgaagtaac tagaatatgt agtgtagcgg tgaatgctt agagattaca
661    tggaaatcca attgcgaagg caggttacta acaatcgatt gacgctgatg gacgaaagcg
721    tgggtagcga acaggattag ataccctggt agtccacgcc gtaaaccgat gatactagct
781    gtttggcagc aatgctgagt ggctaagcga aagtgataag tatcccacct ggggagtagc
841    aacgcaagtt tgaactcaa aggaattgac gggggcccgc acaagcggtg gagcatgtgg
901    tttaattcga tgatacgcga ggaaccttac cagggcttaa atgtagtggg acaggcttgg
961    aacaggccc  ttcttcggac tcattacaag gtgctgcatg gttgtcgtca gctcgtgccg
1021   tgagggtgca ggtaagtcc  tataacgagc gcaaccctg  ttgttagttg ccagcgagtc
1081   aagtcgggaa ctctaacaag actgccggtg caaacctgga ggaaggtggg gatgacgtca
1141   aatcatcacg gcccttacgt cctgggctac acacgtgcta caatggccgg tacagagagc
1201   agccactggg tgaccaggag cgaatctata aaaccggcca cagttcggat tggagtctgc
1261   aaccgcactc catgaagctg gaatcgctag taatcggata tcagccatga tccgggtaat
1321   acgttcccgg gccttgtaca caccgcccgt caagccatgg aagctggggg tacctgaagt
1381   cggtgacccg caaggagcg

```

El número de acceso de esta secuencia en el GenBank es GU592669. Tras introducirla en el programa BLAST, se identifica que coincide en un 97%, con una cobertura del 99% de la secuencia con dos clones diferentes de bacterias no “cultivadas”: el clon FCPT658 (EF516633.1) y el clon WC1_b60 (GQ263816.1). La siguiente secuencia de gen ribosómico con la que coincide, pertenece a *Chryseobacterium sp.* UOF CM895 (AY468453.1) con un porcentaje de identidad del 96% y una cobertura del 98%.

Debido a que la mayor similitud que presenta es del 97 %, podríamos aceptar que se tratan de la misma especie que uno de los dos clones con los que presenta esta similitud. Sin embargo, es dudoso ya que en ambos clones se especifica que son bacterias no cultivadas, en contraste con DOAN6/4, que ha sido aislado en cultivo. Con

Chryseobacterium sp. sólo comparte un 96% de bases, insuficientes para determinar que el microorganismo estudiado pertenece a ese género. Una conclusión similar se obtiene al estudiar el árbol filogenético.



Figura 40. Árbol filogenético para la cepa DOAN 6/4, identificado en la imagen dentro del grupo marcado en amarillo y denominado bacteria/2 levels. El árbol ha sido construido siguiendo el método de unión de vecinos (Neighbor-joining), gracias las herramientas disponibles en el BLAST del nih (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

- Aislado DOAN 8/2.

Esta cepa se aisló a partir del cultivo en agar sangre. Las colonias son de color blanco. Al microscopio óptico, su forma es de bacilo, grampositivo. Respecto a la bioquímica, es catalasa positiva.



Figura 41. DOAN 8/2

Al analizar la secuencia obtenida a partir del gen ribosómico de esta cepa, no se encontraron coincidencias entre la secuenciación

obtenida desde el extremo 3' (primer 8F) y la obtenida desde el extremo 5' (con el primer 1492R), por lo que sólo se introdujeron en el GenBank los primeros 627 pares de bases del gen, que son los que se especificarán a continuación. La proporción de bases es la siguiente: 26'6% A; 22'2% C; 31'4% G y 19'3% T. La proporción A-T es del 45'5% y de G-C del 53'6%.

```

1   aatcatgcag atcgagcgaa tcgatgggag cttgctccct gagattagcg ggggacgggt
61  gagtaacacg tgggcaacct gcctataaga ctgggataac ttcgggaaac cggagctaata
121 accggatacgttcttttctc gcatgagaga agatggaaag acggtttacg ctgtcactta
181 tagatgggcc cgcggcgcat tagctagttg gtgaggtaat ggctcaccaa ggcgacgatg
241 cgtagccgac ctgagagggg gatcggccac actgggactg agacacggcc cagactccta
301 cgggagcgag cagtagggaa tcttccgcaa tggacgaaag tctgacggag caacgcccgcg
361 tgaacgaaga aggccttcgg gtcgtaaagt tctggtgtaa gggaagaaca agtaccagag
421 taactgctgg taccttgacg gtnccataacc agaaagccac ggctaactac ntgccagcag
481 ccgcggtaat acgtangtgg caagcgttgt ccggaattat tggngtaaa gcgcgcgag
541 gtggttcctt aagtctgatg tgaaagccca cggctcaacc gtgnanggtc attggaaact
601 ggggaacttg agtgcagaag aggaaag

```

El número de acceso de esta secuencia en el GenBank es GU592674. Analizándola con la herramienta BLAST se obtuvo que DOAN 8/2 presentaba la mayor homología con bacterias integrantes de dos géneros diferentes, en ambos casos con un 98% de cobertura del gen y un 99% de homología. Estos son *Brevibacterium* sp. MB140 (AB536965.1) y *Bacillus* sp. R383 (GQ475517.1). Curiosamente, con dos microorganismos de los mismos géneros, para los cuales la cobertura de secuenciación ha sido del 99%, muestran una similitud del 98% [*Bacillus* sp. MM1(2008) (FJ228145.1) y *Brevibacterium* sp. MB150 (AB536974.1)]. El alto grado de similitud impide poder diferenciar si DOAN 8/2 pertenece al género *Bacillus* o *Brevibacterium*, además las escasas pruebas bioquímicas realizadas impiden diferenciar entre ambos géneros pues ambos son bacilos grampositivos, anaerobios facultativos, catalasa positivos. En el árbol filogenético se observa un mayor parentesco con miembros del género *Bacillus*:



Figura 42. Árbol filogenético para la cepa DOAN 8/2, identificado en la imagen dentro del grupo marcado en amarillo y denominado bacteria/2 levels. El árbol ha sido construido como los anteriores.

- Aislado DOAN 12/1.

Esta cepa se aisló a partir del cultivo en agar sangre. Las colonias son blanco-grisáceas, de tamaño mediano-grande y superficie rugosa. A su alrededor se observan halos de hemólisis. Al microscopio óptico se ven como bacilos grampositivos, con forma atípica. Respecto a la bioquímica, sólo se estudió su reacción frente al peróxido de hidrógeno, resultando ser catalasa positiva.

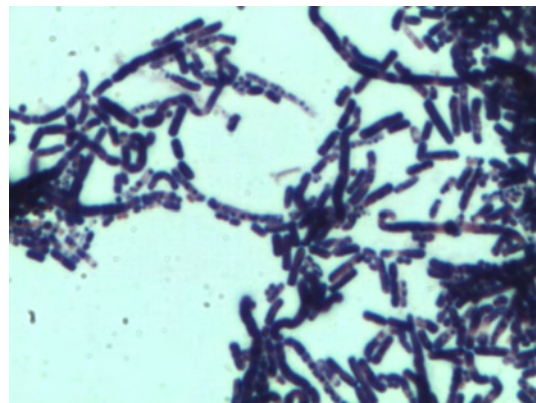


Figura 43. DOAN 12/1

La secuenciación del gen ribosómico 16S nos proporcionó un fragmento de 938pb, en el que encontramos la siguiente proporción de nucleótidos: 26´5% A; 22´1% C; 31´3% G y 20% T. En conjunto, el porcentaje de A-T es del 46´6% y el de G-C de 53´4%.

```

1   gcaaaatgca gtcgagcgaa tggattaaga gcttgctctt atgaagttag cggcggacct
61  tttaggaaca cgtgggtaac ctgcccataa gactgggata actccgggaa accggggcta
121 ataccggata acatthttgaa ctgcatgggt cgaaattgaa aggcggcttc ggctgtcact
181 tatggatgga cccgcgctgc attagctagt tggtgaggta acggctcacc aaggcaacga
241 tgcgtagccg acctgagagg gtgatcggcc aactggggac tgagacacgg cccagactcc
301 tacgggaggg agcagtaggg aatcttccgc aatggacgaa agtctgacgg agcaacgccg
361 cgtgagtgat gaaggctttc gggtcgtaaa actctgttgt tagggaagaa caagtgttag
421 ttgaataagc tggcaccttg acggtaccta accagaaagc cacggctaac tacgtgccag
481 cagccgcggg aatacgtagg tggcaagcgt tatccggaat tattgggctg aaagcgcgcg
541 cagggtggtt cttaagtctg atgtgaaagc ccacggctca accgtggagg gtcattggaa
601 actgggagac ttgagtgcag aagaggaaag tgggaattcca tgtgtagcgg tgaatgcgt
661 agagatatgg aggaacacca gtggcgaagg cgactttctg gtctgtaact gacactgagg
721 cgcgaaagcg tgggggagca aacaggatta gataccctgg tagtccacgc cgtaaacgat
781 gagtgctaag tgtagaggt ttcccgcctt ttagtgctgg aagttaacgc attaagcact
841 cccccctggg gagtacggcc gcaaggctga aactcaaaag aattgaccgg gggcccccca
901 agccggtggg agcagggggt taattcgagc aaccgaa

```

El número de acceso en el Gen Bank de este fragmento es GU592673. El análisis del mismo mediante BLAST nos indica que DOAN 12/1 podría pertenecer al género *Bacillus*, ya que la mayor homología, del 97%, es con un representante de este género: *Bacillus sp.* 22-12 (EU571184.1), con una cobertura del 99%. La representación filogenética, indica que pertenece a los Firmicutes pero no muestra claramente su pertenencia al género *Bacillus*, pese a ser cercana.

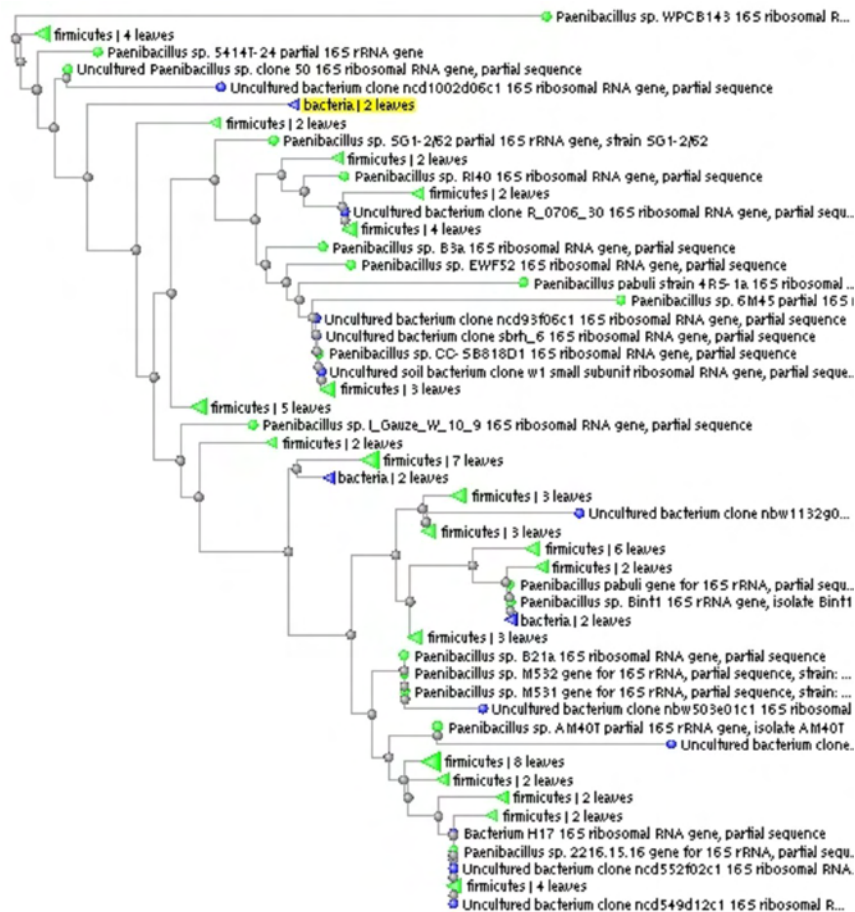


Figura 44. Árbol filogenético para la cepa DOAN 12/1, identificado en la imagen dentro del grupo marcado en amarillo y denominado bacteria/2 levels. El árbol ha sido construido como los anteriores.

- Aislado DOAN 12/5.

El aislamiento de esta cepa se llevó a cabo en agar sangre. Las colonias son blancas mate, aplanadas y de tamaño mediano. Al microscopio óptico se ven como bacilos grampositivos. Respecto a la bioquímica, sólo se estudió su reacción frente al peróxido de hidrógeno, resultando ser catalasa positiva. Es anaerobia facultativa.

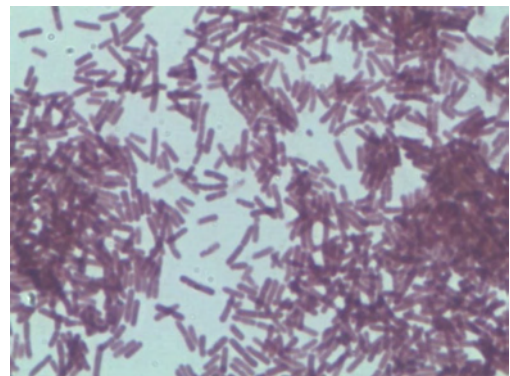


Figura 45. DOAN 12/5

La secuencia parcial obtenida del gen ribosómico 16S de DOAN 12/5 es de un tamaño de 573 pb, correspondiendo a los primeros pares de bases del gen desde el extremo 3'. Esto se debe a que las secuencias obtenidas desde ambos extremos no fueron lo suficientemente largas como para solaparse y poder conseguir la secuencia completa del gen ribosómico. El porcentaje de nucleótidos de este fragmento es de

24'3%A; 22'9%C; 32'5%G y 20'2%T. El porcentaje conjunto de A-T es de 44'5% y de G-C, de 55'3%. La secuencia exacta obtenida es la que se muestra a continuación:

```

1   acatgcaagt cgagcgggag ttgatcagaa gcttgcttct ttgatgctta gcggcggacg
61  ggtgagtaac acgtaggcaa cctgcctca  agtttgggac aactaccgga aacggtagct
121 aataccgaat agttgttttc ttgcctgaa  ggaaactgga aagacggagc aatctgtcac
181 ttggggatgg gcctgcccgc cattagctag ttgggtgggt aacggctcac caaggcgacg
241 atgcgtagcc gacctgagag ggtgatcggc cacactggga ctgagacacg gccagactc
301 ctacgggagg cagcagtagg gaatcttccg caatgggcca aagcctgacg gagcaatgcc
361 gcgtgagtga tgaaggTTTT cggatcgtaa agctctgttg ccaggaaga acgcttggga
421 gagtaactgc tctcanggtg acggtacctg agaagaaagc cccggctaac tacgtgccag
481 cagccgggt  aatacgtagg gggcaagcgt tgtccggaat tattgggcgt aaagcgcgcg
541 cacgcggatc atttaagtct ggtgtttaat ccc
  
```

Ésta ha sido introducida en el GenBank y su número de acceso es GU592675. El análisis con el BLAST nos muestra que esta secuencia presenta una homología del 99% (con 99% de cobertura) con una bacteria no cultivada *Paenibacillus* sp. clone 50 (EU135784.1). La siguiente coincidencia, esta vez con una cobertura del fragmento estudiado del 100%, indica que tiene una homología del 98% con *Paenibacillus* sp. 5414T-24 (AM162350.1). Por tanto podemos decir que DOAN 12/5 pertenece al género *Paenibacillus*.

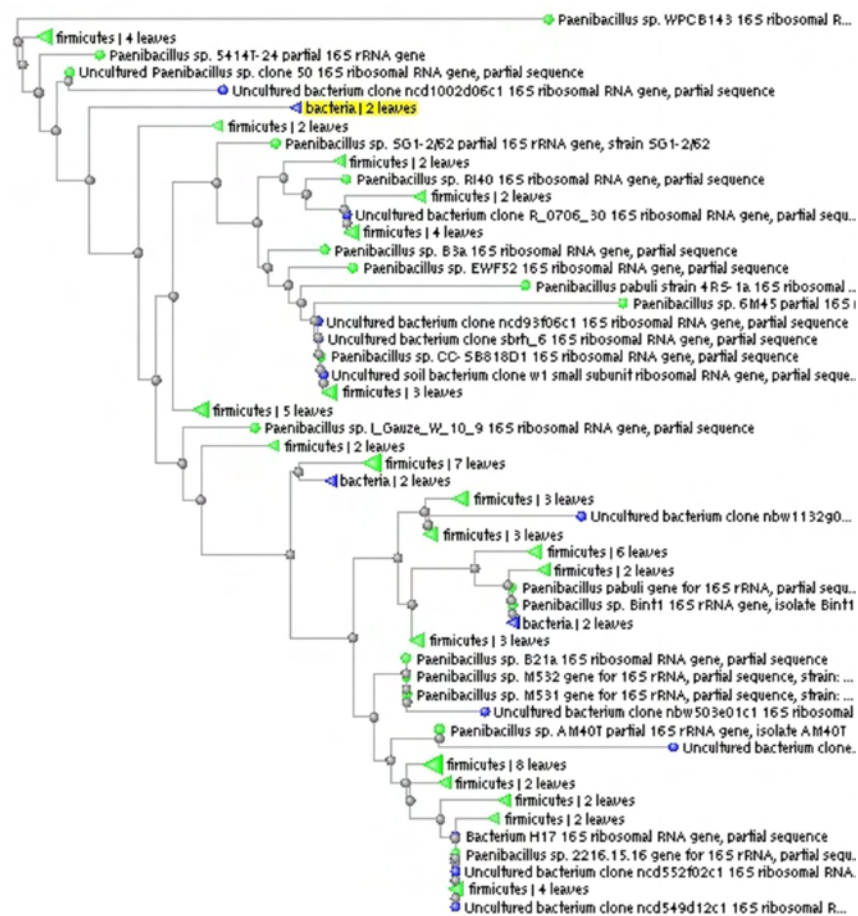


Figura 46. Árbol filogenético para la cepa DOAN 12/5, identificado en la imagen dentro del grupo marcado en amarillo y denominado bacteria/2 levels. El árbol ha sido construido como los anteriores.

- Aislado DOAN 13/1.

El aislamiento de esta cepa se llevó a cabo en agar sangre. Las colonias son blancas, medianas, circulares y de aspecto mucoso. Al microscopio óptico se ven como bacilos grampositivos, esporulados. Respecto a la bioquímica es catalasa positiva.

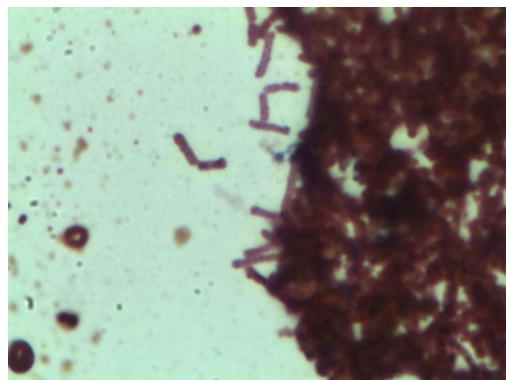


Figura 47. DOAN 13/1

El fragmento obtenido tras la secuenciación tiene un tamaño de 778pb, desde el extremo 3' (primer 8F). La proporción de las bases nitrogenadas es la siguiente: A=26'6%; C=22'1%; G=31'1% y T=20'2%. El porcentaje total de AT es de 46'8% y de G-C, de 53'2%. La secuencia obtenida es la siguiente:

```

1   ctgcagtcga gcgaaactgaa ttaaaaagctt gcttctatga cgttagcggc ggaccggtga
61  agtaacacgt gggcaacctg cctgtaagac tgggataact tcgggaaacc gaagctaata
121 ccggatagga tcttctcctt catgggagat gattgaaaga tggtttcggc taccacttac
181 agatgggccc gcggtgcatt agctagttag tgaggtaacg gtcaccaag gccacgatgc
241 atagccgacc tgagaggggtg atcggccaca ctgggactga gacacggccc agactcctac
301 gggaggcagc agtagggaat cttccgcaat ggacgaaagt ctgacggagc aacgccgcgt
361 gagtgatgaa ggctttcggg tcgtaaaaact ctgttgtag ggaagaaca gtacaagagt
421 aactgcttgt acctgacgg tacctaacca gaaagccacg gctaactacg tgcagcagc
481 cgcggaataa cgtaggtggc aagcgttatc cgaattatt gggcgtaaag cgcgcgcagg
541 cggtttctta agtctgatgt gaaaagccac ggctcaaccg tggagggca ttggaactg
601 gggaaacttga gtgcagaaga gaaaagcggg attccacgtg tagcggtgaa atgcgtagag
661 atgtggagga acaccagtgg cgaaggcggc ttttttggtc tgtaactgac gctgaaggcg
721 cgaaagcgtg ggggagcaaa ccaggattag ataccctggg tagtccacc ccgtaaac

```

La cepa DOAN 13/1, GU592672 en la base de datos del GenBank, se puede identificar como *Bacillus megaterium* (EU834239.1), ya que el porcentaje de identidad es del 98% y la cobertura del 100%. En concreto, presenta estos valores con tres cepas de esta especie. *Bacillus megaterium* strain L4 (GQ479946.1), *Bacillus megaterium* strain DS08 (EU834239.1), *Bacillus megaterium* strain y70-3 (FJ460475.1). Aunque el porcentaje de similitud es alto, no podemos afirmar que se trate de esa especie debido a que sólo se han comparado los primeros 778 pb.

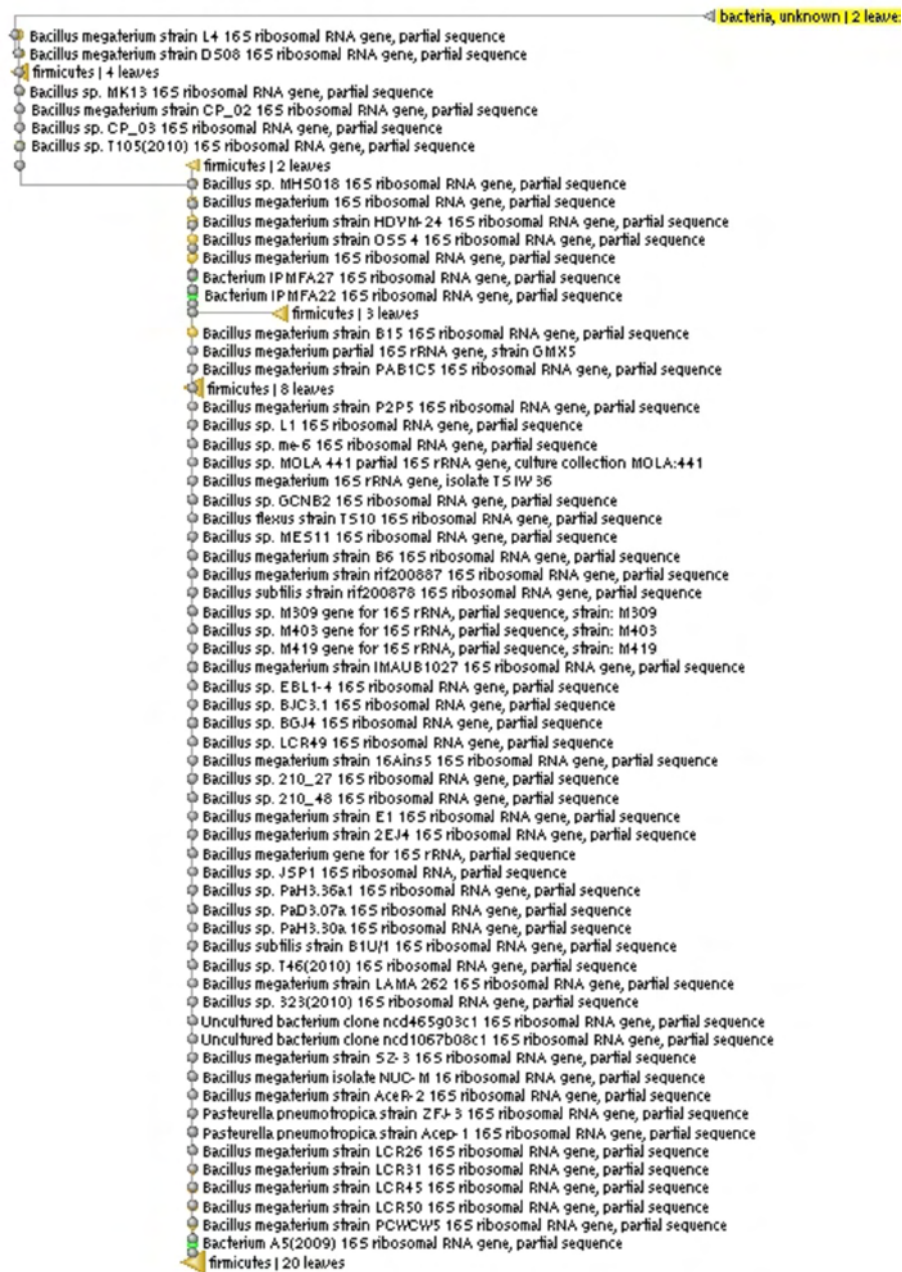


Figura 48. Árbol filogenético para la cepa DOAN 13/1, identificado en la imagen dentro del grupo marcado en amarillo y denominado bacteria, unknow/2 levels. El árbol ha sido construido como los anteriores.

6.3. Discusión de los resultados

A la vista de los porcentajes de similitud tan bajos que se han obtenido tras comparar la secuencia obtenida con las secuencias registradas en la base de datos GenBank, podemos asumir, como se ha afirmado en los resultados, que en la flora fecal de los gansos estudiados se han hallado 6 especies de microorganismos no descritas hasta el momento, y una que podría pertenecer a la especie *Bacillus megaterium*.

Debido a que estas siete especies fueron encontradas a partir de muestras de gansos, se puede afirmar que en el ecosistema intestinal del ganso común habitan un gran número de microorganismos desconocidos para la ciencia y, como se ha comprobado, de fácil aislamiento. Incluso se ha dicho que el 20-40% de los microorganismos que pueden cultivarse de la flora intestinal (Walk y Young, 2008) son desconocidos en estos animales.

Pese a que este aislamiento es paralelo al estudio de la presencia de *C. difficile* en fauna salvaje, no deja de ser otro paso importante (junto al estudio realizado en el capítulo 5) para caracterizar el ecosistema intestinal del ganso, más aún cuando existen referencias del aislamiento de *C. difficile* en estos animales (Borriello et al., 1983). Además de las muchas referencias del papel de las aves migratoria en general, y los gansos en particular, en la dispersión de enfermedades infecciosas (Wobeser y Rainie, 1987; Austin et al., 2004; Lillehaug et al., 2005; Atabay et al., 2008).

De las 7 cepas secuenciadas, se ha encontrado que sólo una de ellas pertenece a un microorganismo descrito hasta la fecha. Este microorganismo es el denominado DOAN 13/1 (EU834239.1) que, en base únicamente a la secuencia del gen ribosómico 16S, puede identificarse como *Bacillus megaterium* (EU834239.1) aislado del suelo. Las características microscópicas observadas están de acuerdo, aunque sería necesario realizar una hibridación del genoma para confirmarlo.

Dos pueden encuadrarse dentro de géneros conocidos, por un lado la cepa DOAN 12/1 (GU592673) es una bacteria que pertenece al género *Bacillus* sp. (EU571184.1), ya que la mayor homología, del 97%, es con un representante de este género: *Bacillus* sp. 22-12 (EU571184.1), con una cobertura del 99%. Por otro lado, la cepa DOAN 12/5 (GU592675), pertenece al género *Paenibacillus* sp. (EU135784.1) y debido a la alta homología se puede considerar del mismo OTU. Esta cepa de *Paenibacillus* sp. comparte además la característica con nuestro microorganismo que ha sido aislado de fauna salvaje, de la piel de una especie de rana (*Odorrana grahami*).

Otra de las cepas queda en una posición indeterminada pudiendo pertenecer a dos géneros por las homologías que se han encontrado. Esta cepa es DOAN 8/2 (GU592674), que como se ha referido en los resultados del presente capítulo puede

pertenecer tanto al género *Brevibacterium* sp. (AB536965.1) como al género *Bacillus* sp. (GQ475517.1). En este caso serían necesarias pruebas complementarias para ubicar al microorganismo, como el cálculo de porcentaje G-C del genoma completo de la cepa.

La quinta de las cepas estudiadas, DOAN 6/4 (GU592669), en base al resultado obtenido en el GenBank parece ser una bacteria no cultivada, cuyo ADN fue aislado de muestras de suelo en California (Cruz-Martínez et al., 2009), o al menos pertenecen al mismo OTU. Eso nos indica que este microorganismo, además de pertenecer a la flora normal del ganso, se puede encontrar en el suelo. El inconveniente de que sólo se haya aislado el material genético del suelo, y no el microorganismo, nos impide saber si se pueden encontrar formas vegetativas viables en este hábitat o el material genético proviene de contaminaciones con las heces de los gansos.

Por último, las cepas DOAN 4/2 (GU592670) y DOAN 4/5 (GU592671) no se pueden situar en ningún taxón, salvo en el de *Phylum*, de los descritos hasta el momento. Son dos microorganismos diferentes, pertenecientes al filo *Firmicutes*, teóricamente cercanos al género *Bacillus*. El máximo porcentaje de similitud con otras secuencias es del 92% y 93%, respectivamente, lo que impide determinar la especie, el género o incluso la familia. Observando estos resultados podría pensarse que la secuencia no es correcta, en base a que la secuencia del gen ribosómico 16S es tan estable que no se esperan diferencias tan grandes (Woese et al., 1975). Por todo ello es probable la presencia de anomalías en la secuencia, como pueden ser quimeras. Una secuencia quimérica es aquella que está formada por fragmentos de dos secuencias diferentes.

La presencia de quimeras se comprobó, tal y como se ha explicado anteriormente, mediante un análisis de la probabilidad de que el gen obtenido fuera o no el gen RNA ribosómico 16S. El resultado indicó que existía una alta probabilidad de que no se tratase del gen ribosómico, siendo mayor la posibilidad de que la secuencia obtenida de DOAN 4/2 fuera quimérica. En DOAN 4/5, la probabilidad de anomalías es menor, a la par que las diferencias que se muestran en el gráfico comparativo, como ya se ha comentado, donde las mayores divergencias se observan en las zonas hipervariables del gen.

Pese a los resultados dados por este programa, podemos descartar que se trate de secuencias quiméricas por el método de obtención de las mismas. Las secuencias quiméricas suelen darse cuando se extrae el ADN directamente de la muestra, lo que conlleva la mezcla de genes procedentes de millares de microorganismos (Walk y Young, 2008). En nuestro caso, el ADN se ha obtenido de colonias aisladas en cultivo puro. El procedimiento, como ya se ha explicado en material y métodos, ha consistido en resembrar las colonias aisladas para obtener un cultivo puro de la cepa en cuestión. Por eso, se elimina la posibilidad de que las secuencias obtenidas sean mezcla de las secuencias de dos especies o cepas diferentes, desechando la posibilidad de que se traten de secuencias quiméricas.

Del mismo modo, la variabilidad puede producirse en el proceso de copia del ADN microbiano. Esto es debido a que en la replicación del ADN se producen mutaciones al azar inherentes al proceso, pero se asume que la frecuencia será lo suficientemente baja como para considerarse ruido en la señal de secuenciación.

El resultado obtenido de secuencias anómalas tras analizarlas se explica por un lado por la gran proporción de nucleótidos sin determinar, simbolizados en la secuencia con la letra N, y por otro lado porque se han aislado microorganismos que difieren notablemente a los descritos hasta la fecha. Por lo que se puede asegurar que estamos ante dos especies de microorganismos desconocidas que no se pueden encuadrar en ninguno de los géneros descritos hasta el momento.

Por otro lado, hay que señalar la posibilidad de que no hayan sido descritas hasta la fecha porque, aunque se hayan encontrado en estudios en los que se analiza la flora fecal mediante extracción y secuenciación directa del ADN de la muestra, se hayan descartado como quimeras. De este hecho se desprende la necesidad de estudiar cuál es el porcentaje de falsas quimeras que se obtienen en la secuenciación. La presencia de nuevas especies en la flora fecal de los animales salvajes es algo coherente con los conocimientos que se tienen hasta fecha del ecosistema intestinal. De hecho, está probado que muchos subgrupos de la flora intestinal de mamíferos han coevolucionado con el hospedador (Backhed et al., 2005), lo que podría haber ocurrido en aves.

En conclusión, estudiando la flora fecal de los gansos salvajes que utilizan los humedales del Parque Nacional de Doñana en el periodo invernal, se han encontrado varias especies de microorganismos no descritos hasta la fecha, y que podrían jugar un papel importante en el ecosistema intestinal del *Anser anser*.

CONCLUSIONES

Conclusiones

Las conclusiones que se han extraído del presente trabajo de tesis son las siguientes:

- I. La rehidratación de la muestra de heces previa a la siembra en medio selectivo, no sólo no inhibe el crecimiento de *C. difficile*, sino que favorece la recuperación de microorganismos fenotípicamente similares.
- II. La manera más sencilla de extraer el ADN de un microorganismo es sometiendo al mismo a temperaturas de 100°C. Sin embargo, si no lo tenemos en cultivo puro es necesario recurrir a métodos de extracción de ADN semi-automáticos o automáticos.
- III. *Clostridium difficile* está presente en una alta proporción en la cabaña porcina de España, principalmente en cerdos neonatos de 1 a 7 días de edad. Pese a que la proporción del microorganismo es indistinguible en animales con diarrea y sin diarrea, podría suponer un importante foco de portadores asintomáticos.
- IV. Dentro de una población determinada de *Clostridium difficile*, existen distintas cepas, que al menos son diferentes en cuanto al toxinotipo, lo que indica variabilidad dentro de las poblaciones de *C. difficile*. Estudios posteriores han obtenido que el ribotipo mayoritario de estas cepas es el 078, responsable de infecciones en el ser humano.
- V. *Clostridium difficile* no es uno de los microorganismos que forma parte de la microbiota normal del tracto gastrointestinal de la fauna salvaje del Parque Nacional de Doñana. Esto nos lleva a considerar a *C. difficile* como una bacteria de la civilización, al estar su presencia limitada a áreas con actividades humanas.
- VI. Entre los microorganismos de la flora normal intestinal de la fauna salvaje muestreada se encuentran muchas especies de microorganismos que comparten

características con *C. difficile* a nivel fenotípico, como la resistencia a cicloserina y cefoxitina. Todos estos organismos pertenecen al *phylum Firmicutes*, principalmente a los géneros *Clostridium* y *Paenibacillus*.

- VII. La especie animal y el hábitat de ésta, influyen en la diversidad microbiana que encontramos en la flora normal de los animales. La microbiota intestinal de las diferentes especies animales es muy diversa, variando incluso entre individuos de la misma especie. En el caso concreto de los caballos, parece que diferencias en la raza, el genoma, también tiene un papel destacado en la composición del ecosistema intestinal.
- VIII. Se ha caracterizado un nuevo hábitat para diferentes especies del género *Paenibacillus*, *Weisella soli*, *Lactobacillus animalis* y *L. murinus*, que es el tracto intestinal de los animales salvajes muestreados. *W. soli* se ha descubierto en el tracto intestinal de caballos. *Paenibacillus sp.* en vaca, caballo y perdiz. Estos dos géneros se consideraban exclusivamente ambientales, por lo que se implementa un nuevo hábitat en su ciclo de vida. *L. murinus* y *L. animalis*, se han aislado en el tracto intestinal del gato, completando la visión de que se encontraban en ratones y perros, respectivamente.
- IX. El diagnóstico de *C. difficile* por PCR directamente a partir de las heces de animales se presenta como un método de diagnóstico alternativo al diagnóstico por detección de la toxina, con una alta sensibilidad y especificidad.
- X. En una población de gansos salvajes, un cambio de hábitat como es el que ocurre durante la invernada, y la preparación de los animales para la nueva migración, se produce una alteración en la composición del ecosistema intestinal. Manteniéndose intactas las proporciones de los grandes taxones (*Firmicutes* y *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*), se observa una variación en la riqueza y la abundancia de las diferentes especies que componen el ecosistema. Además, las extrapolaciones matemáticas indican que el número de especies diferentes que habitan el intestino es uno o dos órdenes de magnitud superiores a los hallados.

XI. En el conjunto de la microbiota del ecosistema intestinal del ganso, se han encontrado especies de microorganismos no descritas en la actualidad, pertenecientes a especies, géneros e, incluso familias, nuevos. Estas nuevas especies son un reflejo de la gran biodiversidad que encontramos en la flora intestinal del ganso.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

- Åkerlund T., Persson I., Unemo M., Norén T., Svenungsson B., Wult M. y Burman L.G. 2008. Increased sporulation rate of epidemic *Clostridium difficile* type 027/NAP1. *Journal of Clinical Microbiology*. 46: 1530–1533.
- Al Saif N. y Brazier J. S. 1996. The distribution of *Clostridium difficile* in the environment of South Wales. *Journal of Medical Microbiology*. 45:133-137.
- Alcántara C., Stenson W. F., Steiner T. S., y Guerrant R. L. 2001. Role of inducible cyclooxygenase and prostaglandins in *Clostridium difficile* Toxin A–induced secretion and inflammation in an animal model. *The Journal of Infectious Diseases*. 184:648–52.
- Alderisio K. A. y DeLuca N. 1999. Seasonal enumeration of fecal coliform bacteria from the feces of Ring-Billed Gulls (*Larus delawarensis*) and Canada Geese (*Branta canadensis*). *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 5628-5630.
- Alexander C. J., Citron D. M., Brazier J. S. y Goldstein E. C. 1995. Identification and antimicrobial resistance patterns of clinical isolates of *Clostridium clostridioforme*, *Clostridium innocuum*, and *Clostridium ramosum* compared with those of clinical isolates of *Clostridium perfringens*. *Journal of Clinical Microbiology*. 33:3209–3215.
- Alonso R., Muñoz C., Gros S., García de Viedma D., Peláez T. y Bouza E. 1999. Rapid detection of toxigenic *Clostridium difficile* from stool samples by a nested PCR of toxin B gene. *Journal of Hospital Infection*. 41: 145- 149.
- Altaie S. S., Meyer P. y Dryja D. 1994. Comparison of two commercially available enzyme immunoassays for detection of *Clostridium difficile* in stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 32: 51-53.
- Amat J. A., García-Criado B. y García-Ciudad A. 1991. Food, feeding behaviour and nutritional ecology of wintering Greylag Geese *Anser anser*. *ARDEA*. 79: 271-282.
- Amit-Romach E., Sklan D. y Uni Z. 2004. Microflora ecology of the chicken intestine using 16S ribosomal DNA primers. *Poultry Science*. 83:1093–1098
- Arroyo L. G., Kruth S. A., Willey B. M., Staempfli H. R., Low D. E. y Weese J. S. 2005a. PCR ribotyping of *Clostridium difficile* isolates originating from human and animal sources. *Journal of Medical Microbiology*. 54: 163–166.
- Arroyo L. G., Rousseau J., Willey B. M., Low D. E., Staempfli H., McGeer A. y Weese J. S. 2005b. Use of a selective enrichment broth to recover *Clostridium difficile* from stool swabs stored under different conditions. *Journal of Clinical Microbiology*. 43: 5341–5343.
- Asensio A., Vaque-Rafart J., Calbo-Torrecillas F., Gestal-Otero J. J., López-Fernández F., Trilla-García A. y Canton R. (EPINE Working Group). 2008. Increasing rates in

Clostridium difficile infection (CDI) among hospitalised patients, Spain 1999-2007. *Euro Surveillance* (www.eurosurveillance.org). 13.

- Aspinall S. T. y Hutchinson D. N. 1992. New selective medium for isolating *Clostridium difficile* from faeces. *Journal of Clinical Pathology*. 45:812-814.
- Atabay H. I., Unver A., Sahin M., Otlu S., Elmali M., Yaman H. 2008. Isolation of various *Arcobacter* species from domestic geese (*Anser anser*). *Veterinary Microbiology*. 128: 400-405.
- Austin R. J., Whiting T. L., Anderson R. A. y Drebot M. A. 2004. An outbreak of West Nile virus-associated disease in domestic geese (*Anser anser domesticus*) upon initial introduction to a geographic region, with evidence of bird to bird transmission. *The Canadian Veterinary Journal*. 45: 117-123.
- Avbersek J., Janezic S., Pate M., Rupnik M., Zidaric V., Logar K., Vengust M., Zemljic M., Pirs T. y Ocepek M. 2009. Diversity of *Clostridium difficile* in pigs and other animals in Slovenia. *Anaerobe*. 15: 252-255.
- Bacci S., St-Martin G., Olesen B., Bruun B., Olsen K. E., Møller Nielsen E. y Mølbak K. 2009. Outbreak of *Clostridium difficile* 027 in North Zealand, Denmark, 2008-2009. *Euro Surveillance*. 14: artículo 2 (19183).
- Bäckhed F., Ley R. E., Sonnenburg J. L., Peterson D. A. y Gordon J. I. 2005. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*. 307: 1915-1920.
- Baines S. D., O'Connor R., Saxton K., Freeman J. y Wilcox M. K. 2009. Activity of vancomycin against epidemic *Clostridium difficile* strains in a human gut model. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 66:520-525.
- Bakri M. M., Sutherland A. D., Brown D. J., Vesely P., Crossan C. y Scobie L. 2009. Assessment of the potential risk of infection associated with *Clostridium difficile* from porcine xenografts. *Xenotransplantation*. 16: 472-476.
- Barbut F. y Petit J. C. 2001. Epidemiology of *Clostridium difficile*-associated infections. *Clinical Microbiology and Infection*. 7:405-410.
- Bartlett J. G., Onderdonk A. B., Cisneros R. L. y Kasper D. L. 1977. Clindamycin-associated colitis due to a toxin-producing species of *Clostridium* in hamsters. *Journal of Infectious Diseases*. 136:701-705
- Bartlett J. G., Moon N., Chang T.W., Taylor N. y Onderdonk A. B. 1978. Role of *Clostridium difficile* in antibiotic-associated pseudomembranous colitis. *Gastroenterology*. 75: 778-782.
- Bartlett J. G. 1994. *Clostridium difficile*: history of its role as an enteric pathogen and the current state of knowledge about the organism. *Clinical Infectious Diseases*. 18: S265-272.
- Båverud V. 2002. *Clostridium difficile* infections in animals with special reference to the horse. A review. *Veterinary Quarterly*. 24: 203 – 219.
- Båverud V. 2004. *Clostridium difficile* diarrhea: infection control in horses . *Veterinary Clinics Equine Practise*. 20: 615-630.

- Beaugerie L. 2004. Antibiotic-associated diarrhoea. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 18:337–352.
- Bélanger S. D., Boissinot M., Clairoux N., Picard F. J. y Bergeron M. G. 2003. Rapid detection of *Clostridium difficile* in feces by real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 41: 730–734.
- Bernis F. 1966. Migración en aves : tratado teórico y práctico. Ed. Sociedad Española de Ornitología. Madrid.
- Bignardi G. E. y Settle C. 2008. Different ribotypes in community-acquired *Clostridium difficile*. *The Journal of Hospital Infection*. 70: 96-98.
- Björkroth J. y Holzapfel W. 2006. Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*. En Ed. Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E. Schleifer K.-H. y Stackebradt. *Prokaryotes*. 267-319.
- Blanco G., Lemus J. A., Grande J., Gangoso L., Grande J. M., Donázar J. A., Arroyo B., Frías O. y Hiraldo F. 2007. Geographical variation in cloacal microflora and bacterial antibiotic resistance in a threatened avian scavenger in relation to diet and livestock farming practices. *Environmental Microbiology*. 9:1738-1749.
- Bojesen A. M., Olsen K. E. P. y Bertelsen M. F. 2006. Fatal enterocolitis in Asian elephants (*Elephas maximus*) caused by *Clostridium difficile*. *Veterinary Microbiology*. 116:329-335.
- Borriello S. P. y Honour P. 1981. Simplified procedure for the routine isolation of *Clostridium difficile* from faeces. *Journal of Clinical Pathology*. 34: 1124-1127.
- Borriello S. P., Honour P., Turner T y Barclay F. 1983. Household pets as a potential reservoir for *Clostridium difficile* infection. *Journal of Clinical Pathology*. 36:84-87.
- Borriello S. P., Welch A. R., Barclay F. E. y Davies H. A. 1988. Mucosal association by *Clostridium difficile* in the hamster gastrointestinal tract. *Journal of Medical Microbiology*. 25:191-196.
- Borriello S. P. 1998. Pathogenesis of *Clostridium difficile* infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 41:13–19.
- Bouttier S., Barc M.-C., Felix B., Lambert S., Collignon A. y Barbut F. 2010. *Clostridium difficile* in ground meat, France. *Emerging Infectious Diseases*. 16: 733-743.
- Bouvet P. J. M y Popoff M. R. 2008. Genetic relatedness of *Clostridium difficile* isolates from various origins determined by triple-locus sequence analysis based on toxin regulatory genes *tcdC*, *tcdR*, and *cdtR*. *Journal of Clinical Microbiology*. 46: 3703–3713.
- Bouza E., Peláez T., Alonso R., Catalán P., Muñoz P. y Rodríguez Créixems M. 2001. ‘Second-look’ cytotoxicity: an evaluation of culture plus cytotoxin assay of *Clostridium difficile* isolates in the laboratory diagnosis of CDAD. *Journal of Hospital Infection*. 48: 233–237.

- Bouza E., Muñoz P. y Alonso R. 2005. Clinical manifestations, treatment and control of infections caused by *Clostridium difficile*. *Clinical Microbiology and Infection*. 11:57–64.
- Bouza E., Martin A., Van den Berg R. J. y Kuijper E. J. 2008. Laboratory-acquired *Clostridium difficile* polymerase chain reaction ribotype 027: A new risk for laboratory workers? *Clinical Infectious Diseases*. 47:1493-1494.
- Briceño I. García P., Álvarez M., Ferres M. y Quiroga T. 2000. Diarrea asociada a *Clostridium difficile*: evaluación de varios métodos de diagnóstico. *Revista Chilena de Infectología*. 17:313-320.
- Calabi E., Ward S., Wren B., Paxton T., Panico M., Morris H., Dell A., Dougan G. y Fairweather N. F. 2001. Molecular characterization of the surface layer proteins from *Clostridium difficile*. *Molecular Microbiology*. 40:1187-1199.
- Calabi E., Calabi F., Phillips a. D. y Fairweather N. F. 2002. Binding of *Clostridium difficile* surface layer proteins to gastrointestinal tissues. *Infection and Immunity*. 70:5770–5778.
- Campos P. y López J. 1998. Renta y Naturaleza en Doñana. A la búsqueda de la conservación con uso. Ed. Campos P. y López J. Icaria Editorial. Págs. 79-91.
- Carter G. P., Lyras D., Allen D. L., Mackin K. E., Howarth P. M., O'Connor J. R. y Rood J. I. 2007. Binary toxin production in *Clostridium difficile* is regulated by CdtR, a LytTR family response regulator. *Journal of Bacteriology*. 189: 7290–7301.
- Castagliuolo I., Keates A. C., Wang C. C., Pasha A., Valenick L, Kelly C. P., Nikulasson S. T., LaMont J. T. y Pothoulakis C. 1998. *Clostridium difficile* Toxin A stimulates macrophage-inflammatory protein-2 production in rat intestinal epithelial cells. *The Journal of Immunology*. 160:6039-6045.
- Cave N. J., Marks S. L., Kass P. H., Melli A. C. y Brophy M. A. 2002. Evaluation of a routine diagnostic fecal panel for dogs with diarrhea. *Journal of de American Veterinary Medical Association*. 221: 52-59.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2005. Severe *Clostridium difficile*–associated disease in populations previously at low risk — Four States, 2005. *MMWR*. 54:1201-1205.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2008. Surveillance for Community-associated *Clostridium difficile* - Connecticut, 2006. *MMWR*. 57:340-343.
- Cerquetti M., Serafino A., Sebastianelli A. y Mastrantonio P. 2002. Binding of *Clostridium difficile* to Caco-2 epithelial cell line and to extracellular matrix proteins. *Immunology and Medical Microbiology*. 32: 211-218.
- Chang J. Y., Antonopoulos D. A., Kalra A., Tonelli A., Khalife W. T., Schmidt T. M. y Young V. B. 2008. Decreased diversity of the fecal microbiome in recurrent *Clostridium difficile*–Associated Diarrhea. *Journal of Infectious Diseases*. 197: 435-438.
- Cheknis A. K., Sambol S. P., Davidson D. M., Nagaro K. J., Mancini M. C., Hidalgo-Arroyo G. A., Brazier J. S., Johnson S. y Gerding D. N. 2009. 233 Distribution of

Clostridium difficile strains from a North American, European and Australian trial of treatment for *C. difficile* infections: 2005–2007. *Anaerobe*. 15:230–233.

- Chouicha N., Marks S. L. 2006. Evaluation of five enzyme immunoassays compared with the cytotoxicity assay for diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in dogs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 18:182–188.
- Clabots C. R., Gerding S. J., Olson L. M. M., Peterson L. R. y Gerding D. N. 1989. Detection of asymptomatic *Clostridium difficile* carriage by an alcohol shock procedure. *Journal of Clinical Microbiology*. 27: 2386-2387.
- Cohan F. M. 2002. What are bacterial species? *Annual Review of Microbiology*. 56:457–87
- Collins M. D., Lawson P. A., Willems A., Cordoba J. J., Fernandez-Garayzabal J., García P., Cai J., Hippe H., Y Farrow J. A. E. 1994. The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 44:812-826.
- Colwell R. K. y Coddington J. A. 1994. Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation. *Philosophical Transactions Biological Sciences*. 345: 101-108.
- Connell H., Agace W., Klemm P., Schembri M., Marild S. y Svanborg C. 1996. Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 93:9827-9832.
- Cruz-Martínez K., Suttle K. B., Brodie E. O., Power M. E., Andersen G. L. y Banfield J. F. 2009. Despite strong seasonal responses, soil microbial consortia are more resilient to long-term changes in rainfall than overlying grassland. *The ISME Journal*. 3: 738–744.
- Curtis T. P. y Sloan W. T. 2004. Prokaryotic diversity and its limits: microbial community structure in nature and implications for microbial ecology. *Current Opinion in Microbiology*. 7:221–226.
- Dabard J., Dubos F., Martinet L. y Ducluzeau R. 1979. Experimental reproduction of neonatal diarrhea in young gnotobiotic hares simultaneously associated with *Clostridium difficile* and other *Clostridium* strains. *Infection and Immunity*. 24:7-11.
- Dahlenborg M., Borch E. y Rådström P. 2001. Development of a combined selection and enrichment PCR procedure for *Clostridium botulinum* Types B, E, and F and its use to determine prevalence in fecal samples from slaughtered pigs. *Applied Environmental Microbiology*. 67: 4781-4788.
- Damaré J. M., Hussong D., Weiner R. M. y Colwell R. R. 1979. Aerobic and facultatively anaerobic bacteria associated with the gut of Canada Geese (*Branta canadensis*) and Whistling Swans (*Cygnus columbianus columbianus*). *Applied and Environmental Microbiology*. 38:258-266.
- Davies H. A. y Borriello S. P. 1990. Detection of capsule in strains of *Clostridium difficile* of varying virulence and toxigenicity. *Microbial Pathogenesis*. 9: 141-146.

- De La Cochetière M. F., Durand T., Lalande V., Petit J. C., Potel G. y Beaugerie L. 2008. Effect of antibiotic therapy on human fecal microbiota and the relation to the development of *Clostridium difficile*. *Microbial Ecology*. 56:395–402.
- Delmée M. 2001. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* disease. *Clinical Microbiology and Infection*. 7:411-416.
- Denève C., Janoir C., Poilane I., Fantinato C. y Collignon A. 2009. New trends in *Clostridium difficile* virulence and pathogenesis. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 33:S24-S28.
- Dent V. E., y Williams R. A. D. 1982. *Lactobacillus animalis* sp. nov., a new species of *Lactobacillus* from the alimentary canal of animals. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene*. 3:377-386.
- Dent V. E. y Williams R. A. D. 1986. Deoxyribonucleic acid reassociation between strains of *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus odontolyticus*, and strains resembling *Lactobacillus acidophilus* isolated from animals. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 36: 481-482.
- Derlet R. W. y Carlson J. R. 2002. An analysis of human pathogens found in horse/mule manure along the John Muir Trail in Kings Canyon and Sequoia and Yosemite National Parks. *Wilderness and Environmental Medicine*. 13:113-118.
- Dethlefsen L., Huse S., Sogin M. L. y Relman D. A. 2008. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biology*. 6: 2383-2400.
- Dial S., Delaney J. A. C., Barkun A. N. y Suissa S. 2005. Use of gastric acid-suppressive agents and the risk of community-acquired *Clostridium difficile*-associated disease. *American Medical Association*. 294: 2989-2995.
- Drancourt M., Bollet C., Carlioz A., Martelin R., Gayral J.-P. y Raoult D. 2000. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 38: 3623–3630.
- Drancourt M., Berger P. y Raoult D. 2004. Systematic 16S rRNA gene sequencing of atypical clinical isolates identified 27 new bacterial species associated with humans. *Journal of Clinical Microbiology*. 42: 2197–2202.
- Drudy D., O'Donoghue D. P., Baird A., Fenelon L. y O'Farrelly C. 2001. Flow cytometric analysis of *Clostridium difficile* adherence to human intestinal epithelial cells. *Journal of Medical Microbiology*. 50:526-534.
- Dumford III D. M. Nerandzic M. M., Eckstein B. C. y Donskey C. J. 2009. What is on that keyboard? Detecting hidden environmental reservoirs of *Clostridium difficile* during an outbreak associated with North American pulsed-field gel electrophoresis type 1 strains. *American Journal of Infection Control*. 37: 15-19.
- Durso L. M., Harhay G. P., Smith T. P., Bono J. L., Desantis T. Z., Harhay D. M., Andersen G. L., Keen J. E., Laegreid W. W. y Clawson M. L. 2010. Animal-to-animal variation

in fecal microbial diversity among beef cattle. *Applied Environmental Microbiology*. 76:4858-4862.

- Dupuy B., Raffestin S., Matamouros S., Mani N., Popoff M. R. y Sonenshein A. L. 2006. Regulation of toxin and bacteriocin gene expression in *Clostridium* by interchangeable RNA polymerase sigma factors. *Molecular Microbiology*. 60:1044-1057.
- Eastwood K., Else P., Charlett A. y Wilcox M. 2009. Comparison of nine commercially available *Clostridium difficile* toxin detection assays, a real-time PCR assay for *C. difficile tcdB*, and a glutamate dehydrogenase detection assay to cytotoxin testing and cytotoxic culture methods. *Journal of Clinical Microbiology*. 47: 3211–3217.
- Eckburg P. B., Bik E. M., Bernstein C. N., Purdom E., Dethlefsen L., Sargent M., Gill S. R., Nelson K. E. y Relman D. A. 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*. 308: 1635- 1638.
- Elliott B., Reed R., Chang B. J. y Riley T. V. 2009. Bacteremia with a large clostridial toxin-negative, binary toxin-positive strain of *Clostridium difficile*. *Anaerobe* 15:249–251.
- Etienne-Manneville S. y Hall A. 2002. Rho GTPases in cell biology. *Nature*. 420: 629-635.
- Fahey J. W., Zhang Y. y Talahay P. 1997. Broccoli sprouts: an exceptionally rich of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 94:10367-10372.
- Fahey J. W., Haristoy X., Dolan P. M., Kensler T. W., Scholtus I., Stephenson K. K., Talahay P. y Lozniewski A. 2002. Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo[a]-pyrene-induced stomach tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 99:7610–7615.
- Figuerola J., Charalambidou I., Santamaria L. y Green A. J. 2010. Internal dispersal of seeds by waterfowl: effect of seed size on gut passage time and germination patterns. *Naturwissenschaften*. 97:555–565
- Flegel W. A., Muller F., Daubener W., Fischer H-G., Hadding U. y Northoff H. 1991. Cytokine response by human monocytes to *Clostridium difficile* toxin A and toxin B. *Infection and Immunity*. 59: 3659-3666.
- Fluit A. C., Wolfhagen M. J. H. M., Verdonk G. P. H. T., Jansze M., Torensma R. Y Verhoef J. 1991. Nontoxic strains of *Clostridium difficile* lack the genes for both toxin A and toxin B. *Journal of Clinical Microbiology*. 29: 2666-2667.
- Frazier K. S., Herron A. J., Hines II M. E., Gaskin J. M., Altman N. H. 1993. Diagnosis of enteritis and enterotoxemia due to *Clostridium difficile* in captive ostriches (*Struthio camelus*). *Journal of Veterinary Diagnosis Investigation*. 5:623-625.
- Freeman J. y Wilcox M. H. 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.

- Freeman J., Bauer M. P., Baines S. D., Corver J., Fawley W. N., Goorhuis B., Kuijper E. J., y Wilcox M. H. 2010. The changing epidemiology of *Clostridium difficile* infections. *Clinical Microbiology Review*. 23: 529–549.
- García F., Martín A. y Toja J. La Frontera de Doñana. 2007. Ed. García F., Martín A. y Toja J. Universidad de Sevilla. Vicerrectorado de Investigación. págs. 147-147.
- García M. E., Lanzarot P., Costas E., Lopez-Rodas V., Marín M. y Blanco J. L. 2008. Isolation of *Serratia fonticola* from skin lesions in a Nile Crocodile (*Crocodylus niloticus*) with an associated septicaemia. *The Veterinary Journal*. 176: 254–256.
- García M. 1996. Atlas clasificatorio de la flora de España peninsular y balear. Vol II. Ministerio Agricultura, Pesca y Alimentación. Ed. Mundi-Prensa.
- George W. L., Sutter V.L., Citron D. y Finegold S. M. 1979. Selective and differential medium for isolation of *Clostridium difficile*. *Journal of Clinical Microbiology*. 9: 214-219.
- Gerding D. N. 2009. *Clostridium difficile* 30 years on: what has, or has not, changed and why? *International Journal of Antimicrobial Agents*. 33: S2-S8.
- Geric B., Johnson S., Gerding D. N., Grabnar M. y Rupnik M. 2003. Frequency of binary toxin genes among *Clostridium difficile* strains that do not produce large Clostridial Toxins. *Journal of Clinical Microbiology*. 41: 5227–5232.
- Geric B., Carman R. J., Rupnik M., Genheimer C. W., Sambol S. P., Lyerly D. M., Gerding D. N. y Johnson S. 2006. Binary toxin-producing, large clostridial toxin-negative *Clostridium difficile* strains are enterotoxic but do not cause disease in hamsters. *The Journal of Infectious Diseases*. 193:1143-1150.
- Giesemann T., Egerer M., Jank T. y Aktories K. 2008. Processing of *Clostridium difficile* toxins. *Journal of Medical Microbiology*. 57:690–696.
- Gogate A., De A., Nanivadekar R., Mathur M., Saraswathi K., Jog A. y Kulkarni M. V. 2005. Diagnostic role of stool culture & toxin detection in antibiotic associated diarrhoea due to *Clostridium difficile* in children. *Indian Journal of Medical Research*. 122: 518-524.
- Gonçalves C., Decré D., Barbut F., Burghoffer B. y Petit J. C. 2004. Prevalence and characterization of a binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) from *Clostridium difficile*. *Journal of Clinical Microbiology*. 42: 1933–1939.
- Govind R., Fralick J. A., Rolfe R. D. 2006. Genomic organization and molecular characterization of *Clostridium difficile* bacteriophage CD119. *Journal of Bacteriology*. 188:2568–2577
- Green, R. H. 1974. The association of viral activation with penicillin toxicity in guinea pigs and hamsters. *Yale Journal of Biology and Medicine*. 3:166-181.
- Grimalt J. O., Ferrer M. y Macpherson E. 1999. The mine tailing accident in Aznalcollar. *The Science of the Total Environment*. 242: 3-11.
- Guilbault C., Labbé A.-C., Poirier L., Busque L., Béliveau C. y Laverdière M. 2002. Development and evaluation of a PCR method for detection of the *Clostridium*

difficile toxin B gene in stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 40: 2288–2290.

- Gülke I., Pfeifer G., Liese J., Fritz M., Hofmann F., Aktories K. y Barth H. 2001. Characterization of the enzymatic component of the ADPribosyltransferase toxin CDTa from *Clostridium difficile*. *Infection and Immunity*. 69: 6004-6011.
- Gumerlock P. H., Tang Y. J., Weiss J. B. y Silva Jr. J. 1993. Specific detection of toxigenic strains of *Clostridium difficile* in stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 31: 507-511.
- Gupta R. S y Gao B. 2009. Phylogenomic analyses of clostridia and identification of novel protein signatures that are specific to the genus *Clostridium sensu stricto* (cluster I). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59:285–294 .
- Gurjar A. A., Hegde N. V., Love B. C. y Jayarao B. M. 2008. Real-time multiplex PCR assay for rapid detection and toxinotyping of *Clostridium perfringens* toxin producing strains in feces of dairy cattle. *Molecular and Cellular Probes*. 22: 90–95.
- Hacek D. M., Ogle A. M., Fisher A., Robicsek A. y Peterson L. R. 2010. Significant impact of terminal room cleaning with bleach on reducing nosocomial *Clostridium difficile*. *American Journal of Infection Control*. 38: 350-353.
- Hafiz S. 1974. *Clostridium difficile* and its toxins. Tesis Doctoral. University of Leeds.
- Hafiz S. y Oakley C.L. 1976. *Clostridium difficile*: isolation and characteristics. *Journal of Medical Microbiology*. 9: 129-136.
- Hall I.C. y O'toole E. 1935. Intestinal flora in new-born infants with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. *American Journal of Diseases of childrens*. 49:390-402.
- Hammes W. P. y Hertel C. 2006. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. En Ed. Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E. Schleifer K.-H. y Stackebradt. *Prokaryotes*. 4:320- 403.
- Hattori M. y Taylor T. D. 2009. The human intestinal microbiome: a new frontier of human biology. *DNA Research*. 16: 1–12.
- He D., Hagen S. J., Pothoulakis C., Chen M., Medina N. D., Warny M., y Lamont J. T. 2000. *Clostridium difficile* toxin A causes early damage to mitochondria in cultured cells. *Gastroenterology*. 119:139-150.
- He D., Sougioultzis S., Hagen S., Liu T.J., Keates S., Keates A. C., Pothoulakis C. y Lamont J. T. 2002. *Clostridium difficile* toxin A triggers human colonocyte IL-8 release via mitochondrial oxygen radical generation . *Gastroenterology*. 122:1048-1057.
- He M., Sebahia M., Lawley T. D., Stabler R. A., Dawson L. F., Martin M. J., Holt K. J., Seth-Smith H. M. B., Quail M. A., Rance R., Brooks K., Churcher C., Harris D., Bentley S. D., Burrows C., Clark L., Corton C., Murray V., Rose G., Thurston S., van Tonder A., Walker D., Wren B. W., Dougan G. y Parkhill J. 2010. Evolutionary

dynamics of *Clostridium difficile* over short and long time scales. *PNAS*. 107: 7527-7532.

- Hehemann J.-H., Correc G., Barbeyron T., Helbert W., Czjzek M. y Michel G. 2010. Transfer of carbohydrate-active enzymes from marine bacteria to Japanese gut microbiota. *Nature Letters*. 464: 908-911.
- Hemme, D., Raibd P., Dwhzeau R., Galpin J.-V., Sicard P. y vim Ikijenoert J. 1980. *Lactobacillus murinus* n. sp., une nouvelle espece de la flore dominante autochtone du tube digestif du rat et de la souris. *Annals of Microbiology*. 131: 297-308.
- Hennequin C., Porcheray F., Waligora-Dupriet A. J., Collignon A., Barc M. C., Bourlioux P. y Karjalainen T. 2001. *GroEL* (Hsp60) of *Clostridium difficile* is involved in cell adherence. *Microbiology*. 147:87–96.
- Hennequin C., Janoir C., Barc M. C., Collignon A. y Karjalainen T. 2003. Identification and characterization of a fibronectin-binding protein from *Clostridium difficile*. *Microbiology*. 149:2779–2787.
- Hirayama K., Miyaji K., Kawamura S., Itoh K., Takahashi E. y Mitsuoka T. 1995. Development of intestinal of human-flora-associated (HFA) mice in the intestine of their offspring. *Experimental animals*. 44: 219 – 222.
- Hirschhorn L. R., Trnka Y., Onderdonk A., Lee M. L. y Platt R. 1994. Epidemiology of community-acquired *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Journal of Infectious Diseases*. 169:127-33.
- Hoffmann H. y Roggenkamp A. 2003. Population genetics of the nomenclature species *Enterobacter cloacae*. *Applied And Environmental Microbiology*. 69:5306-5318.
- Holland R. E. 1990. Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. *Clinical Microbiology Reviews*. 3: 345-375.
- Hubálek Z. 2003. Emerging human infectious diseases: Anthroponoses, Zoonoses, and Saproponoses. *Emerging Infectious Diseases*. 9:403-404.
- Huck J. R., Hammond B. H., Murphy S. C., Woodcock N. H. y Boor K. J. 2007. Tracking spore-forming bacterial contaminants in fluid milk-processing systems. *Journal of Dairy Science*. 90:4872–4883.
- Hugenholtz P., Goebel B. M. y Pace N. R. 1998. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology*. 180:4765-4774.
- Huo Z., Yang X., Raza W., Huang O., Xu Y. y Shen O. 2010. Investigation of factors influencing spore germination of *Paenibacillus polymyxa* ACCC10252 and SQR-21. *Applied Microbiology Biotechnology*. 87: 527-536.
- ICSB: The Ad Hoc Committee of the Judicial Commission of the ICSB. 1976. Approved Lists of Bacterial Names. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 26: 563-599.

- Indra A. Lassnig H, Baliko N, Much P, Fiedler A, Huhulescu S y Allerberger F. 2009. *Clostridium difficile*: a new zoonotic agent?. *Wiener klinische Wochenschrift (The Middle European Journal of Medicine)*. 121: 91-95.
- Iwen P. C., Booth S. J. y Woods G. L. 1989. Comparison of media for screening of diarrheic stools for the recovery of *Clostridium difficile*. *Journal of Clinical Microbiology*. 27: 2105-2106.
- Janoir C. y Collignon A. 2004. Facteurs de virulence de *Clostridium difficile*. *Revue Française des Laboratoires*. 368:43-50.
- Janoir C., Péchiné S., Grosdidier C. y Collignon A. 2007. Cwp84, a surface-associated protein of *Clostridium difficile*, is a cysteine protease with degrading activity on extracellular matrix proteins. *Journal of Bacteriology*. 189: 7174–7180.
- Jhung M. A., Thompson A. D., Killgore G. E., Zukowski W. E., Songer G., Warny M., Johnson S., Gerding D. N., McDonald L. C. y Limbago B. D. 2008. Toxinotype V *Clostridium difficile* in humans and food animals. *Emerging Infectious Diseases*. 14:1039-1045.
- Johnson J. L. y Francis B. S. 1975. Taxonomy of the *Clostridia*: ribosomal ribonucleic acid homologies among the species. *Journal of General Microbiology*. 88: 229- 244.
- Johnston R., Harmon S. y Kautter D. 1964. Method to facilitate the isolation of *Clostridium botulinum* type E. *Journal of Bacteriology*. 88:1521-1522.
- Jones M. A. y Hunter D. 1983. Isolation of *Clostridium difficile* from pigs. *Veterinary Record*. 112:253.
- Jones R. L., Adney W. S. y Shideler R. K. 1987. Isolation of *Clostridium difficile* and detection of cytotoxin in the feces of diarrheic foals in the absence of antimicrobial treatment. *Journal of Clinical Microbiology*. 25:1225-1227
- Jones R. L. 1989. Diagnostic procedures for isolation and characterization of *Clostridium difficile* associated with enterocolitis in foals. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 1:84-86.
- Kanakaraj R., Harris D. L., Songer J. G. y Bosworth B. 1998. Multiplex PCR assay for detection of *Clostridium perfringens* in feces and intestinal contents of pigs and in swine feed. *Veterinary Microbiology*. 63: 29- 38.
- Karjalainen T., Saumier N., Barc M. C., Delmée M. y Collignon A. 2002. *Clostridium difficile* genotyping based on *slpA* variable region in S-Layer gene sequence: an alternative to serotyping. *Journal of Clinical Microbiology*. 40: 2452–2458.
- Kato N., Ou C.-Y., Kato H., Bartley S. L., Brown V. K., Dowell Jr. V. R. y Ueno K. 1991. Identification of toxigenic *Clostridium difficile* by the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*. 29: 33-37.
- Keel M. K. y Songer J. G. 2006. The comparative pathology of *Clostridium difficile*-associated disease. *Veterinary Pathology*. 43:225–240.

- Keel M. K., Brazier J. S., Post k. W., Weese S. y Songer J. G. 2007a. Prevalence of PCR ribotypes among *Clostridium difficile* isolates from pigs, calves, and other species. *Journal of Clinical Microbiology*. 45:1963–1964.
- Keel M. K. y Songer J. G. 2007b. The distribution and density of *Clostridium difficile* toxin receptors on the intestinal mucosa of neonatal pigs. *Veterinary Pathology*. 44: 814–822.
- Kelly C. P., Becker S., Linevsky J. K., Joshi M. A., O'Keane J. C., Dickey B. F., LaMont J. T., y Pothoulakis C. 1994. Neutrophil Recruitment in *Clostridium dfflicile* Toxin A Enteritis in the Rabbit. *Journal of Clinical Investigation*. 93: 1257-1265.
- Killgore G., Thompson A., Johnson S., Brazier J., Kuijper E., Pépin J., Frost E. H., Savelkoul P., Nicholson B., van den Berg R. J., Kato H., Sambol S. P., Zukowski W., Woods C., Limbago B., Gerding D. N. y McDonald L. C. 2008. Comparison of Seven Techniques for Typing International Epidemic Strains of *Clostridium difficile*: REA, PFGE, PCR ribotyping, MLST, MLVA, AFLP, and slpAST. *Journal of Clinical Microbiology*. 46:431-437.
- Kirby J. M., Ahern H., Roberts A. K., Kumar V., Freeman Z., Acharya K. R. y Shone C. C. 2009. Cwp84, a surface-associated, cysteine protease, plays a role in the maturation of the surface layer of *Clostridium difficile*. *The Journal of Biological Chemistry*. 284, 34666-34673.
- Kiss D. y Bilkei G. 2005. A new periparturient disease in Eastern Europe, *Clostridium difficile* causes postparturient sow losses. *Theriogenology*. 63:17-23.
- Klouche M. y Schröder U. 2008. Rapid methods for diagnosis of bloodstream infections. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 46: 888-908.
- Knoop F. C., Owens M. y Crocker T. C. 1993. *Clostridium difficile*: clinical disease and diagnosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 6: 251-265.
- Koransky J. R., Allen S. D. y Dowell Jr. V. R. 1978. Use of ethanol for selective isolation of sporeforming microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*. 35: 762-765.
- Kramer A., Schwebke I., y Kampf G. 2006. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infectious Diseases*. 6:130-131.
- Krivan H. C., Clark G. F., Smith D. F. Y Wilkins T. D. 1986. Cell surface binding site for *Clostridium dijficile* enterotoxin: Evidence for a glycoconjugate containing the sequence Gala1-3Gal,B1-4GlcNAc. *Infection and Immunity*. 53: 573-581.
- Kuijper E.J. y Tüll P (European Study Group for *Clostridium difficile* (ESGCD) y European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC)). 2006. Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in Canada, the United States of America and Europe. *Second concept*. 3 de Marzo.
- Kuijper E. J., Barbut F., Brazier J. S., Kleinkauf N., Eckmanns T., Lambert M. L., Drudy D., Fitzpatrick F., Wiuffs C., Brown D. J., Coia J. E., Pituch H., Reichert P., Even J., Mossong J., Widmer A. F., Olsen K. E., Allerberger F., Notermans D. W., Delmée

- M., Coignard B., Wilcox M., Patel B., Frei R., Nagy E., Bouza E., Marin M., Åkerlund T., Virolainen-Julkunen A., Lyytikäinen O., Kotila S., Ingebretsen A., Smyth B., Rooney P., Poxton I. R. y Monnet D. L. 2008. Update of *Clostridium difficile* infection due to PCR ribotype 027 in Europe, 2008. *Euro Surveill*. 13: 1-7.
- Kyne L., Warny M., Qamar A. y Kelly C. P. 2000. Asymptomatic carriage of *Clostridium difficile* and serum levels of IgG antibody against toxin A. *The New England Journal of Medicine*. 342:390-397.
 - Kyne L., Warny M., Qamar A. y Kelly C. P. 2001. Association between antibody response to toxin A and protection against recurrent *Clostridium difficile* diarrhoea. *Lancet*. 357:189-93.
 - Kyne L., Hamel M. B., Polavaram R. y Kelly C. P. 2002. Health care costs and mortality associated with nosocomial diarrhea due to *Clostridium difficile*. *Clinical Infectious Diseases*. 34:346-353.
 - Lanzarot M. P. 2007. Cinobacterias tóxicas y mortandades en masa de fauna salvaje en las marismas de Doñana. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
 - Lefebvre S. L., Waltner-Toews D., Peregrine A. S., Reid-Smith R., Hodge L., Arroyo L. G. y Weese J. S. 2006. Prevalence of zoonotic agents in dogs visiting hospitalized people in Ontario: implications for infection control. *Journal of Hospital Infection*. 62:458-466.
 - Lemee L., Dhalluin A., Testelin S., Mattrat M.-A., Maillard K., Lemeland J.-F. y Pons J.-L. 2004. Multiplex PCR targeting *tpi* (Triose Phosphate Isomerase), *tcdA* (Toxin A), and *tcdB* (Toxin B) genes for toxigenic culture of *Clostridium difficile*. *Journal of Clinical Microbiology*. 42: 5710-5714.
 - Levett P.N. 1984. *Clostridium difficile* in the genital tract. *The British Journal of Venereal Diseases*. 60:276.
 - Levett P. N. 1986. *Clostridium difficile* in habitats other than the human gastro-intestinal tract. *Journal of Infection*. 12: 253-263.
 - Ley R. E., Peterson D. A. y Gordon J. I. 2006. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*. 124: 837- 848.
 - Ley R. E., Lozupone C. A., Hamady M., Knight R. y Gordon J. I., 2008. Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota. *Nature*. 6: 776-788.
 - Ley R. E., Hamady M., Lozupone C., Turnbaugh P. J., Ramey R. R., Bircher J. S., Schlegel M. L., Tucker T. A., Schrenzel M. D., Knight R. y Gordon J. I. 2008b. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science*. 320: 1647-1651.
 - Lillehaug A., Monceyron C., Bergsjø B., Hofshagen M., Tharaldsen J., Nesse L. L. y Handeland K. 2005. Screening of Feral Pigeon (*Colomba livia*), Mallard (*Anas platyrhynchos*) and Graylag Goose (*Anser anser*) populations for *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., Avian Influenza Virus and Avian Paramyxovirus. *Acat Veterinaria Scandinavica*. 46: 193-202.

- Linevsky J. K., Pothoulakis C., Keates S., Warny M., Keates A. C., Lamont J. T. y Kelly C. P. 1997. IL-8 release and neutrophil activation by *Clostridium difficile* toxin-exposed human monocytes. *AJP - Gastrointestinal and Liver Physiology*. 273:1333-1340.
- Lizuka M., Konno S., Itou H., Chichara J., Toyoshima I., Horle Y., Sasaki K., Sato A., Shindo K. y Watanabe S. 2004. Novel evidence suggesting *Clostridium difficile* is present in human gut microbiota more frequently than previously suspected. *Microbiology and Immunology*. 48: 889-892.
- Lou O., Chong S. K. F., Fitzgerald J. F. K., Siders J. A., Allen S. D. y Lee C.-H. 1997. Rapid and effective method for preparation of fecal specimens for PCR assays. *Journal of Clinical Microbiology*. 35: 281–283.
- Lu J., Santo Domingo J. W., Hill S. y Edge T. A. 2009. Microbial diversity and host-specific sequences of Canada goose feces. *Applied and Environmental Microbiology*. 75:5919-5926.
- Ludwig W. 2007. Nucleic acid techniques in bacterial systematics and identification. *International Journal of Food Microbiology*. 120: 225–236.
- Ludwig W., Schleifer K.-H. y Whitman W. B. 2009. Revised Road Map to the *Phylum Firmicutes*. En Ed. De Vos P., Garrity G., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K.-H. y Whitman W. B. *The Firmicutes. Vol. 3. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd Edition.
- Lyras D., O'Connor J. R., Howarth P. M., Sambol S. P., Carter G. P., Phumoonna T., Poon R., Adams V., Vedantam G., Johnson S., Gerding D. N. y Rood J. I. 2009. Toxin B is essential for virulence of *Clostridium difficile*. *Nature*. 458: 1176-1180.
- Mackie R. 1997. Gut environment and evolution of mutualistic fermentative digestion. En: Ed. Mackie R., White B. A. y Isaacson R. E. *Gastrointestinal Microbiology*. Ed. Chapman and Hall.
- Mackie R., Sghir A. y Gaskins H. R. 1999. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *American Journal of Clinical Nutrition*. 69: 1035S - 1045S
- Magdesian K. G., Hirsh D. C., Jang S. S., Hansen L. M. y Madigan J. E. 2002. Characterization of *Clostridium difficile* isolates from foals with diarrhea: 28 cases (1993–1997). *JAVMA*. 220: 67-73.
- Magnusson J., Jonsson H., Schnürer J. y Roos S. 2002. *Weissella soli* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 52: 831–834.
- Markle B. y Antaki F. 2010. A 10 % False-Negative rate for *Clostridium difficile* infections is too high. *The American Journal of Gastroenterology*. 105:957.
- Marks S. L. y Kather E. J.. 2003. Antimicrobial susceptibilities of canine *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* isolates to commonly utilized antimicrobial drugs. *Veterinary Microbiology*. 94: 39–45.

- Marler L. M., Siders J. A., Wolters L. C., Pettigrew Y., Skitt B. L. y Allen S. D. 1992. Comparison of five cultural procedures for isolation of *Clostridium difficile* from stools. *Journal of Clinical Microbiology*. 30: 514-516.
- McBee R.H. 1960. Intestinal flora of some antarctic birds and mammals. *Journal of Bacteriology*. 79:311-312.
- McDonald L. C., Killgore G. E., Thompson A., Owens R. C. Kazakova S. V., Sambol S. P., Johnson S. y Gerding D. N. 2005. An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. *The New England Journal of Medicine*. 353: 2433- 2441.
- McFarland L. V., Beneda H. W., Clarridge J. E. y Raugi G. J. 2007. Implications of the changing face of *Clostridium difficile* disease for health care practitioners. *American Journal of Infection Control*. 35:237-253.
- McVey D. C. y Vigna S. R. 2001. The capsaicin VR1 receptor mediates substance P release in toxin A-induced enteritis in rats. *Peptides* 22:1439–1446.
- Meyer G. K. A., Neetz A., Brandes G., Tsikas D., Butterfield J. H., Just I. y Gerhard R. 2007. *Clostridium difficile* toxins A and B directly stimulate human mast cells. *Infection and Immunity*. 75: 3868–3876.
- Modaber I. 1975. *Clostridium difficile*. *Acta Medica Irani*. 18: 111-128.
- Morin M., Turgeon D., Jollette J., Robinson Y., Phaneuf J. B., Sauvageau R., Beaugerard M., Teuscher E., Higgins R. y Lariviere S. 1983. Neonatal diarrhea of pigs in quebec: infectious causes of significant outbreaks. *Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science*. 47: 11-17.
- Morris A. M., Jobe B. A., Stoney M., Sheppard B. C., Deveney C. W. y Deveney K. E. 2002. *Clostridium difficile* colitis. An increasingly aggressive iatrogenic disease? *Archives of Surgery*. 137: 1096-1100.
- Musher D. M., Manhas A., Jain P., Nuila F., Waqar A., Logan N., Marino B. y Graviss E. A. 2007. Detection of *Clostridium difficile* toxin: Comparison of enzyme immunoassay results with results obtained by cytotoxicity assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 45: 2737–2739.
- Myllykoski J., Nevas M., Lindstrom M., Korkeala H. 2006. The detection and prevalence of *Clostridium botulinum* in pig intestinal samples. *International Journal of Food Microbiology*. 110: 172–177.
- Nagy J. y Bilkei G. 2003. Neonatal piglet losses associated with *Escherichia coli* and *Clostridium difficile* infection in a Slovakian outdoor production unit. *The Veterinary Journal*. 166:98-100.
- Nakamura L. K. 1984. *Bacillus amylolyticus* sp. nov., nom. rev., *Bacillus lautus* sp. nov., norn. rev., *Bacillus pabuli* sp. nov., norn. rev., and *Bacillus validus* sp. nov., norn. rev. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 34: 224-226.
- Nemat H., Khan R., Ashraf M. S., Matta M., Ahmed S., Edwards B. T., Hussain R., Lesser M., Pekmezaris R., Dlugacz Y. y Wolf-Klein G. 2010. Diagnostic value of repeated

enzyme immunoassays in *Clostridium difficile* infection. *The American Journal of Gastroenterology*. 104:2035–2041.

- Norman K. N., Harvey R. B., Scott H. M., Hume M. E., Andrews K. y Brawley A. D. 2009. Varied prevalence of *Clostridium difficile* in an integrated swine operation. *Anaerobe*. 15: 256-260.
- Nusrat A., Von Eichel-Streiber C., Turner J. R., Verkade P., Madara J. L. y Parkos C. A. 2001. *Clostridium difficile* toxins disrupt epithelial barrier function by altering membrane microdomain localization of tight junction proteins. *Infection and Immunity*. 69:1329-1336.
- O'Connor J. R., Johnson S. and Gerding D. N. 2009. *Clostridium difficile* infection caused by the epidemic BI/NAP1/027 strain. *Gastroenterology*. 136:1913–1924.
- Ohkusa T., Yoshida T., Sato N., Watanabe S., Tajiri H. y Okayasu I. 2009. Commensal bacteria can enter colonic epithelial cells and induce proinflammatory cytokine secretion: a possible pathogenic mechanism of ulcerative colitis. *Journal of Medical Microbiology*. 58: 535–545.
- Optimer Pharmaceuticals. 2010. Phase III success for novel *Clostridium difficile* antibiotic. *Nature Reviews Drug Discovery*. 9: 260.
- Orchard J. L., Fekety R. y Smith J. R. 1983. Antibiotic-associated colitis due to *Clostridium difficile* in a Kodiak bear. *American Journal of Veterinary Research*. 44:1547-1548.
- Otter J. A., Havill N. L., Adams N. M. T., Cooper T., Tauman A. y Boyce J. M. 2009. Environmental sampling for *Clostridium difficile*: Swabs or sponges? *American Journal of Infection Control*. 37:517-518.
- Péchiné S., Gleizes A., Janoir C., Gorges-Kergot R., Barc M. C., Delmée M. y Collignon A. 2005. Immunological properties of surface proteins of *Clostridium difficile*. *Journal of Medical Microbiology*. 54:193–196.
- Peláez T., Cercenado E., Alcalá L., Marín M., Martín-López A., Martínez-Alarcón J., Catalán P., Sánchez-Somolinos M. y Bouza E. 2008. Metronidazole resistance in *Clostridium difficile* is heterogeneous. *Journal of Clinical Microbiology*. 46: 3028–3032.
- Pépin J., Valiquette L., Alary M.-E., Villemure P., Pelletier A., Forget K., Pépin K. y Chouinard D. 2004. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity. *Canadian Medical Association Journal*. 171: 466-472.
- Pépin J., Valiquette L. y Cossette B. 2005. Mortality attributable to nosocomial *Clostridium difficile*-associated disease during an epidemic caused by a hypervirulent strain in Quebec. *Canadian Medical Association Journal*. 173: 1037-1042.
- Perk J., Cosmetatos I., Gallusser A., Lobsiger L., Straub R. y Nicolet J. 1993. *Clostridium difficile* associated with typhlocolitis in an adult horse. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 5:99-101.

- Persson S., Torpdahl M. y Olsen K. E. 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.
- Pirs T., Ocepek M. y Rupnik M. 2008. Isolation of *Clostridium difficile* from food animals in Slovenia. *Journal of Medical Microbiology*. 57:790–792.
- Pituch H. 2009. *Clostridium difficile* is no longer just a nosocomial infection or an infection of adults. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 33:S42-S45.
- Popoff M. R., Rubin E. J., Gill D. M. y Boquet P. 1988. Actin-specific ADP-ribosyltransferase produced by a *Clostridium difficile* strain. *Infection and Immunity*. 56: 2299-2306.
- Pothoulakis C., Castagliuolo I., LaMont J.T., Jaffer A., O'keane J. C., Snider R. M. y Leeman S. E. 1994. CP-96,345, a substance P antagonist, inhibits rat intestinal responses to *Clostridium difficile* toxin A but not cholera toxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 91:947-951.
- Pothoulakis C., Gilbert R. J., Cladaras C., Castagliuolo I., Semenza G., Hitti Y., Montcrief J. S., Linevsky J., Kelly C. P., Nikulasson S., Desai H. P., Wilkins T. D. y LaMont J. T. 1996. Rabbit Sucrase-Isomaltase Contains a Functional Intestinal Receptor for *Clostridium difficile* Toxin A. *Journal of Clinical Investigation* 98:641–649.
- Pothoulakis C. y LaMont J. T. 2001. Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial-mucosal interactions II. The integrated response of the intestine to *Clostridium difficile* toxins. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. 280: G178–G183.
- Poxton I. R., McCoubrey J. y Blair G. 2001. The pathogenicity of *Clostridium difficile*. *Clinical Microbiology and Infection*. 7:421-427.
- Princewel T. J. T. y Agba L. M. I. 1982. Examination of bovine faeces for the isolation and identification of *Clostridium* species. *Journal of Applied Bacteriology*. 52:97-102.
- Quispel A. 1998. Lourens G. M. Baas Becking (1895–1963), Inspirator for many (micro)biologists. *International Microbiology*. 1: 69-72.
- Rajilić-Stojanović M., Smidt H. y de Vos W. M. 2007. Diversity of the human gastrointestinal tract microbiota revisited. *Environmental Microbiology*. 9: 2125–2136.
- Riggs M. M., Sethi A. K., Zabarsky T. F., Eckstein E. C., Jump R. L. P. y Donskey C. J. 2007. Asymptomatic carriers are a potential source for transmission of epidemic and nonepidemic *Clostridium difficile* strains among long-term care facility residents. *Clinical Infectious Diseases*. 45: 992 – 998.
- Riley T. V., Adams J. E., O'Neill G. L. y Bowman R. A. 1991. Gastrointestinal carriage of *Clostridium difficile* in cats and dogs attending veterinary clinics. *Epidemiology and Infection*. 107:659-665.

- Roberts K., Smith C.F., Snelling A.M., Kerr K.G., Banfield K.R., Sleigh P.A., Beggs C.B. 2008. Aerial dissemination of *Clostridium difficile* spores. *BMC Infectious Diseases*. 8:7.
- Rodriguez-Palacios A., Stämpfli H. R., Duffield T., Peregrine A. S., Trotz-Williams L. A., Arroyo L. G., Brazier J. S. y Weese J. S. 2006. *Clostridium difficile* PCR ribotypes in calves, Canada. *Emerging Infectious Diseases*. 12: 1730-1736.
- Rodriguez-Palacios A. Staempfli H.R., Duffield T. y Weese J. S. 2007a. *Clostridium difficile* in Retail Ground Meat, Canada. *Emerging Infectious Diseases*. 13: 485- 487.
- Rodriguez-Palacios A., Stämpfli H. R., Stalker M., Duffield T. y Weese J. S. 2007b. Natural and experimental infection of neonatal calves with *Clostridium difficile*. *Veterinary Microbiology*. 124: 166–172.
- Rodriguez-Palacios A., Reid-Smith R. J., Staempfli H. R., Daignault D., Janecko N., Avery B. P., Martin H., Thomspson A. D., McDonald L. C., Limbago B. y Weese J. S. 2009. Possible seasonality of *Clostridium difficile* in retail meat, Canada. *Emerging Infectious Diseases*. 15: 802 - 805.
- Rolfe, R. D., y W. Song. 1993. Purification of a functional receptor for *Clostridium difficile* toxin A from intestinal brush border membranes of infant hamsters. *Clinical Infectious Diseases*. 16: S219- S227.
- Rousseau C., Poilane I., Diakite F., Feghoul L., Cruaud P. y Collignon A. 2010. Comparaison de trois milieux pour la culture de *Clostridium difficile* : intérêt des milieux favorisant la germination des spores ? *Pathologie Biologie*. 58: 58–61.
- Rupnik M., Avesani V., Janc M., Von Eichel-Streiber C. y Delmée M. 1998. A Novel toxinotyping scheme and correlation of toxinotypes with serogroups of *Clostridium difficile* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 36: 2240 – 2247.
- Rupnik M. 2007. Heterogeneity of large clostridial toxins: importance of *Clostridium difficile* toxinotypes. *FEMS Microbiology Review*. 32:541–555.
- Sánchez M. M., Fritze D., Blanco A., Spröer C., Tindall B. J., Schumann P., Kroppenstedt R. M., Diaz P. y Pastor F. I. J. 2005. *Paenibacillus barcinonensis* sp. nov., a xylanase producing bacterium isolated from a rice field in the Ebro River delta. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55: 935–939.
- Schwan C., Stecher B., Tzivelekidis T., van Ham M., Rohde M., Hardt W. D., Wehland J. y Aktories K. 2009. *Clostridium difficile* toxin CDT induces formation of microtubule-based protrusions and increases adherence of bacteria. *PLoS Pathogens*. 5:e1000626.
- Sebahia M., Wren B. W., Mullany P., Fairweather N. F., Minton N., Stabler R., Thomson N. R., Roberts A. P., Cerdeño-Tárraga¹ A. M., Wang H., Holden M. T. G., Wright A., Churcher C., Quail M. A., Baker S., Bason N., Brooks K., Chillingworth T., Cronin A., Davis P., Dowd L., Fraser A., Feltwell T., Hance¹ Z., Holroyd S., Jagels K., Moule S., Mungall K., Price C., Rabinowitsch E., Sharp S., Simmonds M., Stevens K., Unwin L., Whithead S., Dupuy B., Dougan G., Barrell B. y Parkhill J. 2006. The

multidrug-resistant human pathogen *Clostridium difficile* has a highly mobile, mosaic genome. *Nature Genetics*. 38:779-786.

- Shida O., Takagi L. H., Kadowaki K., Lawrence L., Nakamura K. y Komagata K. 1997. Emended description of *Paenibacillus amylolyticus* and description of *Paenibacillus illinoisensis* sp. nov. and *Paenibacillus chibensis* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 47: 299-306.
- Shin B.-M., Lee E.-J., Kuak E.-Y. y Yoo S. J. 2009. Comparison of VIDAS CDAB and CDA immunoassay for the detection of *Clostridium difficile* in a tcdA- tcdB+ *C. difficile* prevalent area. *Anaerobe*. 15: 266–269.
- Shivaprasad, H. L. 2003. Hepatitis associated with *Clostridium difficile* in an ostrich chick. *Avian Pathology*.32:57-62
- Simango C. 2006. Prevalence of *Clostridium difficile* in the environment in a rural community in Zimbabwe. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 100:1146—1150.
- Sloan L. M., Duresko B. J., Gustafson D. R. y Rosenblatt J. E. 2008. Comparison of real-time PCR for detection of the *tcdC* gene with four toxin immunoassays and culture in diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *Journal of Clinical Microbiology*. 46: 1996–2001.
- Smith L.D. y King E.O. 1962. Occurrence of *Clostridium difficile* in infections of man. *Journal of Bacteriology*. 84:65-67.
- Snyder M.I. 1937. Further studies on *Bacillus difficilis* (Hall and O'toole). *Journal of Infectious Diseases*. 60:223-231.
- Soler P., Nogareda F. y Cano R. 2008. Rates of *Clostridium difficile* infection in patients discharged from spanish hospitals, 1997-2005. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 29:887-889.
- Songer J. G. 1996. Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clinical Microbiology Reviews*. 9: 216–234.
- Songer J. G., Post K. W., Larson D. J., Jost B. H. y Glock R. D. 2000. Infection of neonatal swine with *Clostridium difficile*. *Swine Health and Production*. 8:185-189.
- Songer J.G. 2004. The emergence of *Clostridium difficile* as a pathogen of food animals. *Animal Health Research Reviews*. 5: 321–326.
- Songer J. G. y Uzal F. A. 2005. Clostridial enteric infections in pigs. *Journal of Veterinary Diagnosis Investigation*. 17:528–536.
- Songer J. G. y Anderson M. A. 2006. *Clostridium difficile*: An important pathogen of food animals. *Anaerobe*. 12:1-4.
- Songer J. G., Trinh H. T., Killgore G. E., Thompson A. D, McDonald L. D, y Limbago B. M. 2009. *Clostridium difficile* in retail meat products, USA, 2007. *Emerging Infectious Diseases*. 15:819-821.
- Sorg J. A. y Sonenshein A. L. 2008. Bile salts and glycine as cogermnants for *Clostridium difficile* spores. *Journal of Bacteriology*. 190: 2505–2512.

- Sousa A. y García P. 1998. Cambios históricos en el avenamiento superficial y la vegetación del Parque Natural de Doñana (Sector Abalario), Huelva. *Ería*. 46: 165-182.
- Stamper P. D., Alcabasa R., Aird D., Babiker W., Wehrlin J., Ikpeama I. y Carroll K. C. 2009. Comparison of a commercial Real-Time PCR assay for *tcdB* detection to a cell culture cytotoxicity assay and toxigenic culture for direct detection of toxin-producing *Clostridium difficile* in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*. 47: 373–378.
- Stevenson J.P. 1966. The normal bacterial flora of the alimentary canal of laboratory stocks of the desert locust, *Schistocerca gregaria* Forskål. *Journal of Invertebrate Pathology*. 8:205-211.
- Struble A. L., Tang Y. J., Kass P. H., Gumerlock P. H., Madewell B. R. y Silva, Jr. J. 1994. Fecal shedding of *Clostridium difficile* in dogs: a period prevalence survey in a veterinary medical teaching hospital. *Journal of Veterinary Diagnosis Investigation*. 6:342-347
- Sullivan N. M., Pellett S. y Wilkins T. D. 1982. Purification and characterization of toxins A and B of *Clostridium difficile*. *Infection and Immunity*. 35:1032-1040.
- Taha S., Johansson O., Jonsson S. R., Heimer D. y Krovacek K. 2007. Toxin production by and adhesive properties of *Clostridium difficile* isolated from humans and horses with antibiotic-associated diarrhea. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 30:163–174.
- Tan K. S., Wee B. Y. y Song K., P. 2001. Evidence for holin function of *tcdE* gene in the pathogenicity of *Clostridium difficile*. *Journal of Medical Microbiology*. 50:613-619.
- Tasteyre A., Barc M. C., Collignon A., Boureau H. y Karjalainen T. 2001. Role of *FliC* and *FliD* flagellar proteins of *Clostridium difficile* in adherence and gut colonization. *Infection and Immunity*. 69: 7937–7940.
- Taylor N. S., Thorne G. M. y Bartlett J. G. 1981. Comparison of two toxins produced by *Clostridium difficile*. *Infection and Immunity*. 34: 1036-1043.
- Ticehurst J. R., Aird D. Z., Dam L. M., Borek A. P., Hargrove J. T. y Carroll K. C. 2006. Effective detection of toxigenic *Clostridium difficile* by a two-step algorithm including tests for antigen and cytotoxin. *Journal of Clinical Microbiology*. 44: 1145-1149.
- Toma B., Vaillancourt J. P., Dufour B., Eloit M., Moutou F., Marsh W., Benet J.J., Saana M., Michel P., Kass P. y Bigras-Poulin M. 1999. Dictionary of Veterinary epidemiology. Iowa State University Press, Ames, Iowa.
- Tucker K. D., Carrig P. E. y Wilkins T. D. 1990. Toxin A of *Clostridium difficile* is a potent cytotoxin. *Journal of Clinical Microbiology*. 28: 869-871.
- Tucker K. D y Wilkins T. D. 1991. Toxin A of *Clostridium difficile* binds to the human carbohydrate antigens I, X, and Y. *Infection and Immunity*. 59 73-78.
- Turnbaugh P. J., Ley R. L., Hamady M., Fraser-Liggett C. M., Knight R. y Gordon J. I. 2007. The Human Microbiome Project. *Nature*. 449: 804-810.

- Uzal F.A., Plumb J.J., Blackall L.L., Kelly W.R. 1997. PCR detection of *Clostridium perfringens* producing different toxins in faeces of goats. *Letters in Applied Microbiology*. 25: 339–344.
- van den Berg R. J., Bruijnesteijn van Coppenraet L. S., Gerritsen H.-J., Endtz H. P., van der Vorm E. R. y Kuijper E. J. 2005. Prospective multicenter evaluation of a new immunoassay and real-time PCR for rapid diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in hospitalized patients. *Journal of Clinical Microbiology*. 43: 5338–5340.
- van den Berg R. J., Schaap I., Templeton K. E. Klaassen C. H. W., Kuijper E. J. 2007. Typing and subtyping of *Clostridium difficile* isolates by using multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis. *Journal of Clinical Microbiology*. 45: 1024–1028.
- Vega-Pla J. L., Calderón J., Rodríguez-Gallardo P.P., Martínez A. M. y Rico C. 2006. Saving feral horse populations: does it really matter? A case study of wild horses from Doñana National Park in southern Spain. *Animal Genetics*. 37: 571 – 578.
- Vickerman M. M., Brossard K. A., Funk D. B. Jesionowski A. M. y Gill S. R. 2007. Phylogenetic analysis of bacterial and archaeal species in symptomatic and asymptomatic endodontic infections. *Journal of Medical Microbiology*. 56: 110–118.
- Waligora A. J., Barc M. C., Bourlioux P., Collignon A. y Karjalainen T. 1999. *Clostridium difficile* cell attachment is modified by environmental factors. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 4234–4238.
- Waligora A. J., Hennequin C., Mullany P., Bourlioux P., Collignon A. y Karjalainen T. 2001. Characterization of a cell surface protein of *Clostridium difficile* with adhesive properties. *Infection and Immunity*. 69: 2144–2153.
- Walk S. T. y Young V. B. 2008. Emerging insights into antibiotic-associated diarrhea and *Clostridium difficile* infection through the lens of microbial ecology. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. 2008: 1-7.
- Warny M., Pépin J., Fang A., Killgore G., Thompson A., Brazier J., Frost E. y McDonald L. C. 2005. Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. *Lancet*. 366:1079–84.
- Waters E. H., Orr J. P., Clark E. G. y Schaufele C. M. 1998. Typhlocolitis caused by *Clostridium difficile* in suckling piglets. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 10:104–108.
- Weary D. M., Huzzey J. M. y von Keyserlingk M. A. G. 2009. Using behavior to predict and identify ill health in animals. *Journal of Animals Science*. 87: 770- 777.
- Weese J. S., Staempfli H. R., Prescott J. F., Kruth S. A., Greenwood S. J. y Weese H. E. 2001a. The roles of *Clostridium difficile* and enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in diarrhea in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 15:374–378.

- Weese J. S., Staempfli H. R y Prescott J. F. 2001b. A prospective study of the roles of *Clostridium difficile* and enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in equine diarrhoea. *Equine veterinary Journal*. 33:403-409.
- Wheeldon L. J., Worthington T., Lambert P. A., Hilton A. C., Lowden C. J. y Elliott T. S. J. 2008. Antimicrobial efficacy of copper surfaces against spores and vegetative cells of *Clostridium difficile*: the germination theory. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 62: 522–525.
- Wilcox M. H. 2003. *Clostridium difficile* infection and pseudomembranous colitis. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 17: 475–493.
- Wilson J. W., Schurr M. J., LeBlanc C. L., Ramamurthy R., Buchanan K. L. y Nickerson C. A. 2002. Mechanisms of bacterial pathogenicity. *Postgraduate Medical Journal*. 78:216–224.
- Wilson K. H., Kennedy M. J. y Fekety F. R. 1982. Use of sodium taurocholate to enhance spore recovery on a medium selective for *Clostridium difficile*. *Journal of Clinical Microbiology*. 15: 443-446.
- Wilson K. H. y Perini F. 1988. Competition for nutrients in suppression of *Clostridium difficile* by the colonic microflora. *Infection and Immunity*. 56: 2610-2614.
- Wobeser G. y Rainnie D. J. 1987. Epizootic necrotic enteritis in wild geese. *Journal of Wildlife Diseases*. 23: 376-385.
- Woese C. R., Fox G. E., Zablen L., Uchida T., Bonen L., Pechman K., Lewis B. J. y Stahl D. 1975. Conservation of primary structure in 16S ribosomal RNA. *Nature*. 6: 83-86.
- Wolfhagen M. J. H. M., Fluit L. A. C., Torensma R., Poppelier M. J. J. G. y Verhoef J. 1994. Rapid detection of toxigenic *Clostridium difficile* in fecal samples by magnetic immuno PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 32: 1629-1633.
- Xia Y., Hu H. Z., Liu S., Pothoulakis C. y Wood J. D. 2000. *Clostridium difficile* toxin A excites enteric neurones and suppresses sympathetic neurotransmission in the guinea pig. *Gut*. 46:481–486.
- Yaeger M., Funk N. y Hoffman L. 2002. A survey of agents associated with neonatal diarrhea in Iowa swine including *Clostridium difficile* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 14:281–287.
- Yaman H., Ulukanli Z., Elmali M. y Unal Y. 2006. The effect of a fermented probiotic, the kefir, on intestinal flora of poultry domesticated Geese (*Anser anser*). *Revue de Médecine Vétérinaire*. 157: 379-386.
- Zidaric V., Zemljic M., Janezic S., Kocuvan A. y Rupnik M. 2008. High diversity of *Clostridium difficile* genotypes isolated from a single poultry farm producing replacement laying hens. *Anaerobe*. 14: 325–327.

Páginas Web

- <http://161.11.232.183/CuadernosEnLaRed/>
- www.apiweb.biomeriex.com
- www.bioinformatics-toolkit.org
- www.gbif.org/
- www.ine.es
- www.mapa.es
- www.ncbi.nlm.nih.gov/blast
- www.rbd.ebd.csic.es
- www.rdna.ridom.es
- www.sauwok.fecyt.es
- www.vivo.colostate.edu/molkit/manip
- MMA: <http://reddeparquesnacionales.mma.es/parques/donana/index.htm>

Legislación

- LEY 91/1978, de 28 de diciembre (Jefatura del Estado), del Parque Nacional de Doñana.
- LEY 8/1999, de 27 de octubre, del Espacio Natural de Doñana.
- LEY 5/2007, de 3 de abril, de la Red de Parques Nacionales.
- LEY 21/1989 de 18 de julio, para la que se aprueba el inventario de espacios Naturales Protegidos de Andalucía.
- Decreto 97/2005, de 11 de abril, por el que se establece la ordenación del Parque Nacional y Parque Natural de Doñana.
- Decreto 24/2007, de 30 de enero, por el que se declara el Espacio Natural de Sierra Nevada y se regulan los órganos de gestión y participación de los Espacios Naturales de Doñana y de Sierra Nevada.
- P.O.R.N. Anexo I. Decreto 97/2005. Plan de Ordenación de los Recursos Naturales del Parque Natural de Doñana (http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/web/Bloques_Tematicos/Patrimonio_Natural._Uso_Y_Gestion/Espacios_Protegidos/PORN/PORN_PRUG_Donana/porn_texto_1.pdf)

Índice de Tablas

INTRODUCCIÓN

- **Tabla I.** Número de defunciones debidas a *C. difficile* en España en 2007.....36
- **Tabla II.** Animales en los que se ha descrito Infección por *C difficile*.....39

Capítulo 1

- **Tabla III.** Comparación de los aislados obtenidos utilizando ambos métodos, shock en etanol y rehidratación, expresados en valor absoluto.....77
- **Tabla IV.** Tabla con las medias obtenidas en las mediciones para cada cepa y método.....81
- **Tabla V.** Valores estadísticos comunes para cada tipo de extracción.....82

Capítulo 2

- **Tabla VI.** número total de animales muestreados.....88
- **Tabla VII.** Valores umbral para la identificación de microorganismos mediante tiras API.....90
- **Tabla VIII.** Número de muestras en las cuales se aisló *C. difficile*, respecto del total.....94
- **Tabla IX.** Resultados obtenidos en la comparación estadística.....96
- **Tabla X.** Resultados obtenidos en la comparación estadística.....97
- **Tabla XI.** Resultados obtenidos en la comparación estadística.....98
- **Tabla XII.** Resultados obtenidos en la comparación estadística.....99
- **Tabla XIII.** Toxinotipos encontrados en las cepas de *C. difficile* aisladas.....100

Capítulo 3

- **Tabla XIV.** Número de heces analizadas de cada especie.....119

- **Tabla XV.** Lugares y número de muestras recogidas de animales salvajes del Parque Nacional de Doñana.....121
- **Tabla XVI.** Tabla que muestra los aislados totales obtenidos.....132
- **Tabla XVII.** Organismos identificados mediante secuenciación del gen ribosómico 16S.....134
- **Tabla XVIII.** Prevalencias de los microorganismos identificados como *Clostridium spp*, y de aquellos identificados a nivel de género y especie.....136
- **Tabla XIX.** Cepas totales “clostridios”.....139
- **Tabla XX.** Valores de los aislados obtenidos dentro de la clase *Mammalia*....140
- **Tabla XXI.** Tabla en la que se especifican el número total de aislados a partir de las muestras recogidas de los animales en una localización determinada de Doñana.....143
- **Tabla XXII.** Microorganismos aislados en caballos.....146
- **Tabla XXIII.** Listado de los diferentes perfiles bioquímicos obtenidos en las cepas aisladas de las poblaciones de caballos.....146

Capítulo 4

- **Tabla XXIV.** Muestras de heces porcinas analizadas.....174

Capítulo 5

- **Tabla XXV.** Equivalencia entre el número de colonias observadas en la placa y el valor dado para clasificar esa abundancia.....187
- **Tabla XXVI.** Número de especies diferentes aisladas en cada uno de los medios de cultivo utilizados.....189
- **Tabla XXVII.** Tabla con todas las especies diferentes aisladas, diferenciando bacilos gramnegativos, grampositivos y cocos grampositivos.....196
- **Tabla XXVIII.** Especies de la familia *Enterobacteriaceae* aisladas en cada uno de los ecosistemas.....199
- **Tabla XXIX.** Resultados de abundancia de los diferentes grupos de microorganismos, para los grupos A y B.....201

- **Tabla XXX.** Medias ponderadas de abundancia.....203

Capítulo 6

- **Tabla XXXI.** Cepas aisladas de la flora fecal de gansos.....223

Índice de Figuras

INTRODUCCIÓN

- **Figura 1.** Gráfico que muestra la evolución en las publicaciones sobre el tema *C. difficile* desde 1962 hasta 200916
- **Figura 2.** Imagen de microscopía 100x, de algunos bacilos de *C. difficile* esporulados.....17
- **Figura 3.** Imagen de las colonias de *C. difficile* en agar sangre.....17
- **Figura 4.** Patogénesis.....21
- **Figura 5.** Representación esquemática del *locus* de patogenicidad *PaLoc*, genes que codifican para las dos toxinas principales de *C. difficile*.....22
- **Figura 6.** Distribución de la lesiones en el intestino de las diferentes especies animales con CDI espontánea probada.....41
- **Figura 7.** Imagen esquemática de la mucosa intestinal.....61

Capítulo 1

- **Figura 8.** Comparación mediante un gráfico de barras, de los datos absolutos expresados en la tabla III.....77

Capítulo 2

- **Figura 9.** Mapa en el que se muestra la localización geográfica de las tres zonas muestreadas (zona A: Aragón, zona B: Cataluña, zona C: Castilla La-Mancha).....88
- **Figura 10.** Tira API rapidID32A. Muestra el color de las pruebas bioquímicas cuando son positivas.....91

- **Figura 11.** Gráfico de cajas y bigotes. En este gráfico se representan los valores más frecuentes observados para el conjunto de muestras recogidas.....95
- **Figura 12.** Gráfico de barras en el que se comparan en valores absolutos los datos obtenidos en animales con síntomas de diarrea y sin síntomas de diarrea, en cada granja (A1, A2, A3, B1, B2, B3, C1, C2, C3, C4 y las granjas control).....95
- **Figura 13.** PCR simple de amplificación de un fragmento interno del gen *tcdA* de ~250pb (Kato et al., 1991).....101
- **Figura 14.** Ejemplo de una población con distribución normal para un carácter.....111

Capítulo 3

- **Figura 15.** Mapa que muestra las localizaciones exactas de los lugares de muestreo.....118
- **Figura 16.** PCR múltiple (*tpi*, *tcdA* y *tcdB*) para la confirmación de *C. difficile* de los aislados obtenidos de Doñana.....130
- **Figura 17.** Representación gráfica mediante diagrama circular de los aislados bioquímicamente cercanos al género *Clostridium*.....132
- **Figura 18.** Número absoluto de cepas identificadas a nivel de género y especie.....133
- **Figura 19.** Figura que muestra las prevalencias de la tabla XVIII.....136
- **Figura 20.** Diagrama de barras que compara los perfiles bioquímicos encontrados en las tres poblaciones de caballos estudiadas: de retuertas, de los guardas y de El Rocío147
- **Figura 21.** ciclo vital de *C. difficile*.....155
- **Figura 22.** Ciclo de vida de *W. soli*.....167
- **Figura 23.** Ciclo de vida de *L. animalis* y *L. murinus*.....168
- **Figura 24.** Ciclo de vida de *Paenibacillus*.....168

Capítulo 4

- **Figura 25.** PCR dúplex para los genes *tpi* y *tcdB*, para detectar la presencia de *C. difficile* en heces de cerdo.....177
- **Figura 26.** PCR simple para el gen *tcdA* para detectar la presencia de *C. difficile* en heces de cerdo.....178

Capítulo 5

- **Figura 27.** Gráfico de cajas que compara el número de microorganismos aislados totales en ambas poblaciones de gansos, A y B.....190
- **Figura 28.** Gráfico de cajas que compara el número de especies microbianas diferentes aisladas en agar sangre en aerobiosis, entre los dos grupos de gansos, A y B.....191
- **Figura 29.** Gráfico de cajas que compara el número de especies microbianas diferentes aisladas en agar sangre, en anaerobiosis, entre los dos grupos de gansos, A y B.....191
- **Figura 30.** Representación gráfica del porcentaje de microorganismos diferentes aislados (en las dos poblaciones de gansos).....197
- **Figura 31.** Gráfico de cajas, en el que se comparan el número de cocos aislados en los gansos de los grupos A y B.....198
- **Figura 32.** El número, indica el número de la muestra de ganso, del 1-14 pertenecen a los gansos del grupo A y del 75 al 89, a los gansos del grupo B.....202

Capítulo 6

- **Figura 33.** PCR de amplificación del gen ribosómico 16S.....226
- **Figura 34.** DOAN 4/2.....227
- **Figura 35.** Árbol filogenético para la cepa DOAN 4/2.....228
- **Figura 36.** DOAN 4/5.....229
- **Figura 37.** Árbol filogenético para la cepa DOAN 4/5.....231

- **Figura 38.** Gráfico que muestra el porcentaje de diferencia observadas y esperadas entre las cepas DOAN 4/5 y *Bacillus selenatarsenatis* cepa S3-3.....232
- **Figura 39.** DOAN 6/4.....232
- **Figura 40.** Árbol filogenético para la cepa DOAN 6/4.....234
- **Figura 41.** DOAN 8/2.....234
- **Figura 42.** Árbol filogenético para la cepa DOAN 8/2.....236
- **Figura 43.** DOAN 12/1.....237
- **Figura 44.** Árbol filogenético para la cepa DOAN 12/1.....238
- **Figura 45.** DOAN 12/5.....238
- **Figura 46.** Árbol filogenético para la cepa DOAN 12/5.....240
- **Figura 47.** DOAN 13/1.....240
- **Figura 48.** Árbol filogenético para la cepa DOAN 13/1.....242

ANEXOS

Anexo 1

PERFILES BIOQUÍMICOS

	Identificación de Apiweb	especie	ID (%)	T
Acetobutylicum 1	MUY BUENA IDENTIFICACION	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	99'8	0'81
Acetobutylicum 2	PERFIL DUDOSO	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	99'8	0'42
Acetobutylicum 3	BUENA IDENTIFICACION	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	98'8	0'92
Acetobutylicum 4	PERFIL DUDOSO	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	97'6	0'27
Acetobutylicum 5	PERFIL DUDOSO	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	93'9	0'35
Acetobutylicum 6	MUY BUENA IDENTIFICACION EN EL GENERO	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	92'3	0'85
Acetobutylicum 7	PERFIL DUDOSO	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	90'7	0'35
Acetobutylicum 8	MUY BUENA IDENTIFICACION EN EL GENERO	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	90'5	0'85
Acetobutylicum 9	PERFIL DUDOSO	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	87	0'35
Acetobutylicum 10	IDENTIFICACION ACEPTABLE	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	86'8	0'26
Acetobutylicum 11	IDENTIFICACION ACEPTABLE	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	85'9	0'78
Acetobutylicum 12	BAJA DISCRIMINACION	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	78'7	0'74
Acetobutylicum 13	MUY BUENA IDENTIFICACION EN EL GENERO	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	76'9	0'7
Acetobutylicum 14	IDENTIFICACION NO VALIDA	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	76'8	0'6
Acetobutylicum 15	MUY BUENA IDENTIFICACION EN EL GENERO	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	70'9	0'7
Acetobutylicum 16	IDENTIFICACION NO VALIDA	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	39'5	0'66
Acetobutylicum 17	BUENA IDENTIFICACION EN EL GENERO	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	37'7	0'59
Acetobutylicum 18	BAJA DISCRIMINACION	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	94'5	0'63
Acetobutylicum 19	BUENA IDENTIFICACION EN EL GENERO	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	78'5	0'7
Acetobutylicum 20	BUENA IDENTIFICACION	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	95'9	0'71
Beijerinckii 1	PERFIL DUDOSO	<i>Clostridium beijerinckii/butyricum</i>	78'3	0'32
Beijerinckii 2	MUY BUENA IDENTIFICACION EN EL GENERO	<i>Clostridium beijerinckii/butyricum</i>	77'8	0'85
Beijerinckii 3	BUENA IDENTIFICACION EN EL GENERO	<i>Clostridium beijerinckii/butyricum</i>	72'1	0'62
Beijerinckii 4	PERFIL DUDOSO	<i>Clostridium beijerinckii/butyricum</i>	70'9	0'39
Beijerinckii 5	MUY BUENA IDENTIFICACION EN EL GENERO	<i>Clostridium beijerinckii/butyricum</i>	70'7	0'71
Beijerinckii 7	MUY BUENA IDENTIFICACION EN EL GENERO	<i>Clostridium beijerinckii/butyricum</i>	53'6	0'65

Beijerinckii 8	IDENTIFICACION NO VALIDA	<i>Clostridium beijerinckii/butyricum</i>	34'6	0'72
Beijerinckii 9	IDENTIFICACION NO VALIDA	<i>Clostridium beijerinckii/butyricum</i>	32'9	0'22
Beijerinckii 10	PERFIL DUDOSO	<i>Clostridium beijerinckii/butyricum</i>	63	0'27
Beijerinckii 11	BUENA IDENTIFICACION	<i>Clostridium beijerinckii/butyricum</i>	96	0'39
Beijerinckii 12	BUENA IDENTIFICACION	<i>Clostridium beijerinckii/butyricum</i>	91'9	0'34
Bifermentans 1	PERFIL DUDOSO	<i>Clostridium bifermentans</i>	76'5	0'18
Botulinum 1	PERFIL DUDOSO	<i>Clostridium botulinum 1</i>	99'2	0'46
Botulinum 2	IDENTIFICACION PRESUNTIVA	<i>Clostridium botulinum 2</i>	95'1	1
Botulinum 3	BAJA DISCRIMINACION	<i>Clostridium botulinum 1</i>	63	0'98
Cadaveris1	MUY BUENA IDENTIFICACION EN EL GENERO	<i>Clostridium cadaveris</i>	81	0'54
Clostridioforme 1	MUY BUENA IDENTIFICACION	<i>Clostridium clostridioforme</i>	99'6	0'91
Clostridioforme 2	BUENA IDENTIFICACION	<i>Clostridium clostridioforme</i>	98'4	0'7
Clostridioforme 3	BUENA IDENTIFICACION	<i>Clostridium clostridioforme</i>	98'3	0'84
Clostridioforme 4	BUENA IDENTIFICACION	<i>Clostridium clostridioforme</i>	98'3	0'76
Clostridioforme 5	BUENA IDENTIFICACION	<i>Clostridium clostridioforme</i>	98'2	0'78
Clostridioforme 6	BUENA IDENTIFICACION	<i>Clostridium clostridioforme</i>	97'2	0'95
Clostridioforme 7	MUY BUENA IDENTIFICACION EN EL GENERO	<i>Clostridium clostridioforme</i>	96'5	0'86
Clostridioforme 8	PERFIL DUDOSO	<i>Clostridium clostridioforme</i>	95'4	0'45
Clostridioforme 9	MUY BUENA IDENTIFICACION EN EL GENERO	<i>Clostridium clostridioforme</i>	92'3	0'92
Clostridioforme 10	PERFIL DUDOSO	<i>Clostridium clostridioforme</i>	91'3	0'43
Clostridioforme 11	PERFIL DUDOSO	<i>Clostridium clostridioforme</i>	90'4	0'41
clostridioforme 12	MUY BUENA IDENTIFICACION EN EL GENERO	<i>Clostridium clostridioforme</i>	90'2	0'94
Clostridioforme 13	MUY BUENA IDENTIFICACION EN EL GENERO	<i>Clostridium clostridioforme</i>	83'5	0'86
Clostridioforme 14	PERFIL DUDOSO	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	90'5	0'35
Clostridioforme 15	MUY BUENA IDENTIFICACION EN EL GENERO	<i>Clostridium clostridioforme</i>	86	0'88
Clostridioforme 16	MUY BUENA IDENTIFICACION EN EL GENERO	<i>Clostridium clostridioforme</i>	81'4	0'86
Clostridioforme 17	BUENA IDENTIFICACION EN EL GENERO	<i>Clostridium clostridioforme</i>	79'1	0'79
Clostridioforme 18	IDENTIFICACION NO VALIDA	<i>Clostridium clostridioforme</i>	72'9	0'85
Clostridioforme 19	PERFIL DUDOSO	<i>Clostridium clostridioforme</i>	72'7	0'45
Clostridioforme 20	EXCELENTE IDENTIFICACION EN EL GENERO	<i>Clostridium clostridioforme</i>	72'2	0'96
Clostridioforme 21	BUENA IDENTIFICACION EN EL GENERO	<i>Clostridium clostridioforme</i>	71'8	0'87
Clostridioforme 22	PERFIL DUDOSO	<i>Clostridium clostridioforme</i>	48	0'41
Clostridiofome 23	PERFIL DUDOSO	<i>Clostridium clostridioforme</i>	69'5	0'36

Clostridioforme 21	MUY BUENA IDENTIFICACION EN EL GENERO	<i>Clostridium clostridioforme</i>	53'6	0'65
Clostridioforme 25	PERFIL DUDOSO	<i>Clostridium clostridioforme</i>	60'2	0'43
Clostridioforme 26	PERFIL DUDOSO	<i>Clostridium clostridioforme</i>	53'9	0'44
Clostridioforme 27	BUENA IDENTIFICACION	<i>Clostridium clostridioforme</i>	97	0'4
Clostridioforme 29	BUENA IDENTIFICACION	<i>Clostridium clostridioforme</i>	98'3	0'67
Difficile 1	BUENA IDENTIFICACION EN EL GENERO	<i>Clostridium difficile</i>	69'2	0'96
Fallax 1	BUENA IDENTIFICACION	<i>Clostridium fallax</i>	99'9	0'41
Fallax 2	PERFIL DUDOSO	<i>Clostridium fallax</i>	73'5	0'5
Histolyticum 1 (clostridioforme 28)	PERFIL DUDOSO	<i>Clostridium clostridioforme</i>	51'4	0'64
Histolyticum 2	PERFIL DUDOSO	<i>Clostridium histolyticum</i>	94'4	0'43
Histolyticum 3	BAJA DISCRIMINACION	<i>Clostridium histolyticum</i>	72	1
Histolyticum 4	IDENTIFICACION NO VALIDA	<i>Clostridium histolyticum</i>	71'1	0'5
Histolyticum 5	PERFIL DUDOSO	<i>Clostridium histolyticum</i>	68'5	0'42
Innocuum 1	BUENA IDENTIFICACION	<i>Clostridium innocuum</i>	96'4	0'9
Paraputrificum 1	PERFIL DUDOSO	<i>Clostridium paraputrificum</i>	51'7	0'17
Perfringens 1	MUY BUENA IDENTIFICACION	<i>Clostridium perfringens</i>	99'9	0'66
Perfringens 2	BUENA IDENTIFICACION	<i>Clostridium perfringens</i>	99'9	0'44
Septicum 1	PERFIL DUDOSO	<i>Clostridium septicum</i>	44'3	0'67
Tyrobutyricum 1	BAJA DISCRIMINACION	<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	73'3	1
Tyrobutyricum 2	PERFIL DUDOSO	<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	73'2	0'5

Anexo 2

- Publicaciones derivadas de esta tesis:

- Álvarez-Perez S., Blanco J. L., Bouza E., **Alba P.**, Gibert X., Maldonado J. y García M. E. 2009. Prevalence of *Clostridium difficile* in diarrhoeic and non-diarrhoeic piglets. *Veterinary Microbiology*. 137:302-305.

- Álvarez-Perez S., **Alba P.**, Blanco J. L. y García M. E. 2009. Detection of toxigenic *Clostridium difficile* in pig feces by PCR. *Veterinarni Medicina*, 54: 360–366.

