

Microbiología clínica en fauna salvaje

José Esteban García de los Ríos, Pedro Antonio Jiménez Gómez,
María Paloma Reche Sainz e Irene Rodríguez González

Sección de Microbiología. Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud,
Universidad San Pablo CEU, Ctra. Boadilla del Monte km. 5,3. 28668 Boadilla del Monte, Madrid.

E-mail: jgarios@ceu.es

Los Centros de Recuperación y Hospitales de Fauna Salvaje son entidades, generalmente promovidas por ONGs, que desempeñan un importante papel en el mantenimiento de la biodiversidad. Estos Centros reciben actualmente un gran número de pacientes de muy diversas especies, predominando en el interior de la Península Ibérica las pertenecientes a las rapaces. De esta forma, en los últimos años hemos podido aprender mucho sobre las patologías, los métodos de diagnóstico y tratamiento de las enfermedades de la fauna salvaje. Para llegar a estos resultados es necesario una aproximación multidisciplinar a nuestros estudios en los que se conjugan las aportaciones de los veterinarios, etólogos, anatomopatólogos y, por supuesto, microbiólogos.

Las dificultades que nos encontramos a la hora de intervenir en la fauna salvaje, si las compramos con la clínica humana, son variadas. En primer lugar, el número de especies que se reciben es elevado, presentando importantes diferencias fisiológicas, anatómicas y funcionales, lo que complica el diagnóstico, la interpretación de los resultados, el tratamiento y la evolución del paciente. En segundo lugar, la mayoría de los animales salvajes, como mecanismo de supervivencia, no presentan signos clínicos hasta que están gravemente enfermos y, además, estos síntomas son muy vagos y comunes a muchas enfermedades muy diferentes. La ausencia de síntomas o su inespecificidad hacen el diagnóstico muy complicado. Una última dificultad es la que supone el manejo del paciente para el examen físico, toma de muestras, diagnóstico, tratamiento y rehabilitación. La mayoría de los pacientes, incluidos los que toleran la presencia humana, no están acostumbrados al manejo, por lo que requieren medios especiales.

La ley 4/1989 de Conservación de los Espacios Naturales y de la Flora y Fauna Silvestres establece, en su artículo 26 (apartado 4), que quedan prohibidos la captura, posesión, tráfico y comercio de ejemplares, vivos o muertos, de animales silvestres, especialmente los incluidos en el Catálogo Nacional de Especies Amenazadas. Debido a esta ley, la única fuente de muestras en fauna salvaje son los Centros de Recuperación y Hospitales de Fauna Salvaje. A nuestro laboratorio llegan habitualmente tres tipos de muestras microbiológicas. En primer lugar, las que proceden de casos clíni-

cos de animales atendidos en el Hospital. En segundo lugar, los órganos procedentes de necropsias de animales que llegan muertos al Centro. Por último, muestras procedentes de los programas de cría que desarrollan las diferentes Organizaciones. En este caso, son huevos abortados por motivos desconocidos y muestras para el control de patógenos. En los tres tipos de muestras destacan mayoritariamente los aislamientos de Gram-negativas y, sobre todo, *Enterobacteriaceae*. Las especies detectadas han sido muchas, por lo que pasaremos a tratar de las más representativas.

Las cepas de *E. coli* patógenas en humanos que, a veces, se pueden asociar a animales son las Enteropatógenas (EPEC), Enterotoxigénicas (ETEC), Enteroinvasivas (EIEC), Enterohemorrágicas (EHEC), Enteroagregativas (EaggEC), Uropatógenas (UPEC) y las de Meningitis Neonatal (NMEC). Algunas de éstas han sido aisladas de animales salvajes, como es el caso de las EHEC en ciervos de varios países, o las UPEC, en colibacilosis en avifauna salvaje (O2 K1 y O1 K1 coinciden en el antígeno somático), lo cual es lógico, puesto que al ser eliminados por la orina, estarán presentes en aguas y otros lugares relacionados con la contaminación. Las cepas NMEC se caracterizan por la posesión del antígeno capsular K1, un polisacárido química y antigénicamente idéntico al polisacárido B de *Neisseria meningitidis*. Este polisacárido lo presentan algunos aislados en avifauna salvaje (O2 K1 y O1 K1, coinciden en el antígeno capsular). Cuando *E. coli* actúa como parásito intestinal, tiene genes de virulencia que le facilitan esa forma de vida, induciendo y descubriendo las adhesinas correspondientes. Por el contrario, cuando la infección es sistémica, caso que nos encontramos con más frecuencia en fauna salvaje, *E. coli* induce la producción de su polisacárido capsular que, con su poder antifagocitario, le mantiene más protegido de la fagocitosis en sangre o en los tejidos. De ahí la coincidencia de la presencia del antígeno K1 en las cepas NMEC y alguno de los aislados en avifauna salvaje.

A las cepas citadas como patógenas en humanos, hay que añadir el grupo de las denominadas APEC (*Avian Pathogenic E. coli*), patógenas en aves de consumo, en las que causan aerosaculitis, poliserositis y otras afecciones extraintestinales. Son



Dos buhos del Hospital de Fauna Salvaje de GREFA (Foto: Jordi Colás)

cepas productoras de fimbrias F1 y de aerobactina, sideróforo relacionado con la infección sistémica. En nuestras muestras procedentes de aves salvajes nos hemos encontrado serotipos de APEC ya descritos en aves de abasto y otros no tipables, lo que implicaría su pertenencia a serotipos nuevos. En los casos clínicos de colibacilosis sistémica, las cepas aisladas eran productoras de aerobactina. En estos casos, ante el aislamiento de *E. coli* en varios órganos, se plantea la comprobación de si las cepas aisladas son la misma y si se trata de una cepa capaz de desencadenar una septicemia. Para comprobar los diagnósticos hemos empleado la ribotipificación con sonda usando como enzimas *ClaI* y *MluI*. Tanto la *ClaI*-ribotipificación como la *MluI*-ribotipificación resultaron buenas herramientas para discriminar entre cepas de *E. coli* en diferentes casos clínicos. Para establecer el carácter invasivo, la duración de la enfermedad y las lesiones en los órganos recurrimos a un modelo animal en pollos de gallina.

La incidencia de *Salmonella* en fauna salvaje es mas baja, si la comparamos con *E. coli*. El porcentaje de aislamientos en rapaces de vida libre ha sido inferior al 5% en los últimos años. En el caso de rapaces algunos años en cautividad hemos obtenido números superiores, pero se trata de casos de diseminación de un brote. En aves no rapaces de vida libre encontramos prevalencia superior al 11%, y mayor al 7% en las cautivas, aunque no se puede sacar ninguna conclusión de estas cifras, por ser muestras con números muy diferentes y coincidir también con algunos brotes. Todos nuestros aislados han sido caracterizados como *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, aunque pertenecientes a diferentes serotipos y fagotipos. En general, el serotipo y el fagotipo siguen siendo los marcadores epidemiológicos eficaces en

Salmonella, aunque, cuando se trata de brotes concretos, hemos tenido que recurrir a métodos de tipificación genéticos. En un brote de *Salmonella* serotipo Havana, que afectó a varias especies de animales residentes en el Hospital de Fauna Salvaje de GREFA, recurrimos a AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*). En brotes de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium DT160 que aislamos asociados a mortandad de gorriones hubo que recurrir a ribotipificación, IS200-tipificación y electroforesis en campo pulsado para resolverlos adecuadamente.

Entre otros casos, debidos a otras *Enterobacteriaceae*, podemos citar algunos particularmente interesantes: En primer lugar, dos casos de septicemia por *Yersinia pseudotuberculosis*, un cernícalo común y un pollo de buitre, que serán las primeras descripciones de pseudotuberculosis en rapaces. En segundo lugar, varios casos, no relacionados entre sí, de rapaces y no rapaces con septicemia por *Serratia marcescens*. Y, por último, diferentes casos clínicos con afecciones renales fatales, producidas por *Klebsiella pneumoniae*, en azor, ardilla, búho chico y gaviota reidora.

Una segunda familia importante que se aísla en fauna salvaje es *Chlamydiaceae*. Anteriormente constaba de un único género, *Chlamydia*, que se ha dividido en dos géneros, *Chlamydia* y *Chlamydophila*. Se han añadido dos nuevas especies, *Chlamydia muridarum* y *Chlamydia suis* que, junto con *Chlamydia trachomatis*, constituyen el género *Chlamydia*. El nuevo género, *Chlamydophila*, incorpora las especies *Chlamydia pecorum*, *Chlamydia pneumoniae* y *Chlamydia psittaci*, para dar lugar a *Chlamydophila pecorum*, *Chlamydophila pneumoniae* y *Chlamydophila psittaci*. Por último, aparecen tres nuevas especies derivadas de *Chlamydia psittaci*: *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila caviae* y *Chlamydophila felis*.

Chlamydophila psittaci se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, pudiéndose aislar a partir de un gran número de animales. Esta especie es especialmente contagiosa, agente de la psitacosis u ornitosis característica de las aves. La información acerca de la prevalencia de la infección por clamidia en aves salvajes es muy reducida, existiendo muy pocas investigaciones a este respecto, aunque parece que su incidencia, especialmente en rapaces, es muy baja. Las aves infectadas pueden liberar el agente infeccioso a través de las heces, orina, exudados respiratorios y oculares, produciéndose la dispersión del mismo a través de las corrientes de aire. La ingestión de la bacteria conlleva a la infección de las células epiteliales. También puede haber transmisión ver-

tical que produciría la infección del huevo. Sin embargo, existen marcadas diferencias en la susceptibilidad del huésped dependiendo de la especie del mismo, así como también de la edad del individuo siendo los más jóvenes los que son más susceptibles a la bacteria, que puede desencadenar, en muchos casos, la muerte de los mismos. Los signos clínicos más característicos son un debilitamiento en el plumaje, hipotermia, letargia disnea y deshidratación. Existe también el estado subclínico, característico de las especies con una reducida susceptibilidad o de aquellas infectadas con una cepa de virulencia moderada, apareciendo diarrea y conjuntivitis principalmente. En el estado asintomático, el animal puede eliminar el agente infeccioso a través de las materias fecales. Por tanto, se ha de considerar la posible transmisión del agente infeccioso en aves en cautividad, ya que la existencia de una sola ave infectada por esta bacteria es suficiente para que todas las demás se encuentren expuestas al agente infeccioso, aunque esto no implique que desarrollen la infección. Las infecciones con psitacosis, linfogranuloma venéreo y tracoma constituyen la quinta causa de las infecciones bacterianas asociadas a laboratorio. El contacto y exposición a aerosoles infecciosos en el manejo, cuidado o necropsias de aves infectadas son la principal fuente de psitacosis asociada a laboratorio. Las clamidias se pueden encontrar en tejidos, heces, secreciones nasales y sangre de los animales infectados. Se recomiendan las precauciones propias de un Nivel 2 de Biopeligrosidad. Por esta razón, mientras no dispongamos de los medios adecuados, nos estamos limitando a la simple detección de la presencia de estos microorganismos.

Uno de los métodos que nos permite un diagnóstico rápido de *Chlamydia* en animales tanto sintomáticos como asintomáticos es la realización de un ELFA (*Enzyme Linked Fluorescent Assay*) automático mediante el MiniVIDAS de BioMérieux. Actualmente estamos tratando de optimizar un protocolo para la extracción y detección mediante PCR. Con las limitaciones anteriormente expuestas, sin llegar a obtener resultados que determinen el alcance global de estos microorganismos, nuestros resultados apuntan a la presencia de clamidia en poblaciones de aves salvajes en la naturaleza, siendo causa directa de abortos e inviabilidad de pollos.

Algunos países emplean más de la mitad de su producción de compuestos antimicrobianos en el sector agroalimentario (ganadería, pesca y producción vegetal), usándose la mayor parte en el ganado para estimular el crecimiento. La administración de antibióticos a los animales puede pro-



José Esteban García de los Ríos (2^o por la izq.) es Doctor en Biología por la Universidad Complutense de Madrid. Profesor de Microbiología, actualmente es Director de la Sección de Microbiología en la Facultad de CC Experimentales y de la Salud, Universidad San Pablo CEU de Madrid. Ha trabajado en el campo de la Fitopatología sobre *Pseudomonas savastanoi* y el complejo *Erwinia herbicola-Enterobacter agglomerans*. En los últimos años su trabajo se ha centrado en la Microbiología Clínica en Fauna Salvaje, en colaboración con diversos Centros de Recuperación y Hospitales de Fauna Salvaje. Pertenece a la Wildlife Disease Association. El Grupo de Investigación que dirige, trabaja en Proyectos Relacionados con la Resistencia a Antibióticos y Marcadores Moleculares en Bacterias de origen Clínico y Animal.

Pedro Antonio Jiménez Gómez (3^o por la izq.) es Doctor en Biología por la Universidad San Pablo CEU de Madrid, Profesor de Microbiología en la Facultad de CC Experimentales y de la Salud. Actualmente es Coordinador de Microbiología del Hospital de Fauna Salvaje de GREFA y de otros Centros de Recuperación. Su trabajo de tesis se tituló Estudio de Diversos Grupos Bacterianos con Relevancia Clínica en Hospitales de Fauna Salvaje.

María Paloma Reche Sainz (4^a por la izq.) es Doctora en Farmacia por la Universidad San Pablo CEU de Madrid y Profesora de Microbiología en la Facultad de CC Experimentales y de la Salud. Beca Erasmus en el *Centre Hospitalier Regional de Nantes* (Francia), donde desarrolló su Tesina de Licenciatura "Étude bactériologique et épidémiologique des souches de *E. coli* productrices de bêta-lactamases du type TRI". Su trabajo de tesis se tituló Estudio Epidemiológico de aislados de *Salmonella* spp. procedentes de aves salvajes. Pertenece a la Raptor Research Foundation.

Irene Rodríguez González (1^a por la izq.) es Licenciada en Farmacia por la Universidad San Pablo CEU de Madrid, su trabajo de investigación sobre el que está haciendo el doctorado es Integrones de Clase I en *Enterobacteriaceae* de origen humano y animal.

ducir la selección de bacterias resistentes a los antibióticos en la población animal que después puede extenderse a los humanos a través de la

cadena alimentaria. Esta situación ha llevado a un serio aumento y diseminación de bacterias multirresistentes, no sólo entre las patógenas, sino también entre las bacterias comensales, constituyendo un reservorio de genes de resistencia para las patógenas. La fauna salvaje no se encuentra aislada de la cadena alimentaria, por lo que muchos de los fenómenos observables en ganadería y en clínica humana los estamos observando en estos animales. De forma rutinaria, todos los aislamientos que proceden de casos clínicos, son sometidos a antibiograma, no solo para establecer los posibles tratamientos, sino también para estudiar las resistencias en aquellos casos en los que sus fenotipos nos indican que pueden ser de interés. El estudio de cepas resistentes lo hemos limitado, por razones prácticas, a las *Enterobacteriaceae* y entre los antibióticos, hemos empezado centrándonos en el estudio de algunos de los que se emplean en veterinaria y ganadería, β -lactámicos y quinolonas, aunque actualmente estamos ampliando la investigación a integrones portadores de multirresistencia.

Las principales resistencias a quinolonas se deben a mutaciones en la DNA-girasa y en la topoisomerasa IV. Una vez constatado el fenotipo de resistencia mediante antibiogramas por difusión y determinación de la CMI, detectamos el genotipo de resistencia, buscando las mutaciones en las subunidades de ambas enzimas. Para ello amplificamos y secuenciamos las regiones determinantes de la resistencia a quinolonas, buscando mutaciones en los genes *gyrA* y *gyrB*. En la topoisomerasa IV, buscamos las mutaciones en el gen *parC* y en el *parE*. En la actualidad, tenemos aislados, secuenciados y depositados en el *Gene Bank* de la NCBI, 44 genes de resistencia de *Salmonella* y *E. coli*, y hemos enviado para su publicación algunos trabajos. La principal mutación de resistencia que hemos encontrado en *E. coli* ha sido en *gyrA*, en la región determinante de resistencia a quinolonas (QRDR), que supone un cambio de la serina en posición 83 por una leucina, como se detecta en clínica humana. Se trata de un cambio tan pequeño, que no afecta a la actividad de la enzima, lo que nos explicaría su persistencia en el medio ambiente.

La resistencia a β -lactámicos en *Enterobacteriaceae* se debe principalmente a la producción de β -lactamasas, por lo que nos hemos centrado en el aislamiento y caracterización de estas enzimas en nuestros aislamientos. Entre las β -lactamasas detectadas a partir de cepas procedentes de fauna salvaje, podemos dar algunos datos: El 60% de los aislados de *E. coli* con β -lactamasas, la enzima detectada era AmpC y, en un caso, una cepa

hiperproductora. También detectamos AmpC en *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, *Morganella morganii* y *Citrobacter freundii*. Entre las β -lactamasas plasmídicas, destaca, no sólo en *E. coli*, la presencia de TEM1, en algunos casos simultáneamente con AmpC, e hiperproducción de TEM1 con resistencia a los inhibidores. En *Salmonella* hemos detectado TEM1 y TEM2. Finalmente, en casi todas las cepas de *Klebsiella pneumoniae*, hemos detectado β -lactamasas cromosómicas tipo SHV1.

Desde que se estudió el transposón Tn21, muchos fenotipos de multirresistencia se han asociado a integrones. La evolución y diseminación de las bacterias portadoras de estas estructuras, así como de los genes de resistencia es uno de los aspectos importantes que estamos desarrollando. En ese sentido, en nuestros estudios preliminares, ya hemos podido constatar la existencia de integrones de clase I en aislados de origen humano y animal, no descritos en la bibliografía.

Finalmente, queremos destacar que estos trabajos que venimos desarrollando, no son solamente investigación básica para incrementar nuestro conocimiento microbiológico. También suponen un apoyo, aún no podemos valorar su cuantía, al mejor conocimiento y a la conservación de nuestras especies salvajes. De hecho, la demanda de análisis microbiológico por parte de los Centros de Recuperación se ha incrementado notablemente en los últimos años, y cada vez son más las Organizaciones, procedentes de distintas Comunidades Autónomas, que acuden a nosotros.

Agradecimientos

Estos trabajos se llevan a cabo gracias al Proyecto de Investigación "Aplicación de nuevas técnicas moleculares al estudio de la microbiota normal y patógena de origen humano y animal", Proyecto 13/99 de la Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud, Universidad San Pablo CEU de Madrid.

Agradecemos la colaboración de los Centros de Recuperación y Hospitales de Fauna Salvaje: GREFA (Grupo para la Recuperación de la Fauna Autóctona y su Hábitat), AMUS (Asociación por el Mundo Salvaje), Brinzal y DEMA (Grupo de Defensa Medioambiental), Delegación Provincial de Cádiz de la Consejería de Medio Ambiente de Andalucía, CRAS-Zoológico de Jerez, Esparvel de Toledo, C. Rodríguez de la Estación Biológica de Doñana y J. Compañ de la Delegación de Medio Ambiente del Ayuntamiento de Colmenar Viejo (Madrid)

Al Dr A. Ramis, del Servei de Diagnòstic de Patologia Veterinària, Facultat de Veterinària de la

Universitat Autònoma de Barcelona.

Por último, nuestro reconocimiento a la ayuda prestada en el serotipado a los Doctores M.A. Usera y A. Echeíta, de la Sección de Enterobacterias en el Servicio de Bacteriología del Centro Nacional de Microbiología, y al Dr J. Blanco, Laboratorio de Referencia de *E. coli*, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, Lugo.

Bibliografía

- Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. (1995). A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 39: 1211-1233.
- Cambau E, Gutmann L. (1993). Mechanisms of resistance to quinolones. *Drugs*, 45: 15-23.
- Goldstein C, Lee MD, Sánchez S, Hudson C, Phillips B, Register B, Grady M, Liebert C, Summers AO, White DG, Maurer JJ. (2001). Incidence of Class 1 and 2 Integrases in Clinical and Commensal Bacteria from Livestock, Companion Animals, and Exotics, *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 723-726.
- Livermore DM. (1995). β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, 8: 557-584.
- Morishita TY, Aye PP, Brooks DL. (1997). A survey of diseases of raptorial birds. *J. Avian Med. Sur.*, 11: 77-92.
- Van der Bogaard AE, Stobbering EE. (2000). Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. *Int. J. Antimicrob Agents*, 14: 327-35.