

UNIVERSIDAD NACIONAL
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO
POSGRADO REGIONAL EN CIENCIAS VETERINARIAS TROPICALES



Clostridium difficile: Determinación de genotipos en Suinos de Costa Rica

MAURICIO ALEJANDRO ANDINO MOLINA

Universidad Nacional, Heredia, Octubre de 2017

**Tesis sometida a consideración del Tribunal Examinador del Posgrado Regional en
Ciencias Veterinarias Tropicales, Maestría en Enfermedades Tropicales para optar al
grado de *Magister Scientiae***

***Clostridium difficile*: Determinación de genotipos en Suinos de Costa Rica**

MAURICIO ALEJANDRO ANDINO MOLINA

Tesis presentada para optar al grado de *Magister Scientiae* en Enfermedades Tropicales cumple con los requisitos establecidos por el Sistema de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.

Miembros del Tribunal Examinador

Representante del Consejo Central del Posgrado

**Sandra Estrada Ph.D.
Coordinador PCVET**

**Carlos Quesada Ph.D.
Tutor**

Elías Barquero Ph.D.

Lector

César Rodríguez Ph.D.

Lector

**Mauricio Alejandro Andino Molina
Sustentante**

RESUMEN GENERAL

Clostridium difficile es un enteropatógeno con amplia distribución geográfica e importancia a nivel clínico; su virulencia y resistencia a los antimicrobianos son actual objeto de estudio a nivel internacional. En animales, *C. difficile* puede causar diarrea y lesiones a nivel de tracto gastrointestinal en diversas especies domésticas. En cerdos, los principalmente afectados son los lechones, cuyas tasas de colonización y su aparente predisposición fisiológica les convierten en posibles reservorios, causando en algunos casos diarrea y lesiones patogénicas severas. Ciertos genotipos de *C. difficile* ha sido detectados y descritos indistintamente en animales y humanos. En Costa Rica, *C. difficile* ha sido reportado como causante de brotes hospitalarios, comunitarios y se ha detectado en productos cárnicos de consumo. Se analizaron veinte (20) aislamientos, obtenidos a partir de muestreos en cuatro fincas de producción públicas y privadas. Se detectaron tres genotipos: RT078/NAP7 (20%), RTFLI-CR₁/SmaI 1148 “RT014/5” (30%) y RT596 (50%), siendo A⁺B⁺CDT⁺, A⁺B⁺CDT⁻ y A⁻B⁻CDT⁻, respectivamente. Adicionalmente se detectaron diez perfiles MLVA y tres grupos clonales correspondientes con los genotipos detectados, con los cuales se construyó un árbol de expansión mínima (MST) que mostró que los aislamientos analizados poseen intravariabilidad mínima y conservada dentro de los grupos clonales resultantes (SLV ≤ 2 y < 10). Se concluye que *C. difficile* se encuentra presente en lechones de Costa Rica, colonizando el tejido gastrointestinal de los mismos. De los genotipos encontrados, RT078/NAP7 ha sido previamente detectado en un caso clínico humano; FLI-CR₁/SmaI 1148 (RT014/5), probablemente pertenece al mismo linaje de RT014/NAP4, detectado en aislamientos previamente caracterizados. Ambos, RT078/NAP7 y RT014/NAP4, son de alta importancia epidemiológica en Europa y América, y han sido detectados a nivel hospitalario

nacional; por lo tanto, podrían ser elementos de riesgo considerable en la evolución y dinámica de *C. difficile* a nivel comunitario en el país.

En los humanos se ha reportado la asociación entre el uso de fármacos como fluoroquinolonas y clindamicina como factores de riesgo para la infección (CDI) En animales de producción, la actividad *in vitro* de los antibióticos ha sido estudiada con mucho menos amplitud que en aislamientos clínicos, y no existen puntos de corte para determinar la resistencia de bacterias anaerobias de origen veterinario y en humanos aún están en constante revisión y cambio por los organismos de referencia CLSI y EUCAST. Existe un creciente número de reportes de solapamiento entre especies y hospederos de genotipos virulentos de *C. difficile*, así como de perfiles de resistencia y multiresistencia a los antibióticos. En Costa Rica, se han caracterizado aislamientos clínicos hipervirulentos y ampliamente multiresistentes a un importante número de clases de antibióticos. En el presente trabajo, se analizaron veinte aislamientos toxigénicos y no toxigénicos de *C. difficile* y al ser tipificados molecularmente presentaron los genotipos RT078/NAP7, RT-FLI-CR₁ y RT596), provenientes de fuentes porcinas, aparentemente sanas y se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC) para diecisiete (17) antibióticos pertenecientes a diversas categorías o clases (en la epidemiología de las infecciones de *C. difficile*, CDI) por medio del método epsilométrico ETEST®. Todos los aislamientos registraron MIC por sobre los puntos de corte establecidos (resistencia), en al menos tres clases diferentes de antibióticos (multiresistencia). Con esto se consigue generar los primeros datos de resistencia en la región de Centro América y México en aislamientos de *C. difficile* de origen veterinario productivo y detectar posibles reservorios de multiresistencia a los antimicrobianos en cepas con alto potencial epidémico mundial como RT078/NAP7.

AGRADECIMIENTOS

Al DAAD (Servicio Alemán de Intercambio Académico) y su personal en San José (Grettel e Irena), por la maravillosa oportunidad y apoyo en el desarrollo de esta experiencia académica, así como a María en DAAD Alemania,

A mis tutores y asesores académicos, Carlos, Elías y César, por todas las facilidades técnicas y científicas que hicieron posible mi investigación; por brindarme su ayuda incondicional, amistad, sus valiosos y extensos conocimientos y sobre todo por permitirme aprender de cada uno de ustedes,

A Evelyn Rodríguez, quien me apoyó y brindó su cariño,

A Caterina Guzmán y todos los integrantes administrativos del PIET, con especial agradecimiento a Mayra y Adrian,

A mis queridos amigos (anteriormente maestros): Edgardo Tzoc, Ekaterina Bonilla, Silvia Pineda, Lelany Pineda, Reina Laura Rivera; por todo el apoyo brindado a lo largo de estos años, así mismo por la inspiración y el deseo de superación transmitidos,

A Dr. Seyboldt, Sandra, Renate, Dr. Neubauer y Dr. Schmoock del FLI en Alemania, así como a Mostafa, Prasad, Thomas, Qudrat y Omid, quienes hicieron de mi estadía una grata experiencia,

A mis amigos de la UNAH: Karina, Lucy, Julia y Mario, quienes me han acompañado por muchos años en búsqueda del conocimiento y la academia,

A mis amigas de la UNA: Daisy, Marta y Luana, y sus respectivas familias, quienes me han apoyado y amado desde el principio,

A mis amigos del DAAD: Rocío, Rocío y Alicia, las quiero como parte de mi familia,

A mi amigo Greivin, quien convivió conmigo se ha convertido en familia también,

A Dylcia, Alicia, Lauren, Dione y Aida, del laboratorio de bacteriología y patología aviar de la UNA, sin su ayuda y cariño no habría sido lo mismo,

A Robin y don Pablo, del laboratorio de investigación en bacteriología anaerobia de UCR, su colaboración y ayuda me han sido valiosas,

A Nelly de Chacón y su familia, por su cariño y apoyo, por haberme abierto las puertas de su casa y compartir conmigo tantas cosas,

A los médicos veterinarios y personal administrativo de TEC y UTN, que hicieron posible el desarrollo de la investigación, su ayuda ha sido valiosa,

Al personal administrativo del PCVET y de la Escuela de Medicina Veterinaria de la UNA, hicieron mi estadía maravillosa... Gracias Dra. Gaby Dolz, por su apoyo y constante cooperación; María Arias, su cariño y colaboración han sido una bendición,

A todos y cada uno de quienes me han apoyado, enseñado y acompañado,

y especialmente, agradezco a Lord Ganesha por su compañía, inspiración y ayuda; quien siempre abrió caminos concediéndome fortuna para lograr mis objetivos.

DEDICATORIA

A mi querida familia: Olivia, Lariza, Nazareth y Dario, les amo siempre...

INDICE

CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN	XXIII
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y FENOTÍPICAS	XIV
BIOLOGÍA Y PATOLOGÍA.....	XV
FACTORES DE VIRULENCIA.....	XVI
ECO-EPIDEMIOLOGÍA Y DISTRIBUCIÓN	XVI
FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A INFECCIÓN POR <i>C. difficile</i> EN ANIMALES	XX
DIAGNÓSTICO DE <i>C. difficile</i> EN MEDICINA VETERINARIA.....	XXI
CULTIVO	XXI
INMUNOENSAYO	XXI
BIOLOGÍA MOLECULAR: PCR.....	XXII
TÉCNICAS DE TIPIFICACIÓN Y GENÓMICA DE <i>C. difficile</i>	XXIII
MLVA.....	XXIII
PFGE.....	XXIV
RIBOTIPO Y PCR RIBOTIPO	XXIV
OTRAS TÉCNICAS (TOXINOTIPIFICACIÓN, WGS, MLST)	XXV
RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS	XXVI
BIBLIOGRAFÍA	XXVIII

CAPÍTULO 1

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLAMIENTOS DE *Clostridium difficile*: LECHONES EN SISTEMAS DE PRODUCCIÓN PÚBLICA Y PRIVADA EN CUATRO GRANJAS DE COSTA RICA.

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	4
METODOLOGÍA	6
RESULTADOS	11
DISCUSIÓN.....	15
CONCLUSIONES	19
RECOMENDACIONES	21
BIBLIOGRAFÍA	22
ANEXOS.....	28

CAPÍTULO 2

PERFILES DE MULTIRESISTENCIA EN AISLAMIENTOS DE *Clostridium difficile*, GENOTIPOS RT078/NAP7, RTFLI-CR1 Y RT596, EN TRES GRANJAS PORCINAS DE COSTA RICA.

RESUMEN	31
INTRODUCCIÓN	34
METODOLOGÍA	36
RESULTADOS	38
DISCUSIÓN.....	41
CONCLUSIONES	47
RECOMENDACIONES	48
BIBLIOGRAFÍA	49
ANEXOS.....	56

INDICE DE CUADROS

CAPÍTULO 1

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLAMIENTOS DE *Clostridium difficile*: LECHONES EN SISTEMAS DE PRODUCCIÓN PÚBLICA Y PRIVADA EN CUATRO GRANJAS DE COSTA RICA.

CUADRO 1. DISTRIBUCIÓN DE MUESTRAS DE HISOPADOS RECTALES.....	6
CUADRO 2. FINCAS Y AISLAMIENTOS DE <i>C. difficile</i>	11
CUADRO 3. PERFILES ALÉLICOS DE RT596, FLI-CR1 Y RT078/NAP7	14

CAPÍTULO 2

PERFILES DE MULTIRESISTENCIA EN AISLAMIENTOS DE *Clostridium difficile*, GENOTIPOS RT078/NAP7, RTFLI-CR1 Y RT596, EN TRES GRANJAS PORCINAS DE COSTA RICA.

CUADRO 1. ANTIMICROBIANOS Y PUNTOS DE CORTE UTILIZADOS	37
CUADRO 2. DISTRIBUCIÓN DE MICs, MIC ₅₀ , MIC ₉₀ ENTRE GENOTIPOS	38
CUADRO 3. PERFILES DE MULTIRESISTENCIA ENTRE GENOTIPOS	40
ANEXO1. ESTUDIOS RECIENTES EN <i>C. difficile</i> (VETERINARIO, HUMANO Y MIXTO)	56

INDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLAMIENTOS DE *Clostridium difficile*: LECHONES EN SISTEMAS DE PRODUCCIÓN PÚBLICA Y PRIVADA EN CUATRO GRANJAS DE COSTA RICA.

FIGURA 1. MORFOLOGÍA COLONIAL Y CELULAR DE <i>C. difficile</i>	12
FIGURA 2. PATRONES MOLECULARES Y DISTRIBUCIÓN DE AISLAMIENTOS DE <i>C. difficile</i>	13
FIGURA 3. ÁRBOL DE EXPANSIÓN MÍNIMA (RT596, FLI-CR1 Y RT078/NAP7)	15
ANEXO 1. FORMULARIO DE REGISTRO CLÍNICO.....	28
ANEXO 2. COMPARACIÓN DE PATRONES DE MACRORRESTRICIÓN PFGE	29
ANEXO 3. ÁRBOL DE EXPANSIÓN MÍNIMA RT078/NAP7 (COSTA RICA Y EUROPA)	30

CAPÍTULO 2

PERFILES DE MULTIRESISTENCIA EN AISLAMIENTOS DE *Clostridium difficile*, GENOTIPOS RT078/NAP7, RTFLI-CR1 Y RT596, EN TRES GRANJAS PORCINAS DE COSTA RICA.

FIGURA 1. PORCENTAJES DE RESISTENCIA ENTRE GENOTIPOS DE <i>C. difficile</i>	39
FIGURA 2. DISTRIBUCIÓN Y SIMILITUD DE PERFILES DE RESISTENCIA ENTRE GENOTIPOS	40

INTRODUCCIÓN GENERAL

Clostridium difficile, es un patógeno de marcada importancia en humanos, con reportes de severidad y resistencia a antibióticos en aumento a nivel mundial (Smits *et al.*, 2016; Martin *et al.*, 2016; Clements *et al.*, 2010). En medicina veterinaria, *C. difficile* ha sido estudiado en diversas especies; en animales de producción como: porcinos y bovinos, se ha reportado su presencia; su importancia como reservorio y posible fuente de infección zoonótica, continúan aún en estudio (Rodríguez-Palacios *et al.*, 2013; Rodríguez *et al.*, 2012; Keessen *et al.*, 2011b). *C. difficile* ha sido también reportado en especies domesticas (Silva *et al.*, 2013a; Silva *et al.*, 2013b). En lechones, se ha reportado un incremento en los casos de diarrea neonatal, pérdida de peso y patologías relacionadas (Songer y Uzal, 2005); *C. difficile* puede colonizar porcinos de forma sub-clínica, lo que podría constituir un posible factor de riesgo para los humanos y pérdidas económicas para los productores (Songer, 2010). *C. difficile* ha sido también aislado a partir de alimentos para consumo humano como: ensaladas (Bakri *et al.*, 2009), pescado (Metcalf *et al.*, 2011) y carne (Harvey *et al.*, 2011).

Las prevalencias reportadas de *C. difficile* varían considerablemente debido a diversos factores tales como: tamaño y disponibilidad de la muestra, metodología utilizada y manejo apropiado de las muestras (Blanco *et al.*, 2013); los factores anteriores aunados a las características del patógeno convierten a *C. difficile* en un microorganismo difícil de estudiar y manipular (Songer, 2010). Diversas metodologías de tipificación son utilizadas para su estudio (Knetsch *et al.*, 2013); siendo el ribotipo uno de los más utilizados, donde se detectan diferencias en los patrones generados posteriores a la amplificación de espaciadores intragénicos específicos, dentro de las regiones codificantes del ADN para unidades ribosomales 16S/23S, en geles de agarosa o electroforesis capilar (Janezic y Rupnik, 2010).

Sin embargo, en lechones, algunos estudios reportan frecuencias de hallazgo variables, entre el 52 y 95% de los casos, con una predominancia del ribotipo 078/NAP7 (Dubberke *et al.*, 2011). En Europa, el ribotipo 078/NAP7, que ha sido tradicionalmente reportado o aislado en porcinos y bovinos, se ha convertido en el tercer genotipo de importancia en salud pública y ha sido asociado a brotes en humanos (Goorhuis *et al.*, 2008), con características de hipervirulencia y amplia distribución (Bauer *et al.*, 2011). Linajes relacionados con el ribotipo 078/NAP7, han sido también descritos en Estados Unidos y Asia; su cercana homología al ribotipo 078/NAP7, aunado al aparente solapamiento entre cepas humanas y animales, supone un posible riesgo zoonótico y un importante elemento de estudio (Wu *et al.*, 2016; Marsh y Harrison, 2015).

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y FENOTÍPICAS

Clostridium difficile es una bacteria Gram-positiva, formadora de esporas ovales y subterminales, anaerobia estricta que produce colonias rizoides no hemolíticas en agar sangre. En agar CCFA (Cicloserina-Cefoxitina-Fructosa-Agar) la morfología colonial típica, después de 48 horas de incubación en anaerobiosis es: colonias planas o ligeramente elevadas, rizoides, de color amarillento opalescente, con 4 milímetros de largo aproximadamente y con un fuerte olor a caballeriza o desechos de caballo. Estas colonias emiten una fluorescencia amarillo-verdosas bajo luz U.V. (Avbersek *et al.*, 2011; Delmée *et al.*, 2005) *C. difficile* es una especie móvil; catalasa, indol, ureasa, lipasa y lecitinasa negativa (Dubberke *et al.*, 2011), pero es positiva para la prueba de prolina-β-naftilamida (*RapID™ ANA II System*).

BIOLOGÍA Y PATOLOGÍA

Para *Clostridium difficile*, las endo-esporas constituyen la principal vía de diseminación y contagio para los hospederos, brindándole además un mecanismo de protección y supervivencia (Paredes-Sabja *et al.*, 2014). Las lesiones en la mucosa son características y conllevan a la descompensación electrolítica del hospedero (Carroll y Bartlett, 2011). Modelos animales han permitido el estudio de los mecanismos de virulencia, patogenicias, patologías y perfiles de resistencia o susceptibilidad a fármacos (Hutton *et al.*, 2014).

Las infecciones por *C. difficile* en lechones, generalmente, producen lesiones tóxicas en la región cecal, con cuadros de colitis entérica necrotizante, edema mesocolónico, ascitis, hidrotórax, tiflocolitis, diarrea con liberación de exudado inflamatorio, edema submucoso extenso, proliferación mucosa, inflamación celular y daño epitelial generalizado. (Steele *et al.*, 2010; Álvarez-Pérez *et al.*, 2009b). En un estudio comparativo entre hatos de modelos porcinos, la fisiopatología predominante es la enteritis ulcerada proliferativa, necrosis epitelial superficial y la liberación de exudado inflamatorio (Kongsted *et al.*, 2013). Todos estos hallazgos obedecen a ciertos factores predisponentes, tales como microbiota intestinal alterada o inexistente como producto del uso indiscriminado o prolongado de antibióticos, estado de salud del hospedero y la cepa que esté causando la infección, aunado a la presencia de las toxinas *TcdA*, *TcdB* y CDT (Songer *et al.*, 2000).

En síntesis, la patogenicia de *C. difficile* en el hospedero estará constituida por la evasión del sistema inmune innato, la adherencia a la mucosa del epitelio intestinal y la multiplicación de las células vegetativas, que en algunas ocasiones podrá estar adicionalmente mediada por

componentes bioquímicos secretados por la bacteria, tales como enzimas proteolíticas, y la producción y secreción de toxinas (Janoir, 2015).

FACTORES DE VIRULENCIA

El principal factor de virulencia de *C. difficile* es la producción de las toxinas *TcdA TcdAy TcdB* (Toxinas A y B, respectivamente), siendo *TcdB* a quien se le atribuye mayor patogenicidad (Burke y Lamont, 2014), las cuales se encuentran estrechamente relacionadas (Carter *et al.*, 2012). Las toxinas, *TcdA TcdAy TcdBTcdB*, son principal y generalmente responsables de la enfermedad, mediante la inactivación por glucosilación de GTP-asas como Rho, Rac y Cdc42 (Di Bella *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2011), influyendo en la morfología, la división celular y el tráfico membranal, y eventualmente la muerte celular.

Algunas cepas producen también una tercera toxina conocida como toxina binaria (CDT) (Houser *et al.*, 2012). El aporte patogénico de CDT no es tan claro aún; CDT es una toxina ADP-ribosilante que causa disrupción del cito esqueleto celular, provocando la pérdida abundante de fluidos intracelulares, redondeamiento y eventual muerte celular y ha sido encontrada en casos severos de infecciones por *C. difficile* (Gerding *et al.*, 2014).

ECO-EPIDEMIOLOGÍA Y DISTRIBUCIÓN

En los últimos años se ha visto un incrementado interés por el estudio de *C. difficile* (Bassetti *et al.*, 2012). *C. difficile*, es una bacteria versátil, puede estar presente en diversos ambientes, sean estos hospitalarios o domésticos; adicionalmente, se ha reportado la presencia o portaje de cepas toxigénicas y no toxigénicas en perros, gatos y otros animales de compañía. La posibilidad de intercambio entre hospederos, así como la variabilidad

genética en el locus de patogenicidad, suponen un riesgo latente para la salud humana y animal (Silva *et al.*, 2013b; Schneeberg *et al.*, 2012; Weese *et al.*, 2010a).

La diseminación aérea, así como el transporte e intervención antropogénica, involucradas en su distribución, constituyen nuevos elementos de estudio; se encontró que las esporas de *C. difficile* pueden encontrarse a distancias de hasta 20 metros, desde las granjas y criaderos porcinos; así mismo, la variabilidad del viento y las características ecológicas de los terrenos y áreas circundantes pueden, de hecho, intervenir en la distribución y abundancia de las mismas, donde las acciones antropogénicas en el desarrollo de las actividades de cría y mantenimiento de los establecimientos, coinciden con el incremento en la presencia de esporas de *C. difficile* (Keessen *et al.*, 2011a).

Las vías y mecanismos de transmisión son ampliamente estudiados; se ha demostrado, por ejemplo, que los lechones pueden infectarse con *C. difficile* una hora después de haber nacido y que la transmisión vertical no es factible (Hopman *et al.*, 2011). La susceptibilidad del hospedero varía con la edad del mismo, se ha demostrado que los lechones < 7 días poseen tasas de infección y colonización altas y que a medida crecen (posterior a los 30 días) la prevalencia de las mismas decae considerablemente (Arruda, 2014; Weese *et al.*, 2010b).

Así mismo, la naturaleza del estudio y las metodologías utilizadas, pueden influenciar en los resultados obtenidos, suponiendo esto una probable fuente de subestimación en las tasas de prevalencia reportadas (Blanco *et al.*, 2013). La tipificación de los aislamientos y cepas es ampliamente utilizada con fines epidemiológicos, el ribotipo es el método más usado en diversos países (Janezic *et al.*, 2014a). Los genotipos predominantes en muestras de origen porcino, según diversos autores, son los RT078/NAP7 y RT029, donde se han descrito brotes asociados al genotipo virulento RT078/NAP7; este último, encontrado nativamente en

porcinos, lo que podría representar un interesante traslape entre hospederos (Keessen *et al.*, 2011b; Goorhuis *et al.*, 2008).

La genotipificación en el estudio de *C. difficile*, es utilizada para la investigación epidemiológica de brotes, la clasificación y distribución de cepas a nivel regional (Smits, 2013; Sabat *et al.*, 2013); los diversos mecanismos descritos permiten a su vez ubicar y rastrear cepas, analizando a la vez sus interacciones y la posible relación y transmisión entre animales y humanos (Knetsch *et al.*, 2013). Existen diversas técnicas para la genotipificación, tales como: pulсотipificación, ribotipificación y secuenciación completa del genoma, entre otras; siendo los principales obstáculos para su implementación generalizada: la falta de consenso entre laboratorios para su comparabilidad y la variedad de metodologías aplicadas (Dingle y MacCannell, 2015). Estas metodologías pueden utilizar enzimas de restricción o cebadores y realizar identificación de regiones específicas y conservadas de genoma, donde patrones en bandas o algoritmos complejos como el desarrollado en secuenciación de genoma completo (WGS), son utilizados para su interpretación y clasificación (Sachse y Moebius, 2009; Kuijper *et al.*, 2009).

En Europa se han descrito diversos ribotipos de *C. difficile*, entre ellos el RT027, RT078, RT017, RT 18, RT014, RT001 y RT002, como responsables de los brotes reportados y como potenciales fuentes de infección para distintas poblaciones, tanto humanas como veterinarias, siendo el genotipotipo RT078/NAP7, el de mayor importancia en América y Europa para porcinos y bovinos, y emergente para humanos (Aboutaleb *et al.*, 2014; Schneeberg *et al.*, 2013; Bauer *et al.*, 2011; Freeman *et al.*, 2010).

Se llevó a cabo un estudio en Australia con aislados provenientes de hospederos porcinos, en 52% de las muestras, fue posible el aislamiento de *C. difficile* y el 87% de los mismo era de tipo toxigénico; un 23% de los aislamientos corresponde al hallazgo del

genotipo RT014/NAP4, causante de infecciones por *C. difficile* en humanos. Lo anterior nos demuestra la gran versatilidad del patógeno y la necesidad de estudios prospectivos para esclarecer su posible participación en infecciones de tipo zoonóticas en regiones donde nunca se ha estudiado (Knight *et al.*, 2015; Knight *et al.*, 2013).

Recientemente se ha reportado la implicación del genotipo 127/linaje RT078, como agente causal de CDI en Asia, encontrándose también en aislamientos humanos y veterinarios, lo que brinda mayor información y evidencia, desde luego cuestionable, sobre el posible rol zoonótico de *C. difficile*, y que, a la vez, contribuye en el análisis de su dinámica en las poblaciones (Wu *et al.*, 2016). La gran cantidad de reportes asociados con brotes y cuadros patológicos en poblaciones humanas y animales susceptibles sigue en aumento (Moono *et al.*, 2016).

El genotipo RT027/NAP1, asociado también a brotes humanos especialmente en Norte América, ha sido reportado a partir de lechones, animales domésticos, bovinos y productos cárnicos (Janezic *et al.*, 2014a; Dubberke *et al.*, 2011; Gould y Limbago, 2010). *C. difficile* genotipos RT078/NAP7 y RT027/NAP1, han sido reportados en muestras de aguas residuales y compuestos orgánicos de abono (Changyun, 2015); el genotipo RT078/NAP7 fue aislado a partir de diversas superficies dentro de instalaciones de producción porcina (Keessen *et al.*, 2011a), y en aguas y ríos diversos ribotipos fueron recuperados, siendo el RT014 el de mayor frecuencia y que ha sido previamente aislado a partir de muestras clínicas de humanos y animales (Zidaric *et al.*, 2010). *C. difficile* ha sido estudiado en muestras de origen veterinario, con el fin de caracterizar su presencia en diversas especies, varios ribotipos han sido determinados, demostrando así su versatilidad y complejo dinamismo (Janezic *et al.*, 2014b).

En Costa Rica se han reportado brotes y casos comunitarios en humanos (Quesada-Gómez *et al.*, 2012), donde han sido descritos los genotipos RT027/NAP1, RT001/NAP2, RT014/020/NAP4, RT002/NAP6, RT017/NAP9, y RT012/NAP_{CR1} (Quesada-Gómez *et al.*, 2015), observándose una marcada hipervirulencia en los genotipos RT027/NAP1 y RT012/NAP_{CR1} (Quesada-Gómez *et al.*, 2015; Quesada-Gómez *et al.*, 2010). *C. difficile* RT029/NAP_{CR}, toxigénico y observada en casos clínicos, también ha sido aislado a partir de productos cárnicos para consumo humano (Quesada-Gómez *et al.*, 2013).

FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A INFECCIÓN POR *C. difficile* EN ANIMALES

El uso y abuso de antibióticos de amplio espectro, que provocan un efecto de barrido en la microbiota intestinal, constituye uno de los principales factores que facilitan la colonización y la enfermedad por *C. difficile* en porcinos (Keessen *et al.*, 2013). adicionalmente se ha encontrado que el pobre desarrollo de microbiota intestinal, la edad y dosis bacteriana, contribuyen con la colonización exitosa del patógeno y que en altas concentraciones su patogenicidad puede aumentar (Arruda, 2014). Otro estudio intento determinar si existen factores ambientales o características del sistema de producción y explotación que pueden contribuir con la infección; no se ha encontrado asociación entre el tipo de explotación (sistema de producción, tamaño, grado de tecnificación) que puedan contribuir con la presencia o heterogeneidad de los genotipos presentes (Keessen *et al.*, 2011d).

Adicionalmente el hallazgo y caracterización de *C. difficile* en animales de compañía supone una posible vía de contaminación para los humanos, así como la manipulación y

consumo de productos cárnicos infectados y el desarrollo exponencial de actividades de explotación no reguladas (Silva *et al.*, 2013a; Keessen *et al.*, 2011b; Dubberke *et al.*, 2011).

DIAGNÓSTICO DE *C. difficile* EN MEDICINA VETERINARIA

El diagnóstico en laboratorio de *C. difficile*, en animales, es complejo y algunas metodologías utilizadas son: ensayo citotoxicidad celular, ELISA para la detección de toxinas, cultivo, y PCR para la detección y diferenciación de cepas toxigénicas y no toxigénicas (Noren *et al.*, 2014; Merck Veterinary Manual, 2014). La validación de metodologías comerciales y la disponibilidad de información es escasa, lo que apoya la necesidad de investigación prospectiva para el diagnóstico rápido, costo-eficiente y oportuno de *C. difficile* a partir de muestras fecales de origen veterinario (Knight *et al.*, 2014).

CULTIVO

El cultivo de *C. difficile* requiere medios selectivos, mecanismos de enriquecimiento y condiciones de anaerobiosis (Gogate *et al.*, 2005), se ha descrito su recuperación en los medios CCFA (Cicloserina cefoxitina fructosa agar), AS-BA (Agar sangre post shock en alcohol) y TCCFB (Caldo cicloserina cefoxitina fructosa con taurocolato) al 0.1%, donde se ha encontrado que el enriquecimiento con taurocolato, puede mejorar las tasas de recuperación hasta en un 30% (Arroyo *et al.*, 2005). Sin embargo, el cultivo en el medio CCFA simple, es ampliamente utilizado.

INMUNOENSAYO

La detección de toxinas supone uno de los análisis de rutina para el diagnóstico de *C. difficile*. Para ello se utilizan kits comerciales que utilizan anticuerpos recombinantes que detectan selectivamente las toxinas A y B presentes en las muestras (Gogate *et al.*, 2005) y/o

la detección de alta sensibilidad y especificidad (91.1% y 91.2% respectivamente) de la enzima Glutamato Deshidrogenasa “*GDH*” (Arimoto *et al.*, 2016). El diagnóstico veterinario de *C. difficile*, utilizando metodologías basadas en inmunoensayos (ELISA o inmunocromatografía) para la detección de toxinas, debería ser revisado, ya que su baja sensibilidad 83.1% (75.1–91.2) y especificidad 31.5% (21.8–41.1), estarían asociadas a un diagnóstico erróneo, trayendo consigo implicaciones económicas negativas para el sector de interés y no debería ser utilizado para fines investigativos o epidemiológicos (Keessen *et al.*, 2011c).

BIOLOGÍA MOLECULAR: REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA (PCR)

En el estudio de *C. difficile*, el PCR ha permitido incorporar una gran variedad de datos epidemiológicos que sin duda proveen un impacto positivo para la industria porcina. Una de las mayores ventajas de esta técnica es que permite una detección rápida, sensible y específica para *C. difficile*, en este sentido y siguiendo la información disponible, se han desarrollado una serie de protocolos que permiten su estudio (Lemée *et al.*, 2004). Para la determinación de *C. difficile* en muestras fecales de origen porcino, se utilizan los genes: *tpi* (fragmento interno de la *isomerasa triosa fosfato*) o *cdd3* (fragmento del gen codificante por un sistema de transporte tipo ABC), que permite la identificación de especie (Álvarez-Pérez *et al.*, 2009a; Spigaglia y Mastrantonio, 2002); *TcdA*, porción repetida y no repetida del gen, codificante para la toxina A; *TcdB*, fragmento interno del gen de la toxina B; *TcdC*, regulador negativo del locus de patogenicidad (Knight *et al.*, 2015; Schneeberg *et al.*, 2013; Knight *et al.*, 2013; Persson *et al.*, 2011). Recientemente se ha incorporado la detección adicional de los genes correspondientes a CDT, así como secuencias del gen relacionado con la hipervirulencia (Wu *et al.*, 2016).

TÉCNICAS DE TIPIFICACIÓN Y GENÓMICA DE *C. difficile*

La tipificación en el estudio de *C. difficile*, es utilizada para la investigación epidemiológica de brotes, la clasificación y distribución de cepas a nivel regional; los diversos mecanismos descritos permiten a su vez ubicar y rastrear cepas, analizando a la vez sus interacciones y la posible relación y transmisión entre animales y humanos (Dingle y MacCannell, 2015). Existen diversas técnicas y metodologías para la genotipificación, en algunas de dichas metodologías, su reproducibilidad supone un problema relativo para su estandarización; así mismo, estas metodologías pueden utilizar enzimas digestivas, agentes de restricción, identificación de regiones específicas y conservadas de genoma, y patrones en bandas para su interpretación y clasificación (Dingle y MacCannell, 2015; Freeman *et al.*, 2010).

ANÁLISIS DE MULTILOCUS VNTR (MLVA)

VNTR son regiones cromosomales que poseen repeticiones de ADN en tándem y que ha sido aplicado en la investigación y caracterización de *C. difficile* (Marsh *et al.*, 2006) y otros patógenos (Wang *et al.*, 2016), por medio de la variación alélica. MLVA ha sido utilizado y optimizado para el estudio de relaciones genéticas entre aislamientos de *C. difficile* con un alto poder de discriminación (Marsh *et al.*, 2010). El uso de MLVA permite discriminar la relación o intra-variación entre clones de un mismo ribotipo, mejorando la capacidad de análisis en la cambiante epidemiología de *C. difficile* (van den Berg *et al.*, 2007). MLVA tiene la limitación de no poder establecer relaciones menos discriminantes como MLST, que es capaz de identificar linajes clonales (Rodríguez *et al.*, 2015).

ELECTROFORÉISIS EN GEL DE CAMPO PULSANTE (PFGE)

En Norteamérica se desarrolló el PFGE o pulsotipo, que permite la organización y clasificación genotípica basada en la separación electromagnética de material genómico previamente tratado con enzimas de restricción, posteriormente un patrón de bandas es analizado y comparado con bases de datos locales o internacionales para su caracterización (Janezic y Rupnik, 2010). Su poder de discriminación es amplio, facilitando su aplicación como herramienta de genotipificación y evitando la contaminación por material génico indeseable (Bidet *et al.*, 2000).

PFGE es actualmente utilizado como “prueba de oro” en la clasificación y genotipificación de patógenos en la industria alimenticia y diferentes patógenos de importancia clínica (Gilpin *et al.*, 2012; Carrico *et al.*, 2005; Davis *et al.*, 2003). PFGE ha sido comparado con otros métodos y técnicas de genotipificación, los resultados obtenidos demuestran su versatilidad y alta reproducibilidad, permitiéndoles ser utilizado en la descripción de brotes (Gebreyes y Adkins, 2015; Killgore *et al.*, 2008). La combinación de PFGE junto a otro método de genotipificación ha sido sugerido para poder aumentar su capacidad discriminante (Tenover *et al.*, 2011).

RIBOTIPIFICACIÓN

La ribotipificación explota la variabilidad de las regiones espaciadoras intergénicas (IS) entre las regiones 16S y 23S de ADN ribosómico cromosomal (ADNr), y que son tipo-dependientes (Bidet *et al.*, 2000); un ribotipo se define como un conjunto de cepas con un patrón de bandas idénticas, las cuales varían entre 200 y 700 bp; un solo cambio en el patrón definirá un nuevo ribotipo (Janezic y Rupnik, 2010). El uso de la ribotipificación es muy amplia y bien documentada en Europa; actualmente se han descrito alrededor de 400

ribotipos diferentes (Knetsch *et al.*, 2013). La versatilidad del método permite modificaciones que facilitan el procesamiento de las muestras, independientemente de su origen y que actualmente, posterior a su estandarización y validación, permiten comparaciones interlaboratoriales por medio de análisis consultas en una plataforma web internacional (Fawley *et al.*, 2015; Janezic *et al.*, 2011).

OTRAS TÉCNICAS DE TIPIFICACIÓN

La toxintipificación es una técnica basada en RFLP-PCR, que utiliza patrones de restricción en los genes *TcdA* y *TcdB*, para la clasificación de las cepas de *C. difficile* (Roberts y Mullany, 2010). Las toxinas A y B (*TcdA*, *TcdB*) se encuentran codificadas en la región cromosomal llamada locus de patogenicidad (PaLoc), las variaciones en esta región permiten una clasificación con importancia epidemiológica. Existen 34 toxintipos publicados en la actualidad y dichas variantes toxintípicas son deleciones mínimas o completas en la región codificante de *TcdA* y mutaciones puntuales en *TcdB*, las cuales dan origen a nuevos tipos de clasificación. Estas variaciones controlan la expresión de genes y la producción de toxinas A y B, pudiendo dichas cepas producir ambas, una o ninguna de las mismas (Rupnik y Janezic, 2015). En Australia se estudió la variabilidad de los toxintipos presentes en lechones, se reportaron tres toxintipos (VIII, XXX y XXXI) asociados independientemente a siete diferentes ribotipos (UK 017, 237, 280, 281, 291 y AU 13, 219), lo que demuestra la diversidad de *C. difficile* y la importancia de una correcta clasificación para su investigación (Elliott *et al.*, 2011).

La secuenciación del genoma completo, gracias a la introducción y modernización de los equipos y protocolos, provee una herramienta de amplio uso y de marcada aceptación para estudios epidemiológicos complejos (Dominguez *et al.*, 2015). Su poder de resolución

es indiscutiblemente mayor, ya que permite la diferenciación de cepas que por medio de las técnicas de genotipificación tradicionales no pueden ser detectadas (Knetsch *et al.*, 2013). WGS ha sido utilizado en el estudio de *C. difficile* para evaluar las vías de transmisión (Eyre *et al.*, 2013), los perfiles de resistencia o susceptibilidad a fármacos (Eyre *et al.*, 2014), su evolución y diversidad genómica, su distribución y comportamiento espacial (Eyre *et al.*, 2014; Eyre *et al.*, 2013; Köser *et al.*, 2012).

La tipificación de secuencia de multilocus (MLST), constituye una importante herramienta para el entendimiento de la genética de poblaciones de *C. difficile*. MLST se basa en la discriminación de variantes alélicas en seis o siete fragmentos del genoma, los cuales se encuentran, por lo general, bien conservados (Griffiths *et al.*, 2010). Así mismo esta técnica se ha desarrollado con el propósito de estudiar las relaciones clonales entre cepas y ha sido propuesto que la utilización de los genes asociados a virulencia en relación a los genes constitutivos pueden incrementar el poder de resolución de MLST y que permitiría analizar y cuantificar la variabilidad entre aislamientos (Lemée y Pons, 2010; Lemée *et al.*, 2005). Se ha señalado la falta de poder de resolución como limitante técnico, sin embargo, se establece que puede ser utilizada para la comprensión sobre aspectos globales y de la estructura de la población bacteriana; hasta la fecha se han descrito 349 perfiles para *C. difficile* (Rodríguez *et al.*, 2014; Marsh *et al.*, 2010; Jolley y Maiden, 2010).

RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS

El uso de cefalosporinas, clindamicina y fluoroquinolonas representa un factor de riesgo para infecciones por *C. difficile* en humanos; en porcinos los perfiles de susceptibilidad o resistencia a los antimicrobianos han sido, relativamente, poco estudiados, sin embargo,

penicilina, enrofloxacin, colistina, tetraciclina y trimetoprim-sulfonamida son comúnmente utilizados para una amplia gama de enfermedades de forma indiscriminada (Keessen *et al.*, 2013). Se ha reportado resistencia a ciprofloxacina, ertapenem, eritromicina y moxifloxacina en ciertos estudios con aislamientos de *C. difficile* ribotipos 078/NAP7 y 127; este último mostró mutaciones en el gen *gyrA* (Wu *et al.*, 2016; Pelaez *et al.*, 2013). La exposición y uso frecuente de antimicrobianos en sistemas de producción porcina convencional ha mostrado estar relacionado con la presencia y aislamiento de genotipos toxigénicos como el 078/NAP7, sin embargo, se encontró que las variaciones en el uso o exposición a antimicrobianos no tiene mayor relevancia en las frecuencias de aislamiento (Susick *et al.*, 2012).

BIBLIOGRAFÍA

- Aboutaleb, N., Kuijper, E., y van Dissel, J. (2014). Emerging infectious colitis. *Current Opinion in Gastroenterology*, 30(1), 106–115.
doi:10.1097/MOG.0000000000000030
- Álvarez-Pérez, S., Alba, P., Blanco, J., y Garcia, M. (2009a). Detection of toxigenic *Clostridium difficile* in pig feces by PCR. *Veterinarni Medicina*, 54(8), 360–366.
- Álvarez-Pérez, S., Blanco, J., Bouza, E., Alba, P., Gibert, X., Maldonado, J., y Garcia, M. (2009b). Prevalence of *Clostridium difficile* in diarrhoeic and non-diarrhoeic piglets. *Veterinary Microbiology*, 137(3-4), 302–305.
doi:10.1016/j.vetmic.2009.01.015
- Arimoto, J., Horita, N., Kato, S., Fuyuki, A., Higurashi, T., Ohkubo, H., . . . y Nakajima, A. (2016). Diagnostic test accuracy of glutamate dehydrogenase for *Clostridium difficile*: Systematic review and meta-analysis. *Nature. Scientific Reports*, 6(29754), 1–9. doi:10.1038/srep29754
- Arroyo, L., Rousseau, J., Willey, B., Low, D., Stämpfli, H., McGeer, A., y Weese, J. (2005). Use of a Selective Enrichment Broth To Recover *Clostridium difficile* from Stool Swabs Stored under Different Conditions. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(10), 5341–5343. doi:10.1128/JCM.43.10.5341-5343.2005
- Arruda, P. (2014). *Clostridium difficile* infection in neonatal piglets: Pathogenesis, risk factors, and prevention (Doctor of Philosophy Thesis). Iowa State University, Ames, Iowa, USA.
- Avbersek, J., Cotman, M., y Ocepek, M. (2011). Detection of *Clostridium difficile* in animals: comparison of real-time PCR assays with the culture method. *Journal of Medical Microbiology*. (60), 1119–1125. doi:10.1099/jmm.0.030304-0
- Bakri, M., Brown, D., Butcher, J., y Sutherland, A. (2009). *Clostridium difficile* in ready-to-eat salads, Scotland. *Emerging Infectious Diseases*, 15(5), 817–818.
doi:10.3201/eid1505.081186

- Bassetti, M., Villa, G., Pecori, D., Arzese, A., y Wilcox, M. (2012). Epidemiology, Diagnosis and Treatment of Clostridium Difficile Infection. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 10(12), 1405–1423.
- Bauer, M., Notermans, D., van Benthem, B., Brazier, J., Wilcox, M., Rupnik, M., . . . y Kuijper, E. (2011). Clostridium difficile infection in Europe: A hospital-based survey. *The Lancet*, 377(9759), 63–73. doi:10.1016/S0140-6736(10)61266-4
- Bidet, P., Lalande, V., Salauze, B., Burghoffer, B., Avesani, V., Delmée, M., . . . y Petit, J. (2000). Comparison of PCR-Ribotyping, Arbitrarily Primed PCR, and Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Typing Clostridium difficile. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(7), 2484–2487.
- Blanco, J., Álvarez-Pérez, S., y Garcia, M. (2013). Is the prevalence of Clostridium difficile in animals underestimated? *The Veterinary Journal*, 197(3), 694–698. doi:10.1016/j.tvjl.2013.03.053
- Burke, K. y Lamont, J. (2014). Clostridium difficile infection: a worldwide disease. *Gut and Liver*, 8(1), 1–6. doi:10.5009/gnl.2014.8.1.1
- Carrico, J., Pinto, F., Simas, C., Nunes, S., Sousa, N., Frazao, N., . . . y Almeida, J. (2005). Assessment of band-based similarity coefficients for automatic type and subtype classification of microbial isolates analyzed by pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(11), 5483–5490. doi:10.1128/JCM.43.11.5483-5490.2005
- Carroll, K. y Bartlett, J. (2011). Biology of Clostridium difficile: Implications for Epidemiology and Diagnosis. *Annual Review of Microbiology*, 65(1), 501–521. doi:10.1146/annurev-micro-090110-102824
- Carter, G., Rood, J., y Lyras, D. (2012). The role of toxin A and toxin B in the virulence of Clostridium difficile. *Trends in Microbiology*, 20(1), 21–29. doi:10.1016/j.tim.2011.11.003
- Caugant, D. (Ed.). (2009). *Methods in Molecular Biology: Vol. 551. Molecular Epidemiology of Microorganisms*. New York: Springer.

- Changyun, X. (2015). Prevalence and fate of *Clostridium difficile* during sewage treatment, land application and composting (Doctor of Philosophy Thesis). The University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada.
- Chen, C., Yan, X., y Jackson, C. (Eds.). (2015). Antimicrobial resistance and food safety: Methods and techniques. Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo: Academic Press.
- Clements, A., Soares-Magalhães, R., Tatem, A., Paterson, D., y Riley, T. (2010). *Clostridium difficile* PCR ribotype 027: assessing the risks of further worldwide spread. *Lancet Infectious Diseases*, 10, 395–404.
- Davis, M., Hancock, D., Besser, T., y Call, D. (2003). Evaluation of Pulsed-Field Gel Electrophoresis as a Tool for Determining the Degree of Genetic Relatedness between Strains of *Escherichia coli* O157: H7. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(5), 1843–1849. doi:10.1128/JCM.41.5.1843-1849.2003
- Delmée, M., van Broeck, J., Simon, A., Janssens, M., y Avesani, V. (2005). Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea: a plea for culture. *Journal of Medical Microbiology*, 54(2), 187–191. doi:10.1099/jmm.0.45844-0
- Di Bella, S., Ascenzi, P., Siarakas, S., Petrosillo, N., y Di Masi, A. (2016). *Clostridium difficile* Toxins A and B: Insights into Pathogenic Properties and Extraintestinal Effects. *Toxins*, 8(5). doi:10.3390/toxins8050134
- Dingle, T. y MacCannell, D. (2015). Molecular Strain Typing and Characterisation of Toxigenic *Clostridium difficile*. In A. Sails & Y. Tang (Eds.), *Methods in Microbiology. Current and Emerging Technologies for the Diagnosis of Microbial Infections* (Vol. 42, pp. 329–357). Academic Press. 9780128032978.
- Dominguez, S., Anderson, L., Kotter, C., Littlehorn, C., Arms, L., Dowell, E., . . . y Frank, D. (2015). Comparison of Whole-Genome Sequencing and Molecular-Epidemiological Techniques for *Clostridium difficile* Strain Typing. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*, piv020. doi:10.1093/jpids/piv020

- Dubberke, E., Haslam, D., Lanzas, C., Bobo, L., Burnham, C., Gröhn, Y., y Tarr, P. (2011). The Ecology and Pathobiology of *Clostridium difficile* Infections: An Interdisciplinary Challenge. *Zoonoses and Public Health*, 58(1), 4–20. doi:10.1111/j.1863-2378.2010.01352.x
- Elliott, B., Squire, M., Thean, S., Chang, B., Brazier, J., Rupnik, M., y Riley, T. (2011). New types of toxin A-negative, toxin B-positive strains among clinical isolates of *Clostridium difficile* in Australia. *Journal of Medical Microbiology*, 60(Pt 8), 1108–1111. doi:10.1099/jmm.0.031062-0
- Eyre, D., Babakhani, F., Griffiths, D., Seddon, J., Del Ojo, C., Gorbach, S., . . . y Walker, A. (2014). Whole-genome sequencing demonstrates that fidaxomicin is superior to vancomycin for preventing reinfection and relapse of infection with *Clostridium difficile*. *The Journal of Infectious Diseases*, 209(9), 1446–1451. doi:10.1093/infdis/jit598
- Eyre, D., Cule, M., Wilson, D., Griffiths, D., Vaughan, A., O'Connor, L., . . . y Walker, A. (2013). Diverse sources of *C. difficile* infection identified on whole-genome sequencing. *The New England Journal of Medicine*, 369(13), 1195–1205. doi:10.1056/NEJMoa1216064
- Fawley, W., Knetsch, C., MacCannell, D., Harmanus, C., Du, T., Mulvey, M., . . . y Wilcox, M. (2015). Development and validation of an internationally-standardized, high-resolution capillary gel-based electrophoresis PCR-ribotyping protocol for *Clostridium difficile*. *PLoS ONE*, 10(2), e0118150. doi:10.1371/journal.pone.0118150
- Freeman, J., Bauer, M., Baines, S., Corver, J., Fawley, W., Goorhuis, B., . . . y Wilcox, M. (2010). The Changing Epidemiology of *Clostridium difficile* Infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(3), 529–549. doi:10.1128/CMR.00082-09
- Gebreyes, W. y Adkins, P. (2015). The use of pulsed-field gel electrophoresis for genotyping of *Clostridium difficile*. *Methods in Molecular Biology*, 1301, 95–101. doi:10.1007/978-1-4939-2599-5_9

- Gerding, D., Johnson, S., Rupnik, M., y Aktories, K. (2014). Clostridium difficile binary toxin CDT: mechanism, epidemiology, and potential clinical importance. *Gut Microbes*, 5(1), 15–27. doi:10.4161/gmic.26854
- Gilpin, B., Robson, B., Lin, S., Scholes, P., y On, S. (2012). Pulsed-field gel electrophoresis analysis of more than one clinical isolate of Campylobacter spp. from each of 49 patients in New Zealand. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(2), 457–459. doi:10.1128/JCM.05928-11
- Gogate, A., De, A., Nanivadekar, R., Mathur, M., Saraswathi, K., Jog, A., y Kulkarni, M. (2005). Diagnostic role of stool culture & toxin detection in antibiotic associated diarrhoea due to Clostridium difficile in children. *Indian Journal of Medicine Research*. (122).
- Goorhuis, A., Bakker, D., Corver, J., Debast, S., Harmanus, C., Notermans, D., . . . y Kuijper, E. (2008). Emergence of Clostridium difficile Infection Due to a New Hypervirulent Strain, Polymerase Chain Reaction Ribotype 078. *Clinical Infectious Diseases*, 47(9), 1162–1170. doi:10.1086/592257
- Gould, L. y Limbago, B. (2010). Clostridium difficile in Food and Domestic Animals: A New Foodborne Pathogen? *Clinical Infectious Diseases*, 51(5), 577–582. doi:10.1086/655692
- Griffiths, D., Fawley, W., Kachrimanidou, M., Bowden, R., Crook, D., Fung, R., . . . y Dingle, K. (2010). Multilocus sequence typing of Clostridium difficile. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(3), 770–778. doi:10.1128/JCM.01796-09
- Harvey, R., Norman, K., Andrews, K., Norby, B., Hume, M., Scanlan, C., . . . y Scott, H. (2011). Clostridium difficile in retail meat and processing plants in Texas. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23(4), 807–811. doi:10.1177/1040638711407893
- Hopman, N., Keessen, E., Harmanus, C., Sanders, I., van Leengoed, L., Kuijper, E., y Lipman, L. (2011). Acquisition of Clostridium difficile by piglets. *Veterinary Microbiology*, 149(1-2), 186–192. doi:10.1016/j.vetmic.2010.10.013

- Houser, B., Soehnen, M., Wolfgang, D., Lyszczek, H., Burns, C., y Jayarao, B. (2012). Prevalence of *Clostridium difficile* toxin genes in the feces of veal calves and incidence of ground veal contamination. *Foodborne Pathogens and Disease*, 9(1), 32–36. doi:10.1089/fpd.2011.0955
- Hutton, M., Mackin, K., Chakravorty, A., y Lyras, D. (2014). Small animal models for the study of *Clostridium difficile* disease pathogenesis. *FEMS Microbiology Letters*, 352(2), 140–149. doi:10.1111/1574-6968.12367
- Janezic, S., y Rupnik, M. (Eds.). (2010). *Molecular Typing Methods for Clostridium difficile: Pulsed-Field Gel Electrophoresis and PCR Ribotyping* (Vol. 646).
- Janezic, S., Strumbelj, I., y Rupnik, M. (2011). Use of Modified PCR Ribotyping for Direct Detection of *Clostridium difficile* Ribotypes in Stool Samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(8), 3024–3025. doi:10.1128/JCM.01013-11
- Janezic, S., Zidaric, V., Pardon, B., Indra, A., Kokotovic, B., Blanco, J., . . . y Rupnik, M. (2014a). International *Clostridium difficile* animal strain collection and large diversity of animal associated strains. *BMC Microbiology*, 14(1), 173. doi:10.1186/1471-2180-14-173
- Janezic, S., Zidaric, V., Pardon, B., Indra, A., Kokotovic, B., Blanco, J., . . . y Rupnik, M. (2014b). International *Clostridium difficile* animal strain collection and large diversity of animal associated strains. *BMC Microbiology*, 14, 173. doi:10.1186/1471-2180-14-173
- Janoir, C. (2015). Virulence factors of *Clostridium difficile* and their role during infection. *Anaerobe*, 37(2015), 13–24. doi:10.1016/j.anaerobe.2015.10.009
- Jolley, K. y Maiden, M. (2010). BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. *BMC Bioinformatics*, 11(1), 1. doi:10.1186/1471-2105-11-595
- Keessen, E., Donswijk, C., Hol, S., Hermanus, C., Kuijper, E., y Lipman, L. (2011a). Aerial dissemination of *Clostridium difficile* on a pig farm and its environment. *Environmental Research*, 111(8), 1027–1032. doi:10.1016/j.envres.2011.09.014

- Keessen, E., Gaastra, W., y Lipman, L. (2011b). Clostridium difficile infection in humans and animals, differences and similarities. *Veterinary Microbiology*, 153(3-4), 205–217. doi:10.1016/j.vetmic.2011.03.020
- Keessen, E., Hengsgens, M., Spigaglia, P., Barbanti, F., Sanders, I., Kuijper, E., y Lipman, L. (2013). Antimicrobial susceptibility profiles of human and piglet Clostridium difficile PCR-ribotype 078. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 2, 14. doi:10.1186/2047-2994-2-14
- Keessen, E., Hopman, N., van Leengoed, L., van Asten, A., Hermanus, C., Kuijper, E., y Lipman, L. (2011c). Evaluation of Four Different Diagnostic Tests To Detect Clostridium difficile in Piglets. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(5), 1816–1821. doi:10.1128/JCM.00242-11
- Keessen, E., van den Berkt, A., Haasjes, N., Hermanus, C., Kuijper, E., y Lipman, L. (2011d). The relation between farm specific factors and prevalence of Clostridium difficile in slaughter pigs. *Veterinary Microbiology*, 154(1-2), 130–134. doi:10.1016/j.vetmic.2011.06.032
- Killgore, G., Thompson, A., Johnson, S., Brazier, J., Kuijper, E., Pepin, J., . . . y McDonald, L. (2008). Comparison of seven techniques for typing international epidemic strains of Clostridium difficile: restriction endonuclease analysis, pulsed-field gel electrophoresis, PCR-ribotyping, multilocus sequence typing, multilocus variable-number tandem-repeat analysis, amplified fragment length polymorphism, and surface layer protein A gene sequence typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(2), 431–437. doi:10.1128/JCM.01484-07
- Knetsch, C., Lawley, T., Hengsgens, M., Corver, J., Wilcox, M., y Kuijper, E. (2013). Current application and future perspectives of molecular typing methods to study Clostridium difficile infections. *Euro Surveil*, 18(4).
- Knight, D., Squire, M., y Riley, T. (2015). Nationwide Surveillance Study of Clostridium difficile in Australian Neonatal Pigs Shows High Prevalence and Heterogeneity of PCR Ribotypes. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(1).

- Knight, D., Squire, M., y Riley, T. (2014). Laboratory detection of *Clostridium difficile* in piglets in Australia. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(11), 3856–3862. doi:10.1128/JCM.01225-14
- Knight, D., Thean, S., Putsathit, P., Fenwick, S., y Riley, T. (2013). Cross-Sectional Study Reveals High Prevalence of *Clostridium difficile* Non-PCR Ribotype 078 Strains in Australian Veal Calves at Slaughter. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(8), 2630–2635. doi:10.1128/AEM.03951-12
- Kongsted, H., Jonach, B., Haugegaard, S., Angen, Ø., Jorsal, S., Kokotovic, B., . . . y Nielsen, J. (2013). Microbiological, pathological and histological findings in four Danish pig herds affected by a new neonatal diarrhoea syndrome. *BMC Veterinary Research*, 9(1), 206. doi:10.1186/1746-6148-9-206
- Köser, C., Ellington, M., Cartwright, E., Gillespie, S., Brown, N., Farrington, M., . . . y Peacock, S. (2012). Routine use of microbial whole genome sequencing in diagnostic and public health microbiology. *PLoS Pathogens*, 8(8), e1002824. doi:10.1371/journal.ppat.1002824
- Kuijper, E., van den Berg, R., y Brazier, J. (2009). Comparison of molecular typing methods applied to *Clostridium difficile*. In D. Caugant (Ed.), *Methods in Molecular Biology: Vol. 551. Molecular Epidemiology of Microorganisms* (Vol. 551, pp. 159–171). New York: Springer.
- Lemée, L., Bourgeois, I., Ruffin, E., Collignon, A., Lemeland, J., y Pons, J. (2005). Multilocus sequence analysis and comparative evolution of virulence-associated genes and housekeeping genes of *Clostridium difficile*. *Microbiology*, 151(Pt 10), 3171–3180. doi:10.1099/mic.0.28155-0
- Lemée, L., Dhalluin, A., Testelin, S., Mattrat, M., Maillard, K., Lemeland, J., y Pons, J. (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(12), 5710–5714. doi:10.1128/JCM.42.12.5710-5714.2004

- Lemée, L. y Pons, J. (2010). Multilocus Sequence Typing for *Clostridium difficile*:
Clostridium difficile: Methods and Protocols. In A. Roberts & P. Mullany (Eds.),
Clostridium difficile. Methods and protocols (pp. 77–90). Totowa, NJ: Humana
Press (978-1-60327-365-7). Retrieved from http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60327-365-7_6
- Liu, W., Feng, Y., Shang, X., y Zheng, Y. (2011). Rho GTPases in hematopoietic
stem/progenitor cell migration (Vol. 750).
- Marsh, J. y Harrison, L. (2015). Chapter 10: *Clostridium difficile*: A Food Safety Concern?
In C. Chen, X. Yan, & C. Jackson (Eds.), *Antimicrobial resistance and food safety*.
Methods and techniques (pp. 181–206). Amsterdam, Boston, Heidelberg, London,
New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo:
Academic Press (0128012145).
- Marsh, J., O'Leary, M., Shutt, K., Pasculle, A., Johnson, S., Gerding, D., . . . y Harrison, L.
(2006). Multilocus variable-number tandem-repeat analysis for investigation of
Clostridium difficile transmission in Hospitals. *Journal of Clinical Microbiology*,
44(7), 2558–2566. doi:10.1128/JCM.02364-05
- Marsh, J., O'Leary, M., Shutt, K., Sambol, S., Johnson, S., Gerding, D., y Harrison, L.
(2010). Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis and Multilocus
Sequence Typing Reveal Genetic Relationships among *Clostridium difficile* Isolates
Genotyped by Restriction Endonuclease Analysis. *Journal of Clinical Microbiology*,
48(2), 412–418. doi:10.1128/JCM.01315-09
- Martin, J., Monaghan, T., y Wilcox, M. (2016). *Clostridium difficile* infection:
epidemiology, diagnosis and understanding transmission. *Nature Reviews*.
Gastroenterology & Hepatology, 13(4), 206–216. doi:10.1038/nrgastro.2016.25
- Merck Veterinary Manual. (2014). *Clostridium difficile* and *C. perfringens* Infection.
Retrieved from
[http://www.merckvetmanual.com/mvm/generalized_conditions/clostridial_diseases/
clostridium_difficile_and_c_perfringens_infection.html](http://www.merckvetmanual.com/mvm/generalized_conditions/clostridial_diseases/clostridium_difficile_and_c_perfringens_infection.html)

- Metcalf, D., Avery, B., Janecko, N., Matic, N., Reid-Smith, R., y Weese, J. (2011). Clostridium difficile in seafood and fish. *Anaerobe*, 17(2011), 85–86. doi:10.1016/j.anaerobe.2011.02.008
- Moono, P., Putsathit, P., Knight, D., Squire, M., Hampson, D., Foster, F., y Riley, T. (2016). Persistence of Clostridium difficile RT 237 infection in a Western Australian piggery. *Anaerobe*, 37(2016), 62–66. doi:10.1016/j.anaerobe.2015.11.012
- Noren, T., Johansson, K., y Unemo, M. (2014). Clostridium difficile PCR ribotype 046 is common among neonatal pigs and humans in Sweden. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(1), O2-6. doi:10.1111/1469-0691.12296
- Paredes-Sabja, D., Shen, A., y Sorg, J. (2014). Clostridium difficile spore biology: sporulation, germination, and spore structural proteins. *Trends in Microbiology*, 22(7), 406–416. doi:10.1016/j.tim.2014.04.003
- Pelaez, T., Alcalá, L., Blanco, J., Álvarez-Pérez, S., Marin, M., Martín-López, A., . . . y Bouza, E. (2013). Characterization of swine isolates of Clostridium difficile in Spain: a potential source of epidemic multidrug resistant strains? *Anaerobe*, 22(2013), 45–49. doi:10.1016/j.anaerobe.2013.05.009
- Persson, S., Jensen, J., y Olsen, K. (2011). Multiplex PCR Method for Detection of Clostridium difficile tcdA, tcdB, cdtA, and cdtB and Internal In-Frame Deletion of tcdC. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(12), 4299–4300. doi:10.1128/JCM.05161-11
- Quesada-Gómez, C., López-Ureña, D., Acuna-Amador, L., Villalobos-Zuniga, M., Du, T., Freire, R., . . . y Chaves-Olarte, E. (2015). Emergence of an outbreak-associated Clostridium difficile variant with increased virulence. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(4), 1216–1226. doi:10.1128/JCM.03058-14
- Quesada-Gómez, C., Mulvey, M., Vargas, P., Gamboa-Coronado, M., Rodríguez, C., y Rodríguez-Cavallini, E. (2013). Isolation of a Toxigenic and Clinical Genotype of Clostridium difficile in Retail Meats in Costa Rica. *Journal of Food Protection*, 76(2), 348–351.

- Quesada-Gómez, C., Rodríguez, C., Gamboa-Coronado, M., Rodríguez-Cavallini, E., Du, T., Mulvey, M., . . . y Boza-Cordero, R. (2010). Emergence of *Clostridium difficile* NAP1 in Latin America. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(2), 669–670. doi:10.1128/JCM.02196-09
- Quesada-Gómez, C., Vargas, P., López-Ureña, D., Gamboa-Coronado, M., y Rodríguez-Cavallini, E. (2012). Community-acquired *Clostridium difficile* NAP1/027-associated diarrhea in an eighteen month old child. *Anaerobe*, 18(6), 581–583. doi:10.1016/j.anaerobe.2012.10.002
- Roberts, A., y Mullany, P. (Eds.). (2010). *Clostridium difficile: Methods and protocols (First)*. Totowa, NJ: Humana Press.
- Roberts, A., y Mullany, P. (Eds.). (2010). *Methods in Molecular Biology: Vol. 646. Clostridium difficile: Methods and protocols (First)*. New York, London: Humana Press.
- Rodriguez, C., Avesani, V., Taminiau, B., van Broeck, J., Brévers, B., Delmée, M., y Daube, G. (2015). Investigation of *Clostridium difficile* interspecies relatedness using multilocus sequence typing, multilocus variable-number tandem-repeat analysis and antimicrobial susceptibility testing. *Veterinary Journal*, 206(3), 349–355. doi:10.1016/j.tvjl.2015.09.001
- Rodriguez, C., Taminiau, B., Avesani, V., van Broeck, J., Delmée, M., y Daube, G. (2014). Multilocus sequence typing analysis and antibiotic resistance of *Clostridium difficile* strains isolated from retail meat and humans in Belgium. *Food Microbiology*, 42, 166–171. doi:10.1016/j.fm.2014.03.021
- Rodriguez, C., Taminiau, B., van Broeck, J., Avesani, V., Delmée, M., y Daube, G. (2012). *Clostridium difficile* in young farm animals and slaughter animals in Belgium. *Anaerobe*, 18(2012), 621–625. doi:10.1016/j.anaerobe.2012.09.008
- Rodriguez-Palacios, A., Borgmann, S., Kline, T., y LeJeune, J. (2013). *Clostridium difficile* in foods and animals: history and measures to reduce exposure. *Animal Health Research Reviews*, 14(1), 11–29. doi:10.1017/S1466252312000229

- Rupnik, M. y Janezic, S. (2015). An update on *Clostridium difficile* toxinotyping. *Journal of Clinical Microbiology*. doi:10.1128/JCM.02083-15
- Sabat, A., Budimir, A., Nashev, D., Sá-Leao, R., van Dijil, J., Laurent, F., . . . y Friedrich, A. (2013). Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Euro Surveil*, 18(4). Retrieved from <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20380>
- Sachse, K. y Moebius, P. (2009). Molecular typing tools: from pattern recognition to genome-based algorithms. In D. Caugant (Ed.), *Methods in Molecular Biology: Vol. 551. Molecular Epidemiology of Microorganisms* (Vol. 1247, pp. 287–310). New York: Springer.
- Sails, A., y Tang, Y. (Eds.). (2015). *Methods in Microbiology. Current and Emerging Technologies for the Diagnosis of Microbial Infections (First)*: Academic Press.
- Schneeberg, A., Neubauer, H., Schmoock, G., Baier, S., Harlizius, J., Nienhoff, H., . . . y Seyboldt, C. (2013). *Clostridium difficile* genotypes in piglet populations in Germany. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(11), 3796–3803. doi:10.1128/JCM.01440-13
- Schneeberg, A., Rupnik, M., Neubauer, H., y Seyboldt, C. (2012). Prevalence and distribution of *Clostridium difficile* PCR ribotypes in cats and dogs from animal shelters in Thuringia, Germany. *Anaerobe*, 18(2012), 484–488. doi:10.1016/j.anaerobe.2012.08.002
- Silva, R., Carvalho-Guedes, R., y Faria, F. (2013a). *Clostridium difficile* infection: main features and occurrence in domestic species in Brazil. *Ciência Rural*, 43(I), 73–80.
- Silva, R., Lara-Resende, R., Pires, P., Pereira, L., Pereira, S., Duarte, M., . . . y Lobato, F. (2013b). Detection of toxins A/B and isolation of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* from dogs in Minas Gerais, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(1), 133–137. doi:10.1590/S1517-83822013005000008
- Smits, W. (2013). Hype or hypervirulence: a reflection on problematic *C. difficile* strains. *Virulence*, 4(7), 592–596. doi:10.4161/viru.26297

- Smits, W., Lyras, D., Lacy, D., Wilcox, M., y Kuijper, E. (2016). Clostridium difficile infection. Nature Reviews. Disease Primers, 2, 16020. doi:10.1038/nrdp.2016.20
- Songer, J. (2010). Clostridia as agents of zoonotic disease. Veterinary Microbiology, 140(3-4), 399–404. doi:10.1016/j.vetmic.2009.07.003
- Songer, J., Post, K., Larson, D., Jost, H., y Glock, R. (2000). Infection of neonatal swine with Clostridium difficile. Swine Health and Production, 8(4), 185–189.
- Songer, J. y Uzal, F. (2005). Clostridial Enteric Infections in Pigs. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 17(6), 528–536. doi:10.1177/104063870501700602
- Spigaglia, P. y Mastrantonio, P. (2002). Molecular Analysis of the Pathogenicity Locus and Polymorphism in the Putative Negative Regulator of Toxin Production (TcdC) among Clostridium difficile Clinical Isolates. Journal of Clinical Microbiology, 40(9), 3470–3475. doi:10.1128/JCM.40.9.3470-3475.2002
- Steele, J., Feng, H., Parry, N., y Tzipori, S. (2010). Piglet Models of Acute or Chronic Clostridium difficile Illness. The Journal of Infectious Diseases, 201(3), 428–434. doi:10.1086/649799
- Susick, E., Putnam, M., Bermudez, D., y Thakur, S. (2012). Longitudinal study comparing the dynamics of Clostridium difficile in conventional and antimicrobial free pigs at farm and slaughter. Veterinary Microbiology, 157, 172–178. doi:10.1016/j.vetmic.2011.12.017
- Tenover, F., Akerlund, T., Gerding, D., Goering, R., Boström, T., Jonsson, A., . . . y Persing, D. (2011). Comparison of strain typing results for Clostridium difficile isolates from North America. Journal of Clinical Microbiology, 49(5), 1831–1837. doi:10.1128/JCM.02446-10
- van den Berg, R., Schaap, I., Templeton, K., Klaassen, C., y Kuijper, E. (2007). Typing and subtyping of Clostridium difficile isolates by using multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis. Journal of Clinical Microbiology, 45(3), 1024–1028. doi:10.1128/JCM.02023-06

- Wang, H., Diao, B., Cui, Z., Yan, M., y Kan, B. (2016). Genotyping of Salmonella Typhi using 8-loci multi locus VNTR analysis. *Gut pathogens*, 8, 14. doi:10.1186/s13099-016-0094-4
- Weese, J., Finley, R., Reid-Smith, R., Janecko, N., y Rousseau, J. (2010a). Evaluation of Clostridium difficile in dogs and the household environment. *Epidemiology and Infection*, 138(8), 1100–1104. doi:10.1017/S0950268809991312
- Weese, J., Wakeford, T., Reid-Smith, R., Rousseau, J., y Friendship, R. (2010b). Longitudinal investigation of Clostridium difficile shedding in piglets. *Anaerobe*, 16(2010), 501–504. doi:10.1016/j.anaerobe.2010.08.001
- Wu, Y., Lee, J., Tsai, B., Liu, Y., Chen, C., Tien, N.,. . . y Chen, T. (2016). Potentially hypervirulent Clostridium difficile PCR ribotype 078 lineage isolates in pigs and possible implications for humans in Taiwan. *International Journal of Medical Microbiology*, 306(2), 115–122. doi:10.1016/j.ijmm.2016.02.002
- Zidaric, V., Beigot, S., Lapajne, S., y Rupnik, M. (2010). The occurrence and high diversity of Clostridium difficile genotypes in rivers. *Anaerobe*, 16(2010), 371–375. doi:10.1016/j.anaerobe.2010.06.001

CAPÍTULO I

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLAMIENTOS DE *Clostridium difficile*: LECHONES EN SISTEMAS DE PRODUCCIÓN PÚBLICA Y PRIVADA EN CUATRO GRANJAS DE COSTA RICA.

RESUMEN

Clostridium difficile es un enteropatógeno con amplia distribución geográfica e importancia a nivel clínico; su virulencia y resistencia a los antimicrobianos son actual objeto de estudio a nivel internacional. En animales, *C. difficile* puede causar diarrea y lesiones a nivel de tracto gastrointestinal en diversas especies domésticas. En cerdos, los principalmente afectados son los lechones, cuyas tasas de colonización y su aparente predisposición fisiológica les convierten en posibles reservorios, causando en algunos casos diarrea y lesiones patogénicas severas. Ciertos genotipos de *C. difficile* ha sido detectados y descritos indistintamente en animales y humanos. En Costa Rica, *C. difficile* ha sido reportado como causante de brotes hospitalarios, comunitarios y se ha detectado en productos cárnicos de consumo. Se analizaron veinte (20) aislamientos, obtenidos a partir de muestreos en cuatro fincas de producción públicas y privadas. Se detectaron tres genotipos: RT078/NAP7 (20%), RTFLI-CR₁/SmaI 1148 “RT014/5” (30%) y RT596 (50%), siendo A⁺B⁺CDT⁺, A⁺B⁺CDT⁻ y A⁻B⁻CDT⁻, respectivamente. Adicionalmente se detectaron diez perfiles MLVA y tres grupos clonales correspondientes con los genotipos detectados, con los cuales se construyó un árbol de expansión mínima (MST) que mostró que los aislamientos analizados poseen intravariabilidad mínima y conservada dentro de los grupos clonales resultantes (SLV ≤ 2 y < 10). Se concluye que *C. difficile* se encuentra presente en lechones de Costa Rica, colonizando el tejido gastrointestinal de los mismos. De los genotipos encontrados,

RT078/NAP7 ha sido previamente detectado en un caso clínico humano; FLI-CR₁/SmaI 1148 (RT014/5), probablemente pertenece al mismo linaje de RT014/NAP4, detectado en aislamientos previamente caracterizados. Ambos, RT078/NAP7 y RT014/NAP4, son de alta importancia epidemiológica en Europa y América, y han sido detectados a nivel hospitalario nacional; por lo tanto, podrían ser elementos de riesgo considerable en la evolución y dinámica de *C. difficile* a nivel comunitario en el país.

PALABRAS CLAVE:

Lechones Costa Rica, *Clostridium difficile*, PFGE, PCR-Ribotyping, MLVA

ABSTRACT

Clostridium difficile is an enteropathogen with a wide geographical distribution and importance at the clinical level. Its virulence and resistance to antimicrobials are currently under international study. In animals, *C. difficile* can cause diarrhea and lesions at the level of the gastrointestinal tract in various domestic species. In pigs, piglets are mainly affected, whose colonization rates and their apparent physiological predisposition make them possible reservoirs, causing in some cases diarrhea and severe pathogenic lesions. Certain *C. difficile* genotypes have been described indistinctly in animals and humans. In Costa Rica, *C. difficile* has been reported to cause hospital and community outbreaks and has been detected in consumer meat products. Twenty isolates, obtained from piglet in four public and private production farms, were analyzed. Three genotypes were detected: RT078/NAP7 (20%), RTFLI-CR₁/SmaI 1148 "RT014/5" (30%) and RT596 (50%), being A⁺B⁺CDT⁺, A⁺B⁺CDT⁻ and A⁻B⁻CDT⁻, respectively. In addition, ten MLVA profiles and three corresponding clonal groups were detected among the present genotypes; a minimal expansion tree (MST) was

constructed, which showed that the analyzed isolates had minimal intravariability and were conserved within the resulting clonal groups (SLV ≤ 2 and < 10). It is concluded that *C. difficile* is present in piglets from Costa Rica, colonizing the gastrointestinal tissue of the same. From the genotypes found, RT078/NAP7 has been previously detected in a human clinical case; FLI-CR₁/SmaI 1148 (RT014/5), probably belongs to the same lineage of RT014/NAP4, detected in previously characterized isolates. Both, RT078/NAP7 and RT014/NAP4, are of high epidemiological importance in Europe and America, and have been detected at the national hospital level; therefore, they could be elements of considerable risk in the evolution and dynamics of *C. difficile* at the community in the country.

KEYWORDS:

Costa Rica Piglets, *Clostridium difficile*, PFGE, PCR-Ribotyping, MLVA

1. INTRODUCCIÓN

Clostridium difficile es un enteropatógeno con amplia distribución geográfica e importancia a nivel clínico, causando colitis pseudomembranosa en los pacientes humanos, entre otras complicaciones; su virulencia y resistencia a los antimicrobianos son actual objeto de estudio a nivel internacional (Aguayo *et al.*, 2015). En animales, *C. difficile* puede causar diarrea y lesiones a nivel de tracto gastrointestinal en diversas especies domésticas (Uzal *et al.*, 2016). En cerdos, los principalmente afectados son los lechones, cuyas tasas de colonización y su aparente predisposición fisiológica les convierten en posibles reservorios de *C. difficile* (Keel y Songer, 2007; Songer *et al.*, 2000), causando en algunos casos diarrea y lesiones patogénicas severas (Keel y Songer, 2011; Songer y Uzal, 2005).

C. difficile, ha sido propuesto como un posible agente zoonótico (Songer, 2010), sin embargo, sus mecanismos, rutas e implicación, son objeto de debate entre expertos, ya que a pesar de encontrarse similitudes entre las características de los aislamientos procedentes de humanos y animales (Knetsch *et al.*, 2015; Bauer y Kuijper, 2015; Hengsgens *et al.*, 2012; Bakker *et al.*, 2010), su relación definitiva no ha podido ser demostrada (Rodríguez *et al.*, 2016). Recientemente, se ha demostrado que la similitud genética entre aislamientos es prácticamente indistinta entre poblaciones, sean estas humanas o animales, lo que representa un importante elemento de análisis en la dinámica de investigación, prevención y control de la infección o enfermedad (Knight *et al.*, 2016).

C. difficile, ha sido estudiado en poblaciones animales: domésticas, productivas y salvajes; los genotipos encontrados son diversos y en algunos casos, los mismos han sido reportados en humanos (Janezic *et al.*, 2014a). Los principales genotipos, responsables de brotes y casos comunitarios en humanos, han sido tradicionalmente RT027/NAP1 (Valiente

et al., 2014; Burke y Lamont, 2014), RT014/020/NAP4 (Janezic *et al.*, 2012) y 078/NAP7 (Aboutaleb *et al.*, 2014; Goorhuis *et al.*, 2008), sin embargo, múltiples genotipos, incluyendo los anteriormente mencionados, han sido reportados con presencia tanto en humanos como en animales (Rodríguez *et al.*, 2016; Hengsgens *et al.*, 2012).

En Costa Rica, *C. difficile* ha sido reportado como un patógeno de marcada importancia: a nivel hospitalario (nosocomial), el genotipo NAP1/RT027 (Quesada-Gómez *et al.*, 2010); comunitario, el genotipo NAP1/RT027 (Quesada-Gómez *et al.*, 2012) y en productos cárnicos de consumo, el genotipo RT029 (Quesada-Gómez *et al.*, 2013). Considerando el entorno internacional, nacional y sus hallazgos, la detección y caracterización genotípica de *C. difficile* a partir de lechones de 2 a 15 días de edad, que es cuando son más susceptibles a la colonización (Weese *et al.*, 2010), en granjas de producción porcina en Costa Rica es necesaria para realizar una comparación filogénica con los aislamientos previamente descritos en humanos de Costa Rica en busca de coincidencias que enriquecerían la eco-epidemiología nacional.

La industria porcina constituye un importante elemento en la economía nacional e internacional; en Costa Rica, durante el 2011, se procesaron más de 300,000 cabezas. Las autoridades nacionales reportan una población promedio de aproximadamente 350,000 porcinos. Los costos por enfermedad asociada a *C. difficile* y sus posibles implicaciones e impacto en el mercado nacional son desconocidos. (Senasa, Costa Rica, 2012; MAG-CR, 2012; Programa Nacional de Cerdos de Costa Rica, 2007) A nuestro conocimiento, ningún reporte ha sido establecido en la región de México y Centroamérica hasta la fecha (Smits *et al.*, 2016).

2. METODOLOGÍA

2.1 DISEÑO DE ESTUDIO Y MUESTRA

Se realizó un estudio descriptivo en dos (2) fincas de producción de tipo pública en la región norte y en dos (2) fincas de producción de tipo privada en la región central de Costa Rica, dónde, la cantidad de muestras obtenidas en cada uno de los centros visitados corresponde convenientemente a la disponibilidad de crías en los meses programados (Agosto 2016 a Marzo 2017); obteniéndose un total de 202 hisopados rectales.

2.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y GENERALIDADES DE LA MUESTRA

Para esta investigación, fueron muestreados lechones con un tiempo de vida post-parto registrado entre el día 2 y 15, preferiblemente libres de la administración de metronidazol y con historial de medicación clínica o profiláctica de cefalosporinas, fluoroquinolonas o tetraciclina. Se recolectaron muestras de heces, obtenidas por hisopado rectal de cada uno de los lechones. Adicionalmente se completó un formulario (Anexo 1), donde se registraron los datos pertinentes al uso de antibióticos en los animales de estudio. Una vez obtenidas las muestras, las mismas fueron organizadas en dos (2) grupos, A y B, para lechones de producción de organismos públicos y privados, respectivamente.

CUADRO 1. DISTRIBUCIÓN DE MUESTRAS DE HISOPADOS RECTALES.

Grupo A		Grupo B	
<i>Finca 1</i>	118	<i>Finca 3</i>	20
<i>Finca 2</i>	44	<i>Finca 4</i>	20
<i>TOTAL</i>	162	<i>TOTAL</i>	40

Los hisopados fueron tomados *in situ*; para ello, se introdujeron hisopos estériles vía rectal, girándolos lentamente hasta obtener aproximadamente 1.0 gramo de materia fecal (Weese *et al.*, 2010); los hisopados fueron depositados inmediatamente en medios de transporte FAB, rotulados y almacenados a temperatura ambiente hasta su procesamiento en el laboratorio de bacteriología de la Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional. Para el presente estudio, se contó con la aprobación del Comité de Bienestar Animal y Bioética, oficio número FCSA-CBAB-EMV-ACUE-005-2016.

2.3 PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

2.3.1 CULTIVO BACTERIOLÓGICO

Las muestras de hisopados rectales fueron tratadas mediante un shock con etanol 96° y luego inoculadas en agar Cefoxitina-Cicloserina-Fructuosa (CCFA; Oxoid). Adicionalmente, una porción de la muestra fue inoculada en caldo de enriquecimiento para Anaerobios Fastidiosos (FAB; Lab M). El CCFA fue incubado por 4 días en sistema de anaerobiosis (en jarras con generadores de anaerobiosis) y el caldo por 8 días bajo las mismas condiciones. Cuando no se observó crecimiento en el primer CCFA, se procedió a utilizar el FAB como cultivo de respaldo en un nuevo CCFA (Quesada-Gómez *et al.*, 2010); adicionalmente se crearon concentrados de cultivos FAB. Las colonias sospechosas (amarillentas e irregulares) fueron identificadas fenotípicamente (Figura 1) mediante prueba de látex *C. difficile* de Oxoid™, prueba de fluorescencia a 365nm, donde, reacciones de aglutinación y fluorescencia verdosa-amarillenta fueron considerados como resultados positivos; los mismos fueron posteriormente confirmados mediante amplificación del gen *tpi* y *cdd3* por PCR convencional descrito previamente (Schneeberg *et al.*, 2013a; Spigaglia y Mastrantonio, 2002).

2.3.2 EXTRACCIÓN Y OBTENCIÓN DE ADN GENÓMICO

El ADN genómico fue extraído a partir de cultivos en anaerobiosis de 12h, en caldo infusión cerebro corazón (BHI; Oxoid) usando el reactivo InstaGene, según las recomendaciones del fabricante (BioRad). El ADN fue conservado en congelación (-80°C), para su posterior utilización.

2.3.3 GENOTIPIFICACIÓN POR PCR PARA *tpi*, *cdd3*, GENES CODIFICANTES DE TOXINA A (*tcdA*), TOXINA B (*tcdB*), DELECCIÓN EN REGIÓN REPETITIVA EN *tcdA* Y TOXINA BINARIA (*cdtA/cdtB*)

Fragmentos de los genes *tpi*, *cdd3*, *tcdA*, , *tcdB*, *tcdC*, *cdtA* y *cdtB*, fueron amplificados mediante PCR convencional usando los iniciadores y condiciones previamente descritas (Schneeberg *et al.*, 2013a; Koene *et al.*, 2012; Quesada-Gómez *et al.*, 2010; Spigaglia y Mastrantonio, 2002); Como controles, fueron utilizados los provistos por el Laboratorio de Investigación en Bacteriología Anaerobia (LIBA) de la Universidad de Costa Rica y Laboratorio de Clostridios del Instituto de Infecciones Bacterianas y Zoonosis (IBIZ) del Friedrich Loeffler Institut (FLI) en Jena, Alemania.

2.3.4 DETERMINACIÓN DEL RIBOTIPO POR PCR Y ELECTROFORESIS DE CAPILARIDAD

Fragmentos de los espaciadores intergénicos en la región ARNm 16S/23S fueron amplificados siguiendo las condiciones previamente descritas por Indra *et al.*, 2008 y modificadas por Schneeberg *et al.*, 2013a; Schneeberg *et al.*, 2013b. Brevemente, producto de amplificación por PCR fue marcado con fluorescencia para lectura en equipo de análisis

genético Applied Biosystems 3130. La detección de los productos marcados es cuantificada, produciéndose un perfil o patrón de picos que corresponden al tamaño y frecuencia de los amplicones. El archivo generado por el analizador fue procesado en el software Peak Studio v2.2 (Fodor Lab, UNCC); los patrones de picos fueron comparados con la base de datos internacional WebRibo (<http://webribo.ages.at>), para la asignación de su respectivo ribotipo. En los casos donde no fue posible la asignación de un ribotipo previamente descrito, se utilizó el prefijo “FLI-CR” y un sub-número consecutivo. El análisis de similitud entre ribotipos se realizó por medio de BioNumerics (v.7.6), utilizando el algoritmo UPGMA (Schneeberg *et al.*, 2013a) y el coeficiente correlativo.

2.3.5 GENOTIPIFICACIÓN POR PFGE (ELECTROFORESIS EN GEL DE CAMPO PULSADO)

ADN genómico fue sometido a digestión enzimática para la obtención de patrones de macrorrestricción y NAP (North American Pulsotype). Brevemente, cultivos de *C. difficile* en BHI (6-8 horas) fueron embebidos en agarosa (Seakem Gold, Lonza) y tratados con buffer de lisis para la preparación de plugs, siguiendo protocolos previamente descritos (Miller *et al.*, 2010). Posteriormente, los plugs fueron incubados con buffer que contenía lisozima, Rnase A y mutanolisina (Sigma). Se realizó digestión enzimática con SmaI (Roche) y los fragmentos de ADN fueron separados en un gel de agarosa con TBE 0.5X (Fermentas) en equipo CHEF-DRII (Bio-Rad), en una corrida de 21 horas. Los geles obtenidos fueron teñidos con bromuro de etidio y fotodocumentados con el equipo ChemiDoc (Bio-Rad). Las imágenes obtenidas, fueron analizadas mediante el software BioNumerics (Applied Math) y los patrones de macrorrestricción resultantes fueron comparados, mediante análisis de similitud (algoritmo UPGMA; coeficiente Dice, tolerancia/optimización 1.0%), con los depositados en la base de datos del National Microbiology Laboratory, Canada.

2.3.6 GENOTIPIFICACIÓN POR MLVA (VARIABILIDAD DEL NÚMERO DE REPETICIONES EN TÁNDEM EN MÚLTIPLES LOCUS)

MLVA fue realizado para todas las cepas estudiadas, donde se utilizó la metodología modificada de Schneeberg *et al.*, 2013a; Schneeberg *et al.*, 2013b. Brevemente, producto de amplificación de siete locus por PCR (A6_{cd}, B7_{cd}, C6_{cd}, E7_{cd}, F3_{cd}, G8_{cd} y H9_{cd}) fue sometido a electroforesis de gel capilar en equipo Applied Biosystems 3130. Los patrones de picos generados (electroferograma) fueron procesados en el software Peak Studio v2.2 (Fodor Lab, UNCC) y los perfiles numéricos (alélicos) fueron corregidos mediante ecuación lineal para la obtención del número de copias repetidas (STR). Los perfiles alélicos fueron posteriormente procesados en el software PHYLOViZ v.2.0 y el plugin MLVA v.2.0.0 para la obtención de árboles de expansión mínima (MST), utilizando las diferencias de repetición en tándem sumadas (STRD) y la combinación con las variaciones de locus (SLV: variaciones en un locus; DLV: variaciones en dos locus) mediante el algoritmo de distancia goeBURST (se consideró como grupo clonal aquellos aislamientos con SLV ≤ 2 , y grupos genéticamente relacionados no clonales a aquellos cuya SLV fue entre >2 y ≤ 10).

3. RESULTADOS

3.1 CULTIVO, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *Clostridium difficile*

Un total de 202 muestras de hisopados rectales, distribuidos en 4 fincas, fueron recolectados, procesados y categorizados dentro de dos (2) grupos: Fincas Públicas “A” (2 Fincas, 39 pools) y Fincas Privadas “B” (2 Fincas, 15 pools). *Clostridium difficile* fue detectado en 3 de 4 (75%) de las fincas muestreadas, obteniendo un total de 20 aislamientos típicos (Figura 1) donde en el grupo A, se obtuvo un total de 10/39 (26%), y en el grupo B, un total de 10/15 (67%), de concentrados (pools) compatibles con *C. difficile* (Cuadro 2). De los animales muestreados, 6/202 (3%) fueron reportados enfermos por diarrea, los restantes 196/202 (97%) eran animales sin diarrea (aparentemente sanos).

CUADRO 2. FINCAS Y AISLAMIENTOS DE *Clostridium difficile*

ORIGEN	TOTAL LECHONES	D+	D-	Concentrados Procesados	AISLAMIENTOS <i>C. difficile</i>
Grupo A	<i>FINCA 1</i>	0	118	29	0
	<i>FINCA 2</i>	0	44	11	10
Grupo B	<i>FINCA 3</i>	0	20	7	4
	<i>FINCA 4</i>	6	14	8	6
TOTALES	202	6	196	55	20

D+: Presencia de diarrea; *D-*: Ausencia de diarrea (animales aparentemente sanos).

Para grupo “A”, se reportó que se evita el uso innecesario de cualquier antibiótico o fármaco de forma profiláctica. El grupo “B”, no reportó cual es el esquema de uso o manejo de antibióticos en sus sistemas de producción.

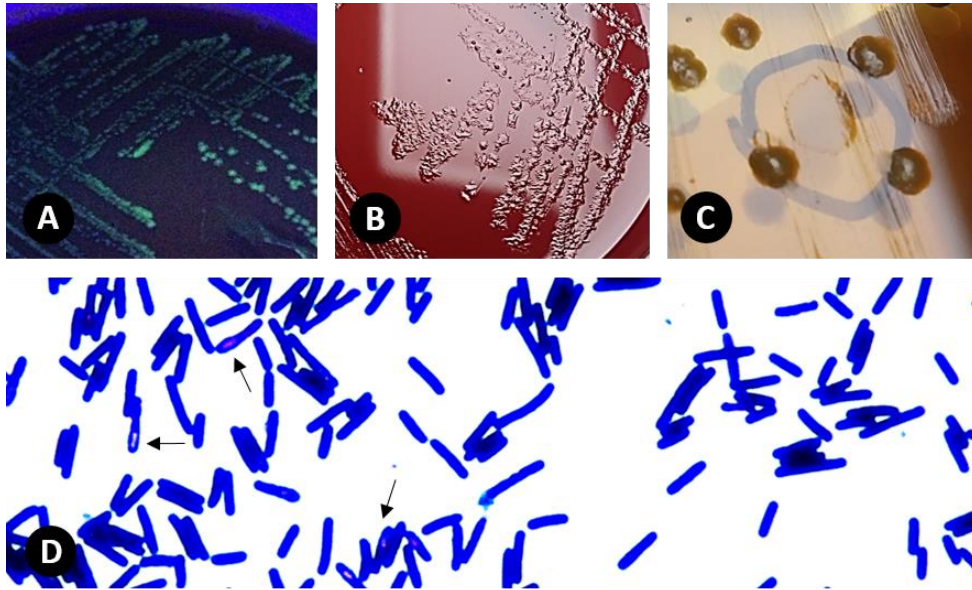


FIGURA 1. MORFOLOGÍA COLONIAL Y CELULAR *Clostridium difficile*

A. FLUORESCENCIA EN AGAR SANGRE; B. COLONIAS TÍPICAS EN AGAR SANGRE; C. COLONIA EN CCFA; D. TINCIÓN GRAM (100X), FLECHAS: ESPORAS SUB-TERMINALES.

3.2 GENOTIPIFICACIÓN POR PCR: PERFIL DE TOXINAS Y RIBOTIPOS

De los 20 aislamientos, 10 resultaron ser no toxigénicos (*tcdA*-, *tcdB*-, *cdtA*-/*B*-), 4 positivos por PCR a *tcdA*, *tcdB* y *cdtAB* ($A^+B^+CDT^+$), y finalmente, 6 positivos por PCR a *tcdA*, *tcdB* y negativos para *cdtAB* ($A^+B^+CDT^-$). Todos los aislamientos *tcdA* positivos, no presentaron deleciones en la región repetitiva de su genoma, obteniéndose un producto de amplificación de 1,200-*bp*, lo cual sugiere una toxina funcional. Tres ribotipos fueron asignados, por la plataforma WEBRIBO, a los aislamientos caracterizados: RT078, RT596 y RTFLI-CR₁ (RT014/5; *closest match*). El RT596 fue detectado en una finca del grupo A, RT078 y RTFLI-CR₁ fueron detectados en las fincas 3 y 4 del grupo B, respectivamente. Adicionalmente, se calculó la similitud entre ribotipos mediante el método UPGMA, obteniéndose 2 grupos (A y B), (Figura 2).

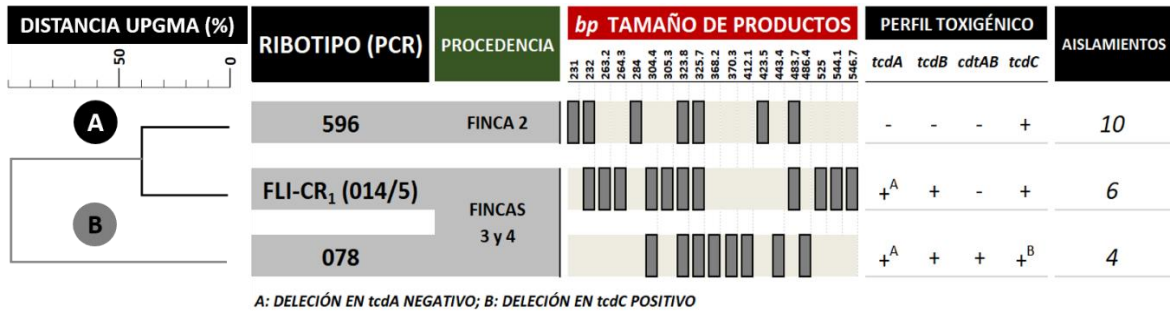


FIGURA 2. PATRONES MOLECULARES Y DISTRIBUCIÓN DE LOS AISLAMIENTOS DE *C. difficile*. Se utilizó el algoritmo UPGMA para el análisis de similitud entre patrones de ribotipos por PCR, Los aislamientos pertenecientes al genotipo RT078/NAP7, mostraron una delección en gen *tcdC*, característico de dicho genotipo que posee características hipervirulentas. No se detectó delección en *tcdA*, sugerente de toxina A funcional.

3.4 GENOTIPIFICACIÓN POR PFGE (ELECTROFORESIS EN GEL DE CAMPO PULSANTE)

En las cepas toxigénicas, se obtuvieron dos patrones de macrorrestricción *SmaI* (0080 y 1148); 0080 correspondió con el pulsotipo NAP7, reportado en un caso clínico hospitalario, el patrón de marorrestricción 1148 coincidió con un patrón previamente reportado en la base de datos del National Microbiology Laboratory (Canada), pero con ninguno previamente reportado en Costa Rica. La comparación entre pulsotipos nacionales, previamente detectados, y los obtenidos en el presente estudio, se realizó mediante el algoritmo UPGMA, coeficiente Dice, tolerancia/optimización 1.0% (Anexo 2).

3.4 GENOTIPIFICACIÓN POR MLVA (VARIABILIDAD DEL NÚMERO DE REPETICIONES EN TÁNDEM EN MÚLTIPLES LOCUS)

Se detectaron 10 perfiles MLVA, los cuales fueron asignados a 3 diferentes grupos (correspondientes a los 3 ribotipos descritos). La mayor variabilidad alélica fue detectada en

el locus B7_{Cd} con 6 alelos, seguidos por A6_{Cd} y C6_{Cd}, E7_{Cd} y G8_{Cd}, H9_{Cd} y F3_{Cd}, con: 5, 5, 3, 3, 2 y 1 alelos, respectivamente. En el grupo clonal A, RT596 y RTFLI-CR₁, todos los aislamientos mostraron invariabilidad alélica para los locus E7_{Cd}, F3_{Cd}, G8_{Cd} y H9_{Cd}. (Cuadro 3). Interesantemente, todos los aislamientos RT078, pertenecientes al grupo clonal B, fueron negativos para el locus A6_{Cd} e invariables para los locus C6_{Cd}, E7_{Cd} y G8_{Cd}, H9_{Cd} y F3_{Cd}. Finalmente, tres alelos para el locus B7_{Cd}, fueron detectados para los aislamientos del RT078 con 28, 26 y 25 copias.

CUADRO 3. PERFILES ALÉLICOS DE RT596, RTFLI-CR₁ Y RT078/NAP7, DETERMINADOS POR MLVA EN AISLAMIENTOS PORCINOS DE COSTA RICA

RIBOTIPOS PCR	PERFILES MLVA	<i>loci</i>							AISLAMIENTOS	
		A6 _{Cd}	B7 _{Cd}	C6 _{Cd}	E7 _{Cd}	F3 _{Cd}	G8 _{Cd}	H9 _{Cd}		
RT596	1	1.1	27	19	34	2	4	8	1	1-2-3-8
		1.2	27	27	33	2	4	8	1	4-6-10
		1.3	27	28	33	2	4	8	1	5
		1.4	26	27	33	2	4	8	1	7
		1.5	27	19	33	2	4	8	1	9
RTFLI-CR ₁	2	2.1	28	10	25	4	4	13	2	15-16-17-18-20
		2.2	30	10	26	4	4	13	2	19
RT078	3	3.1	0	26	32	8	4	10	2	11
		3.2	0	25	32	8	4	10	2	12
		3.3	0	28	32	8	4	10	2	13-14
ALELOS		5	6	5	3	1	3	2		

El análisis de MST (Minimum-spanning-tree) de los datos MLVA, mostró la relación entre aislamientos de *C. difficile*, donde tres complejos clonales fueron detectados, y que corresponden a los tres ribotipos previamente descritos, con una SLV= 5 (STRD >2) entre sí. Todos los aislamientos, sin excepción, están genéticamente relacionados, (Figura 3).

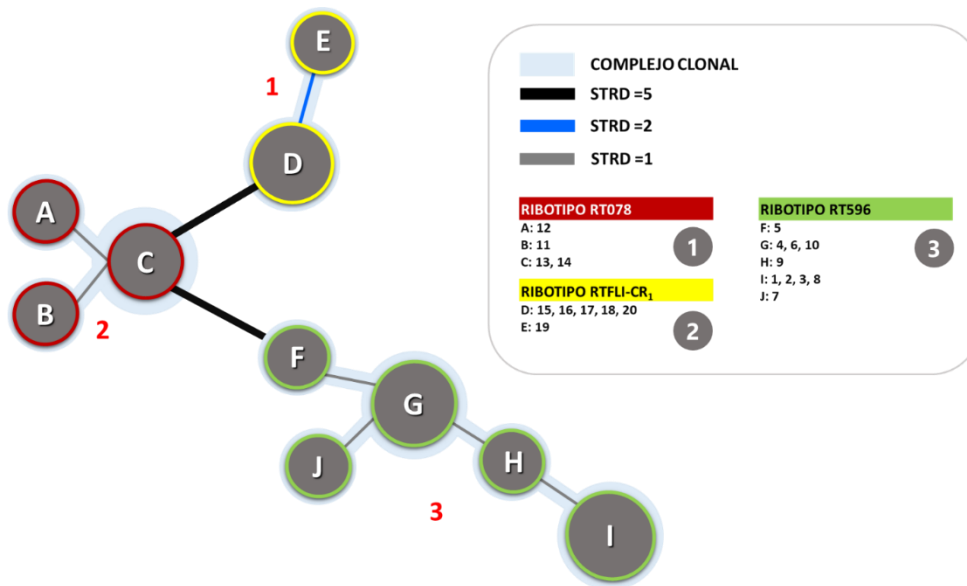


FIGURA 3. ÁRBOL DE EXPANSIÓN MÍNIMA (MST) DE RT078/NAP7, RTFLI-CR₁ Y RT596

En los aislamientos costarricenses, se identificaron tres complejos clonales entre los aislamientos. El algoritmo eBURST optimizado para MLVA fue utilizado, donde se priorizó la agrupación de SLV=1, SLV=1,2 y otros. El diámetro de los círculos es proporcional al número de aislamientos. Distribución similar fue obtenida al procesar los datos de los electroferogramas en BioNumerics (v.7.6).

4. DISCUSIÓN

Se realizó un estudio no probabilístico en todos los lechones <15 días post-parto disponibles en las fechas de muestreo, donde se investigó la presencia de *Clostridium difficile* y se realizó su caracterización molecular para la descripción de perfiles toxigénicos pulsotipos y ribotipos en los aislamientos obtenidos. La baja proporción de aislamiento (Cuadro 2), es compatible con estudios previos que reportaron prevalencias variables en los grupos estudiados (Arruda, 2014; Álvarez-Pérez *et al.*, 2009). Para este estudio, se consideraron estudios que indican la edad que presenta mayores tasas de colonización y recuperación en cultivo, así como las condiciones de procesamiento (Schneeberg *et al.*, 2013a; Hopman *et al.*, 2011; Weese *et al.*, 2010).

El análisis de los datos de PCR-Ribotyping concluyó con el reporte de tres ribotipos, donde dos de ellos, RT596 y RT078, fueron detectados y los mismos correspondían a los aislamientos de las fincas en el grupo B (Cuadro 2), y cuyas características genotípicas, en el caso de RT078, corresponden con reportes previos y con la información disponible en Webribo (Rodríguez *et al.*, 2016). RT596 ha sido reportado previamente en Alemania a partir de terneros, sus características genotípicas también corresponden con los reportes previos (Schneeberg *et al.*, 2013b); sin embargo, diez (10) aislamientos correspondieron a RT014/5, por el criterio de homología, con el ribotipo de referencia, por ello se asignó el prefijo FLI-CR y el sub-consecutivo “1”, siendo los mismos compatibles con las características previamente descritas para aislamientos del genotipo RT014 (Knight *et al.*, 2015b).

RT078 ha sido descrito y asociado a brotes en humanos en Europa (Knight *et al.*, 2016; Knight *et al.*, 2015a) y constituye uno de los principales ribotipos detectados en porcinos (Janezic *et al.*, 2014b; Janezic *et al.*, 2012) y en animales de producción, siendo considerado como un ribotipo emergente de marcada importancia y con características epidémicas (Elliott *et al.*, 2017; Hengsgens *et al.*, 2012). En Brasil (Latinoamérica), *C. difficile* RT078 ha sido aislado a partir de potros, sin embargo, no ha sido reportado en humanos (Silva *et al.*, 2015; Monteiro *et al.*, 2014); RT078 ha sido aislado también a partir de diversas especies biológicas consideradas como plagas, que podrían contribuir con su diseminación en el ambiente (Burt *et al.*, 2012). En Costa Rica, RT078 ha sido detectado en un caso (comunicación personal), sus características genotípicas (perfil de toxinas, pulsotipo y PCR-ribotipo) corresponden a los aislamientos obtenidos en lechones en el presente estudio.

RT014 ha sido descrito en animales y humanos (Silva *et al.*, 2015; Knight *et al.*, 2015c; Knight *et al.*, 2013), así como en productos cárnicos de consumo (Rodríguez *et al.*, 2014). En un estudio reciente, RT014 fue analizado y se ha reportado su transmisión inter-especie, mostrando una relación estrecha entre hospederos y compartiendo múltiples elementos de resistencia a los antimicrobianos (Knight *et al.*, 2016). En Costa Rica, aislamientos correspondientes al genotipo NAP4/RT014 han sido detectados en 12.3% de los mismos (comunicación personal), compartiendo también sus características genotípicas y toxigénicas. Ambos ribotipos, RT078 y RTFLI-CR₁, fueron detectados en los aislamientos analizados, lo que podría suponer un posible riesgo para la salud pública si ocurriese una diseminación de los mismos, sobre todo a nivel comunitario (Rodríguez *et al.*, 2016; Bauer y Kuijper, 2015; Squire y Riley, 2013); Inesperadamente RT596, correspondiente al 50% de los aislamientos caracterizados en el presente estudio y previamente reportado en terneros (Schneeberg *et al.*, 2013b), ha sido también reportado en infantes y ancianos atendidos en hospitales de Europa (Krutova *et al.*, 2016), donde ambas poblaciones son consideradas potencialmente vulnerables (Bassetti *et al.*, 2012).

Finalmente, el análisis de los datos obtenidos con MLVA muestra una intravariabilidad mínima entre los aislamientos, cuya STRD fue ≤ 2 (asumida, donde SLV = ≤ 2) entre aislamientos del mismo complejo clonal y con una baja variabilidad en los alelos F3_{ca}, G8_{ca} y H9_{ca}, lo que es esperado en cepas provenientes de la misma fuente en la misma granja (Avbersek *et al.*, 2009). Tal y como se esperaba, RT078 mostró la ausencia de alelos en el locus A6_{ca}, lo cual concuerda con reportes previos en lechones de Alemania (Schneeberg *et al.*, 2013a). Adicionalmente, se realizó el análisis, utilizando BioNumerics (v7.6), utilizando una configuración previamente descrita (Schneeberg *et al.*, 2013a), de los

datos de curvas obtenidas en electroferogramas para MLVA de los aislamientos: RT078/NAP7 de Costa Rica (n=4), y de perfiles alélicos de RT 078, disponibles en publicaciones previas (Schneeberg *et al.*, 2013a; Bakker *et al.*, 2010), donde se seleccionaron, aleatoriamente, perfiles humanos (n=13, cinco países europeos), perfiles porcinos (n=11, cinco países europeos); RT078/NAP7 de Costa Rica, formó un complejo clonal ($SLV/STRD \leq 2$), con un aislamiento humano de Alemania y formó parte de un complejo genéticamente relacionado ($SLV/STRD >2$ y ≤ 10), conformado por 19 aislamientos de fuentes humanas y porcinas de diversas regiones europeas (Anexo 3). Un estudio publicado recientemente (Usui *et al.*, 2014), obtuvo resultados similares al analizar los perfiles alélicos de aislamientos humanos y porcinos; Los hallazgos reportados en el presente estudio demuestran que *C. difficile* es un patógeno de amplia distribución con una epidemiología cambiante y dinámica; RT078/NAP7, con alto potencial virulento, fue detectado en cuatro aislamientos porcinos y un aislamiento clínico en el país, y más importante aún, los resultados genotípicos en los aislamientos de origen porcino muestran una relación clonal con aislamientos virulentos clínicos y porcinos en Europa. A pesar de que dichos aislamientos (porcinos de Costa Rica) parecen estar circunscritos a la población porcina, con excepción del caso clínico detectado, la vigilancia y estudios dirigidos a aislamientos de origen comunitario, son necesarios para poder establecer las posibles implicaciones en salud pública. Los hallazgos en el presente estudio corroboran una vez el solapamiento entre hospederos reportados globalmente (Rodriguez *et al.*, 2016; Hengsgens *et al.*, 2012), surgiendo así, interrogantes sobre la dinámica de *C. difficile* en la comunidad.

5. CONCLUSIONES

- *Clostridium difficile* se encuentra presente en lechones de Costa Rica, colonizando el tejido gastrointestinal de los mismos, y con una baja proporción de aislamiento.
- La intravariabilidad mínima de los perfiles alélicos detectados por MLVA, permiten inferir que los aislamientos de *C. difficile* pertenecen a cepas genéticamente conservadas y que posiblemente han sido transmitidas entre hospederos por el ambiente.
- Los aislamientos RT078/NAP7 de Costa Rica, comparten características genotípicas con aislamientos hipervirulentos reportados en Europa, lo que pone de manifiesto su potencial e importancia epidemiológica en el país y la región.
- Los sistemas de producción, aparentemente distintos entre sí, y, cuya caracterización no forma parte de las variables del estudio, permiten suponer que dichas diferencias influyen de alguna manera la presencia de los ribotipos y sus características genotípicas/fenotípicas, al obtener aislamientos no toxigénicos y toxigénicos en los grupos A y B, respectivamente.
- De los genotipos encontrados, RT078/NAP7 ha sido previamente detectado en un caso clínico humano; FLI-CR₁/SmaI 1148 (RT014/5), probablemente pertenece al mismo linaje de RT014/NAP4, detectado en aislamientos previamente caracterizados. Ambos, RT078/NAP7 y RT014/NAP4, son de alta importancia epidemiológica en Europa y América, y han sido detectados a nivel hospitalario nacional; por lo tanto, podrían ser elementos de riesgo considerable en la evolución y dinámica de *C. difficile* a nivel comunitario en el país.

- Ninguno de los tres ribotipos detectados y caracterizados en el presente estudio han sido reportados en animales en la región de Centro América y México, por lo tanto, el presente se considera como el primer reporte de *Clostridium difficile* en animales de la región.

6. RECOMENDACIONES

- Se recomienda la investigación de toxicidad de los genotipos detectados, para poder establecer las posibles implicaciones y potenciales patológicos de los mismos.
- Adicionalmente, se recomienda la investigación de genes de resistencia a los antimicrobianos, así como de elementos móviles y adquiridos, que podrían contribuir con su latente virulencia.
- Se debe concientizar a la comunidad médico-veterinaria sobre los posibles riesgos en el manejo inadecuado de los sistemas de producción porcina. En la finca “1” del sector público, donde el manejo es de alta calidad y los animales son mantenidos en ambientes limpios y adecuados, la proporción de aislamiento de *C. difficile* fue de 0%.
- La implementación de un programa básico de vigilancia epidemiológica, en las fincas de producción porcina privadas, podrían contribuir con la prevención de casos comunitarios, así como con el desarrollo de políticas de manejo modernas y seguras, que evitan o disminuyen el riesgo de contaminación del ambiente y la diseminación de genotipos toxigénicos con potencial virulento.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Aboutaleb, N., Kuijper, E., y van Dissel, J. (2014). Emerging infectious colitis. *Current Opinion in Gastroenterology*, 30(1), 106–115.
- Aguayo, C., Flores, R., Levesque, S., Araya, P., Ulloa, S., Lagos, J., . . . y Fernández, J. (2015). Rapid spread of *Clostridium difficile* NAP1/027/ST1 in Chile confirms the emergence of the epidemic strain in Latin America. *Epidemiology and Infection*, 143(14), 3069–3073.
- Álvarez-Pérez, S., Blanco, J., Bouza, E., Alba, P., Gibert, X., Maldonado, J., y Garcia, M. (2009). Prevalence of *Clostridium difficile* in diarrhoeic and non-diarrhoeic piglets. *Veterinary Microbiology*, 137(3-4), 302–305.
- Arruda, P. (2014). *Clostridium difficile* infection in neonatal piglets: Pathogenesis, risk factors, and prevention (Doctor of Philosophy Thesis). Iowa State University, Ames, Iowa, USA.
- Avbersek, J., Janezic, S., Pate, M., Rupnik, M., Zidaric, V., Logar, K., . . . y Ocepek, M. (2009). Diversity of *Clostridium difficile* in pigs and other animals in Slovenia. *Anaerobe*, 15(2009), 252–255.
- Bakker, D., Corver, J., Harmanus, C., Goorhuis, A., Keessen, E., Fawley, W., . . . y Kuijper, E. (2010). Relatedness of Human and Animal *Clostridium difficile* PCR Ribotype 078 Isolates Determined on the Basis of Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis and Tetracycline Resistance. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(10), 3744–3749.
- Bassetti, M., Villa, G., Pecori, D., Arzese, A., y Wilcox, M. (2012). Epidemiology, Diagnosis and Treatment of *Clostridium Difficile* Infection. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 10(12), 1405–1423.
- Bauer, M. y Kuijper, E. (2015). Potential sources of *Clostridium difficile* in human infection. *Infectious Disease Clinics of North America*, 29(1), 29–35.
- Burke, K. y Lamont, J. (2014). *Clostridium difficile* infection: a worldwide disease. *Gut and Liver*, 8(1), 1–6.

- Burt, S., Siemeling, L., Kuijper, E., y Lipman, L. (2012). Vermin on pig farms are vectors for *Clostridium difficile* PCR ribotypes 078 and 045. *Veterinary Microbiology*, *160*(1-2), 256–258.
- Elliott, B., Androga, G., Knight, D., y Riley, T. (2017). *Clostridium difficile* infection: Evolution, phylogeny and molecular epidemiology. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, *49*, 1–11.
- Goorhuis, A., Bakker, D., Corver, J., Debast, S., Harmanus, C., Notermans, D., . . . y Kuijper, E. (2008). Emergence of *Clostridium difficile* Infection Due to a New Hypervirulent Strain, Polymerase Chain Reaction Ribotype 078. *Clinical Infectious Diseases*, *47*(9), 1162–1170.
- Hengsgens, M., Keessen, E., Squire, M., Riley, T., Koene, M., Boer, E., . . . y Kuijper, E. (2012). *Clostridium difficile* infection in the community: a zoonotic disease? *Clinical Microbiology and Infection*, *18*(7), 635–645.
- Hopman, N., Keessen, E., Harmanus, C., Sanders, I., van Leengoed, L., Kuijper, E., y Lipman, L. (2011). Acquisition of *Clostridium difficile* by piglets. *Veterinary Microbiology*, *149*(1-2), 186–192.
- Indra, A., Huhulescu, S., Schneeweis, M., Hasenberger, P., Kernbichler, S., Fiedler, A., . . . y Kuijper, E. (2008). Characterization of *Clostridium difficile* isolates using capillary gel electrophoresis-based PCR ribotyping. *Journal of Medical Microbiology*, *57*(Pt 11), 1377–1382.
- Janezic, S., Ocepek, M., Zidaric, V., y Rupnik, M. (2012). *Clostridium difficile* genotypes other than ribotype 078 that are prevalent among human, animal and environmental isolates. *BMC Microbiology*, *12*, 48.
- Janezic, S., Zidaric, V., Pardon, B., Indra, A., Kokotovic, B., Blanco, J., . . . y Rupnik, M. (2014a). International *Clostridium difficile* animal strain collection and large diversity of animal associated strains. *BMC Microbiology*, *14*, 173.

- Janezic, S., Zidaric, V., Pardon, B., Indra, A., Kokotovic, B., Blanco, J., . . . y Rupnik, M. (2014b). International Clostridium difficile animal strain collection and large diversity of animal associated strains. *BMC Microbiology*, *14*(1), 173.
- Keel, M. y Songer, J. (2011). The Attachment, Internalization, and Time-Dependent, Intracellular Distribution of Clostridium difficile Toxin A in Porcine Intestinal Explants. *Veterinary Pathology*, *48*(2), 369–380.
- Keel, M. y Songer, J. (2007). The Distribution and Density of Clostridium difficile Toxin Receptors on the Intestinal Mucosa of Neonatal Pigs. *Veterinary Pathology*, *44*(6), 814–822.
- Knetsch, C., Connor, T., Mutreja, A., van Dorp, S., Sanders, I., Browne, H., . . . y Lawley, T. (2015). Whole genome sequencing reveals potential spread of Clostridium difficile between humans and farm animals in the Netherlands, 2002 to 2011. *Euro Surveil*, *45*(19).
- Knight, D., Elliott, B., Chang, B., Perkins, T., y Riley, T. (2015a). Diversity and Evolution in the Genome of Clostridium difficile. *Clinical Microbiology Reviews*, *28*(3), 721–741.
- Knight, D., Squire, M., Collins, D., y Riley, T. (2016). Genome Analysis of Clostridium difficile PCR Ribotype 014 Lineage in Australian Pigs and Humans Reveals a Diverse Genetic Repertoire and Signatures of Long-Range Interspecies Transmission. *Frontiers in Microbiology*, *7*, 2138.
- Knight, D., Squire, M., y Riley, T. (2015b). Nationwide surveillance study of Clostridium difficile in Australian neonatal pigs shows high prevalence and heterogeneity of PCR ribotypes. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(1), 119–123.
- Knight, D., Squire, M., y Riley, T. (2015c). Nationwide Surveillance Study of Clostridium difficile in Australian Neonatal Pigs Shows High Prevalence and Heterogeneity of PCR Ribotypes. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(1).

- Knight, D., Thean, S., Putsathit, P., Fenwick, S., y Riley, T. (2013). Cross-Sectional Study Reveals High Prevalence of *Clostridium difficile* Non-PCR Ribotype 078 Strains in Australian Veal Calves at Slaughter. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(8), 2630–2635.
- Koene, M., Mevius, D., Wagenaar, J., Harmanus, C., Hengsgens, M., Meetsma, A., . . . y Kuijper, E. (2012). *Clostridium difficile* in Dutch animals: their presence, characteristics and similarities with human isolates. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(8), 778–784.
- Krutova, M., Nyc, O., Matejkova, J., Allerberger, F., Wilcox, M., y Kuijper, E. (2016). Molecular characterisation of Czech *Clostridium difficile* isolates collected in 2013-2015. *International journal of medical microbiology : IJMM*, 306(7), 479–485.
- MAG-CR, 2012. Carne de Cerdo, Período 2009-2011: Informe del Consejo Nacional de Producción de Costa Rica. San José.
- Miller, M., Gravel, D., Mulvey, M., Taylor, G., Boyd, D., Simor, A., . . . y Kelly, S. (2010). Health care-associated *Clostridium difficile* infection in Canada: patient age and infecting strain type are highly predictive of severe outcome and mortality. *Clinical Infectious Diseases*, 50(2), 194–201.
- Monteiro, A., Pires, R., Persson, S., Rodrigues Filho, E., y Pasqualotto, A. (2014). A search for *Clostridium difficile* ribotypes 027 and 078 in Brazil. *The Brazilian journal of infectious diseases: an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, 18(6), 672–674.
- Programa Nacional de Cerdos de Costa Rica, 2007. COMPORTAMIENTO DE LA ACTIVIDAD PORCINA EN COSTA RICA 2000 - 2006. San José: Ministerio de Agricultura y Ganadería.
- Quesada-Gómez, C., Mulvey, M., Vargas, P., Gamboa-Coronado, M., Rodríguez, C., y Rodríguez-Cavallini, E. (2013). Isolation of a Toxigenic and Clinical Genotype of *Clostridium difficile* in Retail Meats in Costa Rica. *Journal of Food Protection*, 76(2), 348–351.

- Quesada-Gómez, C., Rodríguez, C., Gamboa-Coronado, M., Rodríguez-Cavallini, E., Du, T., Mulvey, M., . . . y Boza-Cordero, R. (2010). Emergence of *Clostridium difficile* NAP1 in Latin America. *Journal of Clinical Microbiology*, *48*(2), 669–670.
- Quesada-Gómez, C., Vargas, P., López-Ureña, D., Gamboa-Coronado, M., y Rodríguez-Cavallini, E. (2012). Community-acquired *Clostridium difficile* NAP1/027-associated diarrhea in an eighteen month old child. *Anaerobe*, *18*(6), 581–583.
- Rodríguez, C., Taminiou, B., Avesani, V., van Broeck, J., Delmée, M., y Daube, G. (2014). Multilocus sequence typing analysis and antibiotic resistance of *Clostridium difficile* strains isolated from retail meat and humans in Belgium. *Food Microbiology*, *42*, 166–171.
- Rodríguez, C., Taminiou, B., van Broeck, J., Delmée, M., y Daube, G. (2016). *Clostridium difficile* in Food and Animals: A Comprehensive Review. *Advances in Experimental Medicine and Biology*.
- Schneeberg, A., Neubauer, H., Schmoock, G., Baier, S., Harlizius, J., Nienhoff, H., . . . y Seyboldt, C. (2013a). *Clostridium difficile* genotypes in piglet populations in Germany. *Journal of Clinical Microbiology*, *51*(11), 3796–3803.
- Schneeberg, A., Neubauer, H., Schmoock, G., Grossmann, E., y Seyboldt, C. (2013b). Presence of *Clostridium difficile* PCR ribotype clusters related to 033, 078 and 045 in diarrhoeic calves in Germany. *Journal of Medical Microbiology*, *62*(Pt 8), 1190–1198.
- Senasa, Costa Rica, 2012. Informe sobre la situación sanitaria de Costa Rica: 2012. San José.
- Silva, R., Rupnik, M., Diniz, A., Vilela, E., y Lobato, F. (2015). *Clostridium difficile* ribotypes in humans and animals in Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, *110*(8), 1062–1065.
- Smits, W., Lyras, D., Lacy, D., Wilcox, M., y Kuijper, E. (2016). *Clostridium difficile* infection. *Nature Reviews. Disease Primers*, *2*, 16020.
- Songer, J. (2010). Clostridia as agents of zoonotic disease. *Veterinary Microbiology*, *140*(3-4), 399–404.

- Songer, J., Post, K., Larson, D., Jost, H., y Glock, R. (2000). Infection of neonatal swine with *Clostridium difficile*. *Swine Health and Production*, 8(4), 185–189.
- Songer, J. y Uzal, F. (2005). Clostridial Enteric Infections in Pigs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 17(6), 528–536.
- Spigaglia, P. y Mastrantonio, P. (2002). Molecular Analysis of the Pathogenicity Locus and Polymorphism in the Putative Negative Regulator of Toxin Production (TcdC) among *Clostridium difficile* Clinical Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(9), 3470–3475.
- Squire, M. y Riley, T. (2013). *Clostridium difficile* infection in humans and piglets: a ‘One Health’ opportunity. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 365, 299–314.
- Usui, M., Nanbu, Y., Oka, K., Takahashi, M., Inamatsu, T., Asai, T., . . . y Tamura, Y. (2014). Genetic relatedness between Japanese and European isolates of *Clostridium difficile* originating from piglets and their risk associated with human health. *Frontiers in Microbiology*, 5(513), 1–8.
- Uzal, F., Songer, J., Prescott, J., y Popoff, M. (Eds.). (2016). *Clostridial Diseases of Animals* (First). 1606 Golden Aspen Drive, Suites 103 and 104, Ames, Iowa 50010, USA: John Wiley & Sons, Inc | Blackwell.
- Valiente, E., Cairns, M., y Wren, B. (2014). The *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 lineage: a pathogen on the move. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(5), 396–404.
- Weese, J., Wakeford, T., Reid-Smith, R., Rousseau, J., y Friendship, R. (2010). Longitudinal investigation of *Clostridium difficile* shedding in piglets. *Anaerobe*, 16(2010), 501–504.

ANEXO 1



Clostridium difficile:

Determinación de los genotipos presentes en suinos de Costa Rica

Mauricio Andino-Molina^{UNA}, Carlos Quesada^{UCR}, Elías Barquero^{UNA}, Cesar Rodríguez^{UCR}
2016 - 2017



A

FECHA DE MUESTREO

NOMBRE DE FINCA

RESPONSABLE DE FINCA

MADRE / VIENTRE

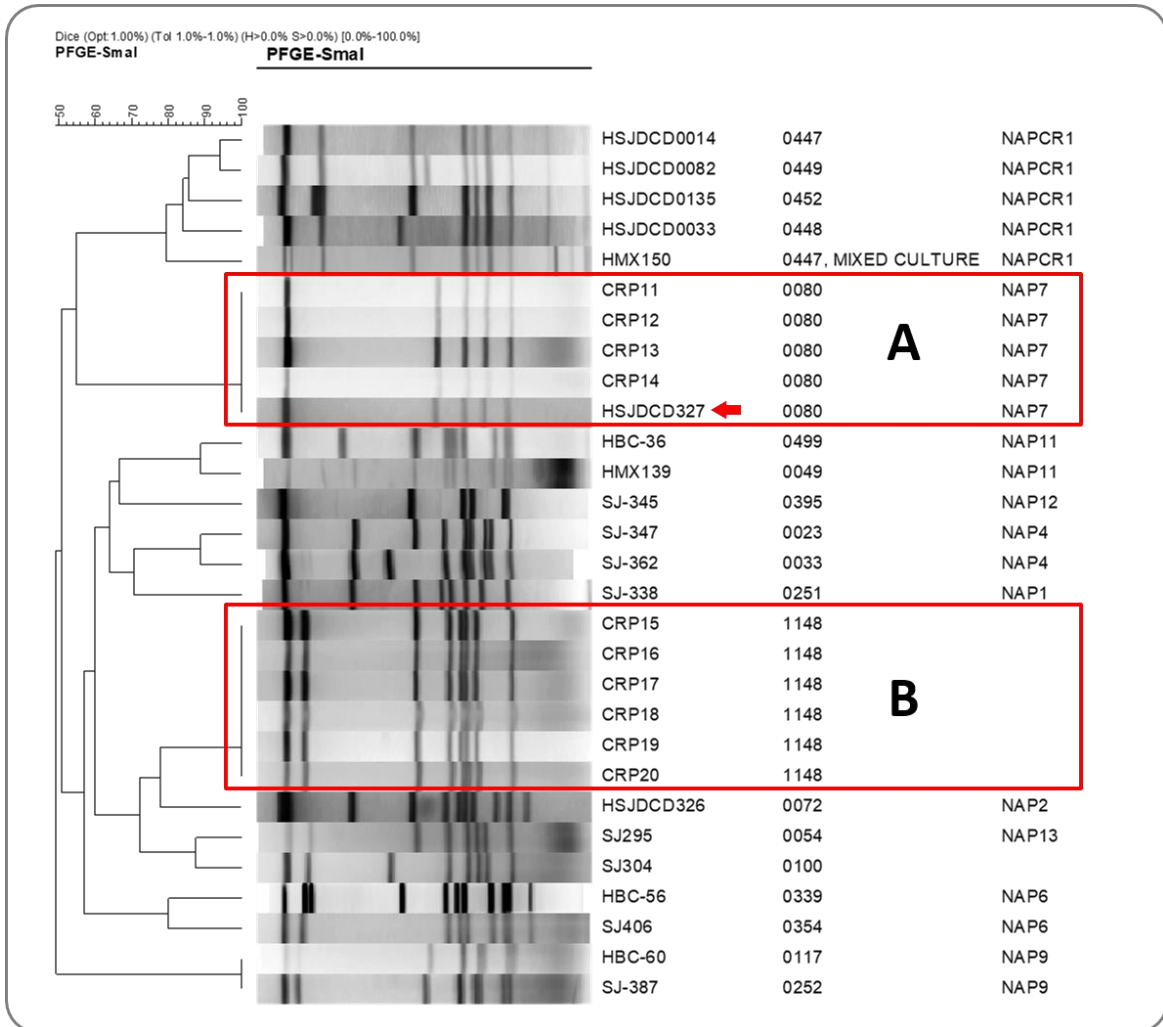
TRATAMIENTO PREVIO ANTIBIÓTICOS SI NO

FECHA DE PARTO

B

LECHONES					
#	SALUD		CUADRO CLÍNICO ESPECIFICAR EN CASO DE PRESENTARLO	TRATAMIENTO PREVIO ANTIBIÓTICOS	
	<input type="checkbox"/> SANO	<input type="checkbox"/> ENFERMO		<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					

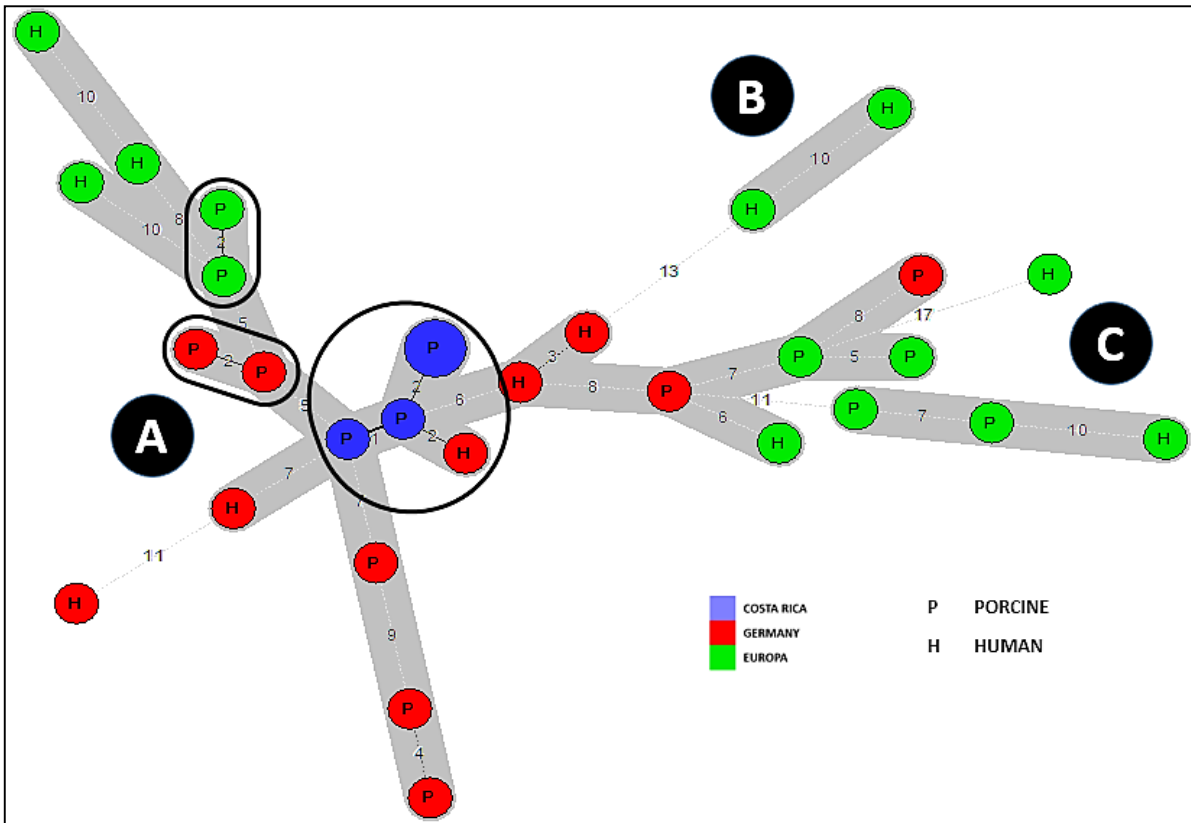
ANEXO 2.



COMPARACIÓN DE PATRONES DE MACRORRESTRICCIÓN *SmaI* (PFGE) DE *Clostridium difficile* EN COSTA RICA

Se compararon 25 patrones de macrorrestricción *SmaI* de *C. difficile* aislados en Costa Rica en Humanos (n=15) y porcinos (n=10). **(A)** RT078/NAP7 (porcinos) mostraron completa homología con un aislamiento humano RT078/NAP7 (flecha), contenido en la base de datos de LIBA-UCR. **(B)** Los aislamientos (porcinos) con el patrón de macrorrestricción *SmaI* 1148 no coincidieron con ningún patrón registrado en las bases de datos, por lo tanto, se considera como un nuevo tipo PFGE en Costa Rica.

ANEXO 3.



ÁRBOL DE EXPANSIÓN MÍNIMA (MST) DE PERFILES ALÉLICOS (MLVA) DE *Clostridium difficile*, EN AISLAMIENTOS DE EUROPA Y COSTA RICA

Colección de perfiles alélicos (MLVA) de aislamientos humanos y porcinos RT078 de Europa (Inglaterra, Irlanda, Holanda, Bélgica y Alemania) y porcinos RT078/NAP7 de Costa Rica. El diámetro de las celdas es proporcional a los aislamientos que comparten el mismo genotipo MLVA. en gris se encuentran los aislamientos genéticamente relacionados ($STRD/SLV \leq 2$, $STRD/SLV > 2$ y < 10). En el presente análisis, donde se seleccionó aleatoriamente un pequeño número de perfiles disponibles, 76.7% de los aislamientos (perfiles alélicos) resultaron estar genéticamente relacionados entre sí; se identificaron tres complejos genéticos relacionados (CGR: A, B y C), entre tanto, los aislamientos de Costa Rica, formaron parte del complejo más grande (A). Se detectaron tres complejos clonales ($STRD/SLV \leq 2$), dispuestos dentro de círculos negros; interesantemente, los aislamientos RT078/NAP7 de Costa Rica se encontraron estrechamente relacionados con un aislamiento RT078 de origen humano de Alemania.

CAPÍTULO II

PERFILES DE MULTIRESISTENCIA EN AISLAMIENTOS DE *Clostridium difficile*, GENOTIPOS RT078/NAP7, RTFLI-CR₁ Y RT596, EN TRES GRANJAS PORCINAS DE COSTA RICA.

RESUMEN

Clostridium difficile es un patógeno asociado con el desarrollo de enfermedades intestinales en humanos y animales; en los humanos se ha reportado la asociación entre el uso de fármacos como fluoroquinolonas y clindamicina como factores de riesgo para la infección (CDI). En animales de producción, la actividad *in vitro* de los antibióticos ha sido estudiada con mucho menos amplitud que en aislamientos clínicos, y no existen puntos de corte para determinar la resistencia de bacterias anaerobias de origen veterinario y en humanos aún están en constante revisión y cambio por los organismos de referencia CLSI y EUCAST. Existe un creciente número de reportes de solapamiento entre especies y hospederos de genotipos virulentos de *C. difficile*, así como de perfiles de resistencia y multiresistencia a los antibióticos. En Costa Rica, se han caracterizado aislamientos clínicos hipervirulentos y ampliamente multiresistentes a un importante número de clases de antibióticos. En el presente trabajo, se analizaron veinte aislamientos toxigénicos y no toxigénicos de *C. difficile* y al ser tipificados molecularmente presentaron los genotipos RT078/NAP7, RT-FLI-CR₁ y RT596), provenientes de fuentes porcinas, aparentemente sanas y se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC) para diecisiete (17) antibióticos pertenecientes a diversas categorías o clases (en la epidemiología de las infecciones de *C. difficile*, CDI) por medio del método epsilométrico ETEST®. Todos los aislamientos registraron MIC por sobre los puntos de corte establecidos (resistencia), en al

menos tres clases diferentes de antibióticos (multiresistencia). Con esto se consigue generar los primeros datos de resistencia en la región de Centro América y México en aislamientos de *C. difficile* de origen veterinario productivo y detectar posibles reservorios de multiresistencia a los antimicrobianos en cepas con alto potencial epidémico mundial como RT078/NAP7.

PALABRAS CLAVE: Lechones Costa Rica, *Clostridium difficile*, MIC, Multiresistencia

ABSTRACT

Clostridium difficile is a multidrug resistant (MDR) pathogen to antibiotics, with great importance at a clinical and nosocomial level. In production animals, the *in vitro* activity of antibiotics has been studied with much less amplitude than in clinical isolates, and there is little concordance and consistency in the panels of antibiotics analyzed, as well as in the cut-off points and interpretation by CLSI and EUCAST for most of them. There is a growing number of reports of overlap between species and hosts of *C. difficile* virulent genotypes, as well as resistance and multiresistance profiles to antibiotics. In Costa Rica, a large number of classes of antibiotics have been analyzed, after the characterization of hypervirulent and widely multiresistant clinical isolations. Twenty toxigenic and non-toxigenic isolates of *C. difficile* (RT078 / NAP7, n = 4; RTFLI-CR₁, n = 6; and RT596, n = 10) from apparently healthy piglets, were analyzed against seventeen (17) antibiotics belonging to different categories/classes (in the epidemiology of *C. difficile* infections, CDI) to determine the minimum inhibitory concentration (MIC), using the ETEST® epsilometric method. All the isolates registered values over the established cut-off points (resistance), in at least three

different classes of antibiotics (multidrug resistance). With this, it is possible to generate the first resistance data in the Central American and Mexican region in isolates of *C. difficile* of productive veterinary origin and to detect possible reservoirs of multidrug resistance to antimicrobials in strains with high global epidemic potential as RT078/NAP7.

KEYWORDS: Costa Rican Piglets, *Clostridium difficile*, MIC, Multidrug resistance (MDR)

1. INTRODUCCIÓN

La resistencia a los antibióticos es un problema actual y global, donde anualmente los reportes y la complejidad de los mismos aumentan (Marston *et al.*, 2016). *C. difficile* es un enteropatógeno de importancia epidemiológica, tanto en ambientes hospitalarios como en las comunidades, donde genotipos de interés internacional (RT027/NAP1, RT078/NAP7, entre otros), muestran patrones de multiresistencia a los antibióticos (MDR) e incrementada virulencia (Knight *et al.*, 2015; Adler *et al.*, 2015). *C. difficile* posee un genoma dinámico, dónde, diversos elementos favorecen su distribución y mantenimiento en el ambiente, así como su resistencia a los antibióticos (Elliott *et al.*, 2017; Dingle *et al.*, 2014). En humanos, se ha reportado variabilidad en los perfiles de resistencia, por ello, la investigación y vigilancia son de suma importancia (Dong *et al.*, 2013).

En medicina veterinaria, el uso de los antibióticos tiene finalidades profilácticas, terapéuticas y como factores de crecimiento que favorecen la producción (Cancho Grande *et al.*, 2000); sin embargo, debido a la posibilidad de una relación entre el uso de los antibióticos y el riesgo que esto supondría en salud pública, existe un consenso activo para la disminución en el uso de los mismos, evitando así, una presión selectiva global sobre los microorganismos que podrían perjudicar al humano (Jordan *et al.*, 2009). El control sobre el uso de los antibióticos en medicina veterinaria y sistemas de producción es cada vez más necesario y supondría una valiosa herramienta epidemiológica de prevención a la resistencia farmacológica (Callens *et al.*, 2012).

El traslape genómico entre cepas hipervirulentas y hospederos humanos y animales suponen un riesgo a la salud pública, existe evidencia que sugiere que ciertos animales de compañía y los cerdos, podrían actuar como reservorios de *C. difficile* y a la vez contribuirían

a su mantenimiento y diseminación en la comunidad (Spigaglia *et al.*, 2015). Existen reportes que muestran la variabilidad en los perfiles de resistencia a los antibióticos por *C. difficile* a partir de diversas fuentes animales, siendo la resistencia a fluoroquinolonas, uno de los principales elementos de preocupación, debido a su relación con cepas de marcada virulencia y distribución (Thitaram *et al.*, 2016; Álvarez-Pérez *et al.*, 2014); sin embargo en Brasil, la mayoría de las cepas estudiadas a partir de animales y humanos, mostraron susceptibilidad aceptable a varios antibióticos: entre ellos metronidazol, vancomicina, y florfenicol, lo cual sugiere multi-causalidad en el desarrollo de la resistencia (Silva *et al.*, 2014). RT078/NAP7 (a partir de fuentes humanas y animales) ha mostrado poseer patrones de resistencia similares a otros genotipos virulentos de importancia clínica y se ha logrado establecer que, aunque moxifloxacin no es utilizada en medicina veterinaria, el uso prolongado o no controlado de fluoroquinolonas, como enrofloxacin, está asociada al desarrollo de resistencia a la misma (Keessen *et al.*, 2013).

2. METODOLOGÍA

2.1 DISEÑO DE ESTUDIO Y MUESTRA

Se realizó un ensayo para la determinación de las concentraciones inhibitorias mínimas (MIC's) en veinte aislamientos de *C. difficile* en lechones de tres fincas de producción en Costa Rica, los cuales pertenecen a los genotipos RT078/NAP7, RT-FLI-CR₁ (014/5) y RT596 (Cuadro 2, Figura 2, Capítulo 1). De las tres fincas, solo la finca publica reportó el no utilizar antibióticos como fluoroquinolonas o cefalosporinas, de forma continua como factor protector.

2.2 ANTIMICROBIANOS UTILIZADOS Y PUNTOS DE CORTE

Para el presente estudio, para la obtención de las MIC's se utilizó el método epsilométrico ETEST® para 17 antimicrobianos. La categorización de resistencia se utilizó los puntos de corte del Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2015; CLSI, 2012), cuando se encontraban disponibles, EUCAST o los utilizados en reportes previos en los demás casos (Cuadro 2). Las MICs clasificadas como “intermedias” fueron consideradas como resistencia, para efectos de este trabajo. Para análisis de estos resultados se determinó la MIC₅₀ y MIC₉₀ utilizando como criterio la concentración mínima de antibiótico en la cual el 50% y 90% de los aislamientos fueron inhibidos, respectivamente. Se estableció el criterio de multiresistencia cuando los aislamientos mostraran resistencia al menos a tres clases de antimicrobianos (Spigaglia *et al.*, 2015).

CUADRO 1. ANTIMICROBIANOS Y PUNTOS DE CORTE UTILIZADOS

ANTIBIÓTICO		PUNTO DE CORTE (µg/mL)	RANGO ANALIZADO (µg/mL)	REFERENCIA
AMOXICILINA	AC	≥8	0.016 - 256	CLSI (2015, 2017) ³
AMOXICILINA + ÁCIDO CLAVULÁNICO	XL	≥8	0.016 - 256	CLSI (2015, 2017) ³
AMPICILINA	AM	≥1	0.016 - 256	CLSI (2015, 2017) ³
CEFOTAXIME	CT	≥32	0.002 - 32	³
CIPROFLOXACINA	CI	≥4	0.002 - 32	CLSI (2015, 2017) ^{1,3}
CLINDAMICINA	CM	≥4	0.016 - 256	CLSI (2015, 2017) ³
CLORANFENICOL	CL	≥16	0.016 - 256	CLSI (2015, 2017) ³
ENROFLOXACINA	ENR	≥4	0.002 - 32	CLSI (2015, 2017) ^{1,3}
LEVOFLOXACINA	LEV	≥4	0.002 - 32	CLSI (2015, 2017) ^{1,3}
LINEZOLID	LZ	≥4	0.016 - 256	EUCAST, (v.7.0) ²
MEROPENEM	MP	≥8	0.002 - 32	CLSI (2015, 2017) ³
METRONIDAZOL	MZ	≥16	0.016 - 256	CLSI (2015, 2017) ³
MOXIFLOXACINA	MX	≥4	0.002 - 32	CLSI (2015, 2017) ^{1,3}
RIFAMPICINA	RI	≥0.004	0.002 - 32	EUCAST, (v.7.0) ²
TETRACICLINA	TC	≥8	0.016 - 256	CLSI (2015, 2017) ³
VANCOMICINA	VA	≥2	0.016 - 256	EUCAST, (v.7.0) ²

¹ Se ha utilizado el mismo criterio CLSI para moxifloxacina, (Ramírez-Vargas *et al.*, 2017; Büchler *et al.*, 2014)

² Ramírez-Vargas *et al.*, 2017; Freeman *et al.*, 2015; Erikstrup *et al.*, 2012

³ (Rodloff *et al.*, 2008)

2.3 PROCESAMIENTO

Brevemente, colonias seleccionadas de *C. difficile*, a partir de agar brucella, suplementado con vitamina K, hemina y sangre defibrinada de oveja (BAK), se inocularon en caldo BHI (caldo infusión cerebro-corazón pre-reducido) y se incubaron en anaerobiosis por 24 horas; inóculos, a partir de cultivos en BHI, fueron preparados en placas de BAK, por extensión, siendo incubados por 48 horas de acuerdo a instrucciones del fabricante. Se utilizaron tiras ETEST® (AB Biodisk-bioMerieux, Inc., Solna, Sweden) con los antimicrobianos seleccionados. Cepa de referencia ATCC 700057 *C. difficile*, fue utilizada como control. La lectura de MIC's se realizó 48 horas posterior a incubación, utilizando los criterios CLSI, EUCAST y otros (Cuadro 2).

3. RESULTADOS

Se analizaron 20 aislamientos de *C. difficile*, provenientes de hisopados rectales en lechones de 3 fincas de producción porcina en Costa Rica (Cuadro 1). El resumen del rango de MIC's, MIC₅₀, MIC₉₀ se muestran a continuación en el Cuadro 3; (%) de resistencia se muestra en el Gráfico 1.

CUADRO 2. DISTRIBUCIÓN DE RANGOS MICs, MIC₅₀, MIC₉₀ DE AISLAMIENTOS PORCINOS RT078/NAP7, RTFLI-CR₁ Y RT596

AISLAMIENTOS (GENOTIPOS)									
		MZ	VA	MX	ENR	CI	LEV	TC	LZ
	MIC RANGO (µg/mL)	0.125 – 0.75	0.25 – 0.75	0.5 – >32	>32	>32	3 – >32	0.064 – 64	2 – 3
	MIC ₅₀	0.38	0.5	0.75	>32	>32	12	0.190	2
MIC ₉₀	0.75	0.5	>32	>32	>32	>32	64	2	
	CM	AM	XL	AC	CL	RI	MP	CT	
MIC RANGO (µg/mL)	6 – 32	0.38 – 3	0.19 – 1.5	0.38 – 0.75	2 – 32	0.002 – 0.004	0.38 – 1	>32	
MIC ₅₀	8	1.5	0.75	0.50	8	0.002	0.75	>32	
MIC ₉₀	16	2	1	0.75	24	0.002	1	>32	

MZ: METRONIDAZOL; VA: VANCOMICINA; MX: MOXIFLOXACINA; ENR: ENROFLOXACINA; CI: CIPROFLOXACINA; LEV: LEVOFLOXACINA
 TC: TETRACICLINA; LZ: LINEZOLID; CM: CLINDAMICINA; AM: AMPICILINA; XL: AMOXICILINA + ÁCIDO CLAVULÁNICO; AC: AMOXICILINA
 CL: CLORANFENICOL; RI: RIFAMPICINA; MP: MEROPENEM; CT: CEFOTAXIME

* RT 014/5 Webribo (www.webribo.ages.at)

Cloranfenicol y ampicilina mostraron actividad inhibitoria *in vitro* reducida, con porcentajes de resistencia de 70% y 65% (MIC₉₀ 24 y 2 µg/mL), respectivamente. Se registró resistencia completa a Levofloxacin, en todos los aislamientos toxigénicos (MIC_{rango} ≥32 µg/mL), y resistencia en 90% de los aislamientos no toxigénicos (MIC_{rango} 3-12 µg/mL). Para moxifloxacin se obtuvo una actividad *in vitro* particular en todos aquellos aislamientos no toxigénicos, registrándose un MIC_{Rango} 0.5-0.75 µg/mL; no obstante, en aquellos

aislamientos provenientes de fincas privadas, *C. difficile* mostró resistencia completa (MIC ≥ 32), sin importar su genotipo.

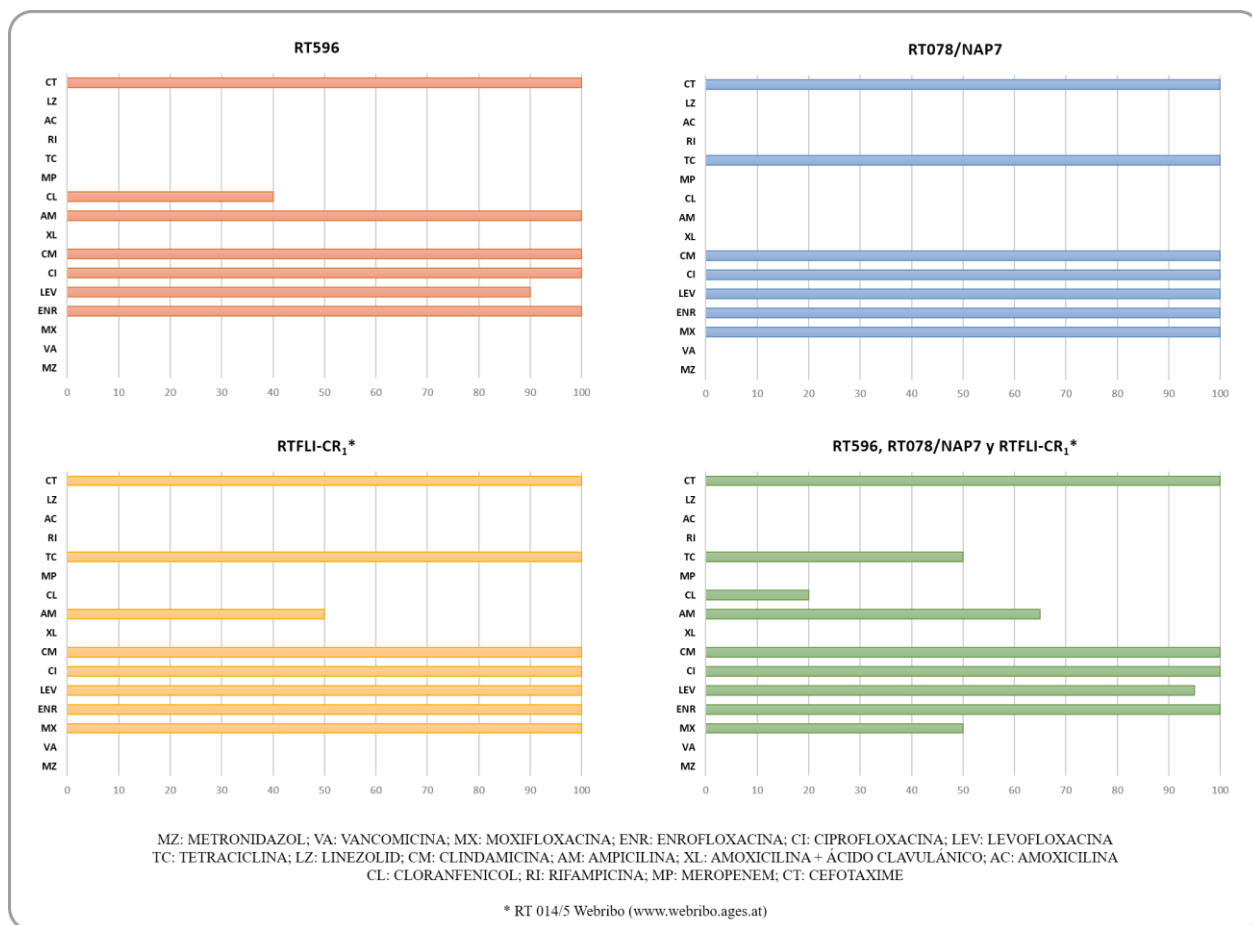


FIGURA 1. PORCENTAJE DE RESISTENCIA ENTRE GENOTIPOS RT596, RT078/NAP7 Y RTFLI-CR₁ DE *C. difficile* AISLADOS A PARTIR DE PORCINOS EN COSTA RICA.

El 100% de los aislamientos fueron resistentes para enrofloxacina, ciprofloxacina, clindamicina y cefotaxime. Por otro lado, fueron todos sensibles al metronidazol, vancomicina, amoxicilina/ácido clavulánico, amoxicilina, meropenem, linezolid y rifampicina, lo anterior sin importar si se trataba de aislamientos toxigénicos o no.

Finalmente, se registraron los perfiles de multiresistencia encontrados, los mismos son detallados en el Cuadro 4. En total, todos los aislamientos analizados en el presente estudio, mostraron resistencia combinada al menos a tres (3) clases de antimicrobianos diferentes. De los aislamientos toxigénicos, RT078/NAP7 registró un (1) patrón de multiresistencia, con cuatro aislamientos; por su parte, RTFLI-CR₁ registró dos (2) patrones de multiresistencia

con seis (6) aislamientos. RT596 mostró diversidad en los patrones de multiresistencia, registrando cuatro (4) perfiles con diez (10) aislamientos. Sorprendentemente, RTFLI-CR₁ (toxigénico) y RT596 (no toxigénico), contabilizaron perfiles de resistencia a la combinación de cinco (5) diferentes tipos de antimicrobianos (Cuadro 4). El análisis de similitud mostró claramente una agrupación categórica en dos *clústeres*, coincidentes con sus características fenotípicas (toxigénicos/no toxigénicos; Figura 1).

CUADRO 3. PERFILES DE MULTIRESISTENCIA PARA 17 ANTIMICROBIANOS DETERMINADOS EN AISLAMIENTOS PORCINOS DE *C. difficile*.

PERFILES DE RESISTENCIA	# CLASES	RT078/NAP7	RTFLI-CR ₁	RT596	AISLAMIENTOS
ENR/CI+CM+AM+CL+CT	5	0	0	1	1
ENR/LEV/CI+CM+AM+CL+CT	5	0	0	3	3
ENR/LEV/CI+CM+AM+TC+CT	5	0	3	0	2
ENR/LEV/CI+CM+AM+CT	4	0	0	3	3
ENR/LEV/CI+CM+TC+CT	4	4	3	0	7
ENR/LEV/CI+AM+CT	3	0	0	3	3

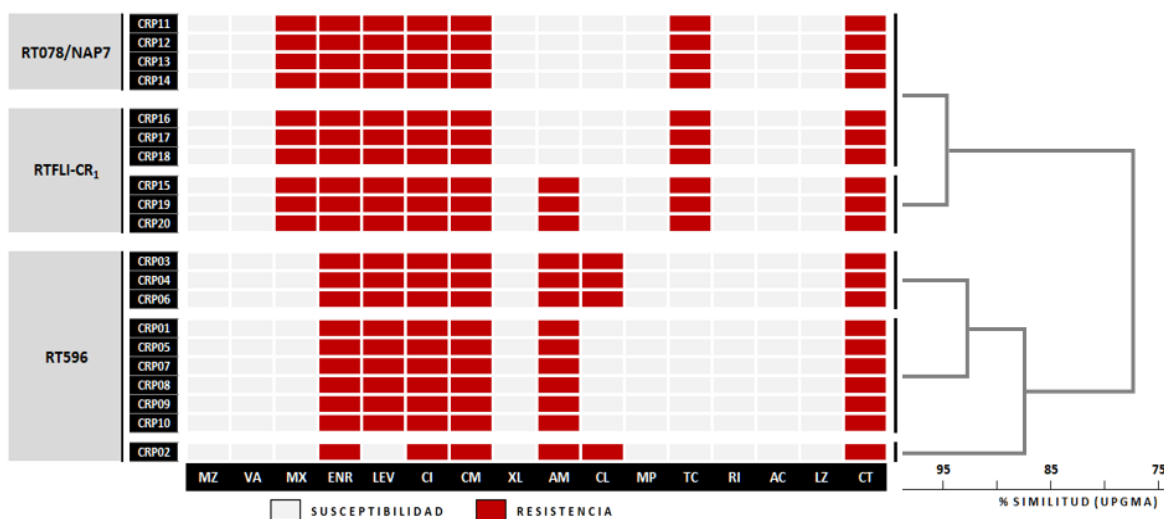


FIGURA 2. DISTRIBUCIÓN Y SIMILITUD DE PERFILES DE MULTIRESISTENCIA. Las MIC's obtenidas mediante ETEST® fueron convertidas a datos binomiales (Susceptibilidad o Resistencia). Se utilizó Algoritmo UPGMA, coeficiente Dice, para el análisis de *Clusters*; todos los aislamientos mostraron similitud >83% entre grupos (aislamientos toxigénicos y no toxigénicos).

4. DISCUSIÓN

La resistencia a los antibióticos constituye uno de los principales desafíos en el tratamiento y manejo de las enfermedades de etiología bacteriana, donde complejos mecanismos moleculares y bioquímicos han sido ampliamente descritos (Blair *et al.*, 2015). La interacción e implicación en el uso de los antibióticos en la epidemiología de *C. difficile*, junto a la emergencia de multiresistencia a los mismos, constituyen importantes elementos de estudio, que motivan la investigación y monitoreo de su actividad *in vitro* (Baines y Wilcox, 2015). El presente estudio constituye el primer reporte de evaluación de la actividad *in vitro* a los antibióticos, en aislamientos de *C. difficile* de origen porcino en la región de Centro América y México. Todos los genotipos/aislamientos analizados (RT078/NAP7, RTFLI-CR₁ (RT014/5) y RT596) mostraron resistencia al menos a tres clases de antimicrobianos.

Metronidazol y vancomicina, ambos utilizados como tratamientos de elección en casos de infección por *C. difficile* “CDI” (Curry, 2017), mostraron una MIC₉₀ de 0.75 y 0.5 µg/mL, respectivamente; Ninguno de los aislamientos analizados mostró resistencia, lo que concuerda con reportes previamente realizados en humanos, animales y plantas de producción cárnica (Wu *et al.*, 2017; Knight *et al.*, 2015; Brazier *et al.*, 2008); metronidazol y vancomicina no son utilizados en medicina veterinaria (Shaban *et al.*, 2014; Weese, 2008), no obstante, humanos, animales y sistemas de producción se encuentran en contacto constante: un estudio que utilizó secuenciación de genoma completo, demostró la transmisión inter-especie, aunque no se descarta la posibilidad de una fuente de infección común (Knetsch *et al.*, 2015). Se han reportado MIC de >256 µg/mL de metronidazol y MIC 256 µg/mL de vancomicina, en estudios de aislamientos humanos y veterinarios RT078 (Andrés-

Lasheras *et al.*, 2017; Álvarez-Pérez *et al.*, 2017; Thitaram *et al.*, 2016); también existen muy pocos estudios que reportan susceptibilidad disminuida o resistencia a ambos (Adler *et al.*, 2015; Starr, 2005).

Amoxicilina y amoxicilina/ácido clavulánico, son utilizados en medicina veterinaria para el tratamiento de diversos patógenos (Jong *et al.*, 2014), aunque al parecer con menor frecuencia en infecciones causadas por clostridios (Giguère *et al.*, 2013), Amoxicilina, registró una MIC_{máx} de 0.75 µg/mL, en dos reportes donde se analizó la actividad in vitro frente a aislamientos RT078, las MIC's reportadas fueron entre 0.25 – 0.38 µg/mL, su resistencia en aislamientos de *C. difficile* de origen animal (tipo productivo o silvestre en cautiverio) no ha sido reportada (Álvarez-Pérez *et al.*, 2014; Keessen *et al.*, 2013), lo anterior podría deberse al uso limitado, tanto de amoxicilina como de amoxicilina/ácido clavulánico, en los estudios dirigidos a *C. difficile* de origen porcino (Anexo 1). La resistencia a amoxicilina/ácido clavulánico, ha sido reportada en un estudio amplio realizado en Estados Unidos entre aislamientos provenientes de animales de producción (Thitaram *et al.*, 2016). Sin embargo en múltiples publicaciones (aislamientos de origen clínico y veterinario) sus MIC's se registraron en un rango de 0.64 – 5 µg/mL (Knight y Riley, 2016; Knight *et al.*, 2016; Knight *et al.*, 2015; Pirš *et al.*, 2013), lo cual coincide con nuestros hallazgos (MIC_{rango} 0.19-1.5 µg/mL). Se ha señalado que el uso de amoxicilina/ácido clavulánico puede estar asociado a cuadros gastrointestinales severos y al desarrollo de CDI (Grayson, 2010), más aún, un estudio reciente vinculó el uso de ciertos antimicrobianos, entre ellos amoxicilina/ácido clavulánico, con el desarrollo de CDI y mortalidad (Zycinska *et al.*, 2016), entre tanto, otro estudio reveló una relación entre la disminución de su prescripción y el desarrollo de CDI comunitario (Dantes *et al.*, 2015). En Costa Rica, un caso por CDI de

origen comunitario ha sido reportado, sin embargo, el genotipo responsable fue RT027/NAP1, donde se registró susceptibilidad al mismo; por lo tanto, nuestros resultados podrían sugerir presión selectiva mínima dirigida al desarrollo de resistencia a este fármaco.

MIC's elevadas (>32 y $64 \mu\text{g/mL}$) han sido reportadas para meropenem en aislamientos de origen clínico y veterinario (Knight *et al.*, 2015; Freeman *et al.*, 2015; Keessen *et al.*, 2013). En el presente estudio se reportaron MIC's $\leq 1 \mu\text{g/mL}$, lo cual representa valores inferiores a los reportados en estudios similares (Moono *et al.*, 2016b; Knight y Riley, 2016; Knight *et al.*, 2016; Knight *et al.*, 2015; Álvarez-Pérez *et al.*, 2014; Pirš *et al.*, 2013).

Rifampicina mostró una potente actividad *in vitro* frente a los aislamientos analizados, sin resistencia (MIC₉₀ $0.002 \mu\text{g/mL}$) y con resultados consistentes y concordantes con reportes previos (Álvarez-Pérez *et al.*, 2017; Álvarez-Pérez *et al.*, 2014) (Knight y Riley, 2016; Keessen *et al.*, 2013). Rifampicina, fármaco utilizado para el tratamiento de CDI reincidente ha reportado MIC's elevadas con un MIC_{rango} entre >16 y $>32 \mu\text{g/mL}$ (Thitaram *et al.*, 2016; Spigaglia *et al.*, 2015; Freeman *et al.*, 2015). En Costa Rica, los genotipos con virulencia incrementada NAP_{CR} y NAP_{CR1} han registrado MIC's entre $>32 - 256 \mu\text{g/mL}$ (Ramírez-Vargas *et al.*, 2017) en aislamientos clínicos, lo que resulta totalmente opuesto a nuestros hallazgos.

Resistencia a cloranfenicol ha sido reportado en aislamientos hipervirulentos en Costa Rica (Ramírez-Vargas *et al.*, 2017), con MIC_{rango} entre 64 y $>256 \mu\text{g/mL}$, similares a un estudio de aislamientos clínicos en Europa (Freeman *et al.*, 2015). En el presente estudio el MIC_{rango} fue entre 2 y $32 \mu\text{g/mL}$, reportándose resistencia en 70% (MIC ≥ 16) de los aislamientos, interesantemente, siendo todos ellos no toxigénicos. A pesar que existen

publicaciones que demuestran el uso beneficioso de *C. difficile* no toxigénico como factor protector contra CDI (Natarajan *et al.*, 2013), se ha demostrado, *in vitro*, la transferencia de genes para la producción de toxinas por parte de cepas no toxigénicas (Brouwer *et al.*, 2013), así como la transferencia de genes y elementos de resistencia entre cepas (Peng *et al.*, 2017). Nuestros resultados sugieren que *C. difficile* podría utilizar la colonización asintomática en lechones como un reservorio de elementos de resistencia.

Trece aislamientos, RT596, RT078/NAP7 y RTFLI-CR₁, mostraron resistencia a Ampicilina, con MIC ≥ 1 $\mu\text{g/mL}$; Entre tanto, MIC's >256 $\mu\text{g/mL}$ han sido reportadas en aislamientos de origen veterinario productivo (Thitaram *et al.*, 2016). Un estudio reciente en Brasil, registró MIC_{rango} entre 0.25 y 2 $\mu\text{g/mL}$ y otro, en Estados Unidos, reportó resistencia (MIC ≥ 2 $\mu\text{g/mL}$), entre aislamientos de origen veterinario y humano; ambos estudios mostraron resultados coincidentes con los nuestros (MIC_{rango} 0.38 – 3 $\mu\text{g/mL}$); ampicilina ha sido descrito como factor de riesgo para el desarrollo de CDI (Thitaram *et al.*, 2016), un estudio reportó como ampicilina puede favorecer y aumentar la transcripción de factores de colonización (Denève *et al.*, 2008); nuevamente, la resistencia en los aislamientos podría estar vinculada a la presión selectiva y a las prácticas de manejo.

Se ha reportado resistencia a cefalosporinas (ceftriaxona) en animales y humanos (Knight *et al.*, 2016; Knight *et al.*, 2015). En general, resistencia o susceptibilidad reducida se ha reportado en la actividad *in vitro* a Ceftriaxona, cefuroxime y cefoxitina, con un MIC_{max} de >256 $\mu\text{g/mL}$ (Anexo 1). Se registró MIC₉₀ de >32 $\mu\text{g/mL}$ para cefotaxime, interpretándose como resistencia a todos aquellos valores de MIC que sean categorizados como intermedios (CLSI, 2017; Rodloff *et al.*, 2008), en todos los aislamientos analizados; interesantemente,

se registró susceptibilidad a cefalotina, con MIC_{rango} 6 – 16 µg/mL, en todos los aislamientos no toxigénicos RT596 (datos no incluidos).

La resistencia a fluoroquinolonas (MIC >32 µg/mL), en aislamientos clínicos y veterinarios, ha sido ampliamente documentada (Knight y Riley, 2016; Tickler *et al.*, 2014; Norman *et al.*, 2014; Keessen *et al.*, 2013). Más importante aún, resistencia y MIC's elevadas para fluoroquinolonas, han sido características de cepas con virulencia aumentada como RT027/NAP1 (Spigaglia, 2016; Moono *et al.*, 2016a). En Costa Rica, se han registrado MIC >256 µg/mL para levofloxacina y ciprofloxacina en aislamientos clínicos; similares resultados (MIC_{max} >64 y >128 µg/mL), se obtuvieron en un estudio reciente (Usui *et al.*, 2014), que comparó la actividad *in vitro* de ciprofloxacina en aislamientos, entre ellos RT078, de origen clínico y veterinario. En el presente estudio, se registró resistencia completa (MIC ≥32 µg/mL) a enrofloxacin y ciprofloxacina en todos los aislamientos toxigénicos y no toxigénicos, siendo el primero, uno de los antibióticos con mayor uso en el tratamiento de diversas enfermedades de etiología bacteriana en medicina veterinaria (Jordan *et al.*, 2009). La resistencia a ciprofloxacina, a partir de aislamientos veterinarios, ha sido previamente reportado, sobre todo en poblaciones muy jóvenes (Norman *et al.*, 2014).

Levofloxacina y moxifloxacina registraron resistencia por parte de los aislamientos toxigénicos RT078/NAP7 y RTFLI-CR₁ (MIC's ≥32 µg/mL), un estudio reciente reportó resistencia a estos dos antimicrobianos, tanto en cepas de origen clínico como veterinario (Álvarez-Pérez *et al.*, 2017). En general, la resistencia a fluoroquinolonas (al menos a dos) fue registrada en todos los aislamientos analizados; a nuestro conocimiento, la resistencia de *C. difficile* a enrofloxacin, a partir de aislamientos porcinos (veterinarios), es reportada por primera vez en la región de México y Centro América en la presente investigación. Es

importante señalar que se han publicado múltiples reportes de susceptibilidad a Moxifloxacin en aislamientos de origen veterinario productivo (Anexo 1), en comparación a otras fluroquinolonas como: ciprofloxacina, enrofloxacin o levofloxacin, lo que podría en algún momento desestimar la importancia de la vigilancia y monitoreo de su actividad *in vitro*, considerando que se ha señalado a los animales como posible reservorio de resistencia a los antimicrobianos (Argudín *et al.*, 2017).

Aunque los genotipos detectados (a excepción de RT078/NAP7), no han sido reportados o detectados en el país o en la región de México y Centro América, es necesario recordar que RT078 es un genotipo de alto potencial virulento y responsable de brotes en Europa (Moono *et al.*, 2016a; Aboutaleb *et al.*, 2014); y que los aislamientos de origen porcino en Costa Rica, con el mismo genotipo, mostraron tener relación genómica con aislamientos de Europa (Anexo 3, Capítulo 1), lo que aumenta su interés epidemiológico debido a la evidencia de sus posibles implicaciones zoonóticas y comunitarias. Los aislamientos no toxigénicos, como el RT596, que rara vez son ampliamente caracterizados a nivel molecular y bioquímico, registraron cuatro patrones de multiresistencia, y podría implicar que los animales de producción son posibles reservorios de *C. difficile* en Costa Rica, y más aún, de amplia resistencia a los antibióticos, lo que contribuye significativamente al entendimiento de la dinámica epidemiológica del patógeno y de sus posibles implicaciones en salud pública.

5. CONCLUSIONES

- *Clostridium difficile* toxigénicos de los genotipos RT078/NAP7, RTFLI-CR₁ y no toxigénico RT596, aislados a partir de lechones aparentemente sanos, mostraron múltiple resistencia a los antimicrobianos.
- En general, las MIC's registradas en la mayoría de los antimicrobianos analizados son de importancia en el contexto epidemiológico de *C. difficile* a nivel hospitalario humano, considerando la resistencia y MIC's elevadas en fluoroquinolonas y la aparente resistencia *in vitro* de cefotaxime (cefalosporina).
- No existe una consistencia en los paneles de antimicrobianos analizados entre aislamientos de origen veterinario y clínico, más aun, cuando no existen puntos de corte establecidos por CLSI para la mayoría de los mismos.
- En comparación con aislamientos de virulencia aumentada (NAP1 y NAP_{CR1}) de origen clínico en Costa Rica, las MIC's registradas son inferiores; lo anterior podría entonces, obedecer a la presión selectiva que ejercen los ambientes clínico-hospitalarios y a la dinámica comunitaria – productiva, en el desarrollo de la evolución patogénica y epidemiológica de *C. difficile* en el país.

6. RECOMENDACIONES

- El potencial virulento de RT078/NAP7 ha sido ampliamente en reportes a nivel mundial, y aunque dicho genotipo ha sido registrado solamente en un caso hospitalario en el país, la evidencia de las posibles implicaciones zoonóticas y comunitarias del mismo hacen necesaria su investigación y consideración.
- Debido a las MIC's y patrones de multiresistencia registrados, es necesaria la investigación para la búsqueda y caracterización de genes y elementos de resistencia.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Aboutaleb, N., Kuijper, E., y van Dissel, J. (2014). Emerging infectious colitis. *Current Opinion in Gastroenterology*, 30(1), 106–115.
- Adler, A., Miller-Roll, T., Bradenstein, R., Block, C., Mendelson, B., Parizade, M., . . . y Schwaber, M. (2015). A national survey of the molecular epidemiology of *Clostridium difficile* in Israel: The dissemination of the ribotype 027 strain with reduced susceptibility to vancomycin and metronidazole. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 83(1), 21–24.
- Álvarez-Pérez, S., Blanco, J., Harmanus, C., Kuijper, E., y García, M. (2017). Subtyping and antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* PCR ribotype 078/126 isolates of human and animal origin. *Veterinary Microbiology*, 199, 15–22.
- Álvarez-Pérez, S., Blanco, J., Martínez-Nevado, E., Peláez, T., Harmanus, C., Kuijper, E., y García, M. (2014). Shedding of *Clostridium difficile* PCR ribotype 078 by zoo animals, and report of an unstable metronidazole-resistant isolate from a zebra foal (*Equus quagga burchellii*). *Veterinary Microbiology*, 169(3-4), 218–222.
- Andrés-Lasheras, S., Bolea, R., Mainar-Jaime, R., Kuijper, E., Sevilla, E., Martín-Burriel, I., y Chirino-Trejo, M. (2017). Presence of *Clostridium difficile* in pig faecal samples and wild animal species associated with pig farms. *Journal of applied microbiology*, 122(2), 462–472.
- Argudín, M., Deplano, A., Meghraoui, A., Dodémont, M., Heinrichs, A., Denis, O., . . . y Roisin, S. (2017). Bacteria from Animals as a Pool of Antimicrobial Resistance Genes. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 6(2).
- Baines, S. y Wilcox, M. (2015). Antimicrobial Resistance and Reduced Susceptibility in *Clostridium difficile*: Potential Consequences for Induction, Treatment, and Recurrence of *C. difficile* Infection. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 4(3), 267–298.

- Blair, J., Webber, M., Baylay, A., Ogbolu, D., y Piddock, L. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature reviews. Microbiology*, *13*(1), 42–51.
- Brazier, J., Raybould, R., Patel, B., Duckworth, G., Pearson, A., Charlett, A.,. . . y HPA Regional Microbiology Network. (2008). Distribution and antimicrobial susceptibility patterns of *Clostridium difficile* PCR ribotypes in English hospitals, 2007-08. *Euro Surveill*, *13*(41).
- Brouwer, M., Roberts, A., Hussain, H., Williams, R., Allan, E., y Mullany, P. (2013). Horizontal gene transfer converts non-toxigenic *Clostridium difficile* strains into toxin producers. *Nature communications*, *4*, 2601.
- Büchler, A. C., Rampini, S. K., Stelling, S., Ledergerber, B., Peter, S., Schweiger, A.,. . . y Speck, R. F. (2014). Antibiotic susceptibility of *Clostridium difficile* is similar worldwide over two decades despite widespread use of broad-spectrum antibiotics: an analysis done at the University Hospital of Zurich. *BMC Infectious Diseases*, *14*(607), 1–9.
- Callens, B., Persoons, D., Maes, D., Laenen, M., Postma, M., Boyen, F.,. . . y Dewulf, J. (2012). Prophylactic and metaphylactic antimicrobial use in Belgian fattening pig herds. *Preventive veterinary medicine*, *106*(1), 53–62.
- Cancho Grande, B., García Falcón, M. S., Simal Gándara, y J. (2000). El uso de los antibióticos en la alimentación animal: perspectiva actual. *Ciencia y tecnología alimentaria*, *3*(1), 39–47.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S27: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Seventh Informational Supplement, 2017. United States.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S25: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement, 2015. United States.

- Clinical and Laboratory Standards Institute. M11-A8: Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria, 2012. United States.
- Curry, S. (2017). Clostridium difficile. *Clinics in laboratory medicine*, 37(2), 341–369.
- Dantes, R., Mu, Y., Hicks, L., Cohen, J., Bamberg, W., Beldavs, Z., . . . y Lessa, F. (2015). Association Between Outpatient Antibiotic Prescribing Practices and Community-Associated Clostridium difficile Infection. *Open forum infectious diseases*, 2(3), ofv113.
- Denève, C., Deloménie, C., Barc, M.-C., Collignon, A., y Janoir, C. (2008). Antibiotics involved in Clostridium difficile-associated disease increase colonization factor gene expression. *Journal of Medical Microbiology*, 57(Pt 6), 732–738.
- Dingle, K., Elliott, B., Robinson, E., Griffiths, D., Eyre, D., Stoesser, N., . . . y Didelot, X. (2014). Evolutionary history of the Clostridium difficile pathogenicity locus. *Genome biology and evolution*, 6(1), 36–52.
- Dong, D., Zhang, L., Chen, X., Jiang, C., Yu, B., Wang, X., y Peng, Y. (2013). Antimicrobial susceptibility and resistance mechanisms of clinical Clostridium difficile from a Chinese tertiary hospital. *International journal of antimicrobial agents*, 41(1), 80–84.
- Elliott, B., Androga, G., Knight, D., y Riley, T. (2017). Clostridium difficile infection: Evolution, phylogeny and molecular epidemiology. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 49, 1–11.
- Erikstrup, L., Danielsen, T., Hall, V., Olsen, K., Kristensen, B., Kahlmeter, G., . . . y Justesen, U. (2012). Antimicrobial susceptibility testing of Clostridium difficile using EUCAST epidemiological cut-off values and disk diffusion correlates. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(8), E266-72.
- Freeman, J., Vernon, J., Morris, K., Nicholson, S., Todhunter, S., Longshaw, C., y Wilcox, M. (2015). Pan-European longitudinal surveillance of antibiotic resistance among prevalent Clostridium difficile ribotypes. *Clinical microbiology and infection : the*

official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 21(3), 248.e9-248.e16.

- Giguère, S., Prescott, J., y Dowling, P. (2013). *Antimicrobial therapy in veterinary medicine* (5th ed.). Ames Iowa USA: Wiley Blackwell.
- Grayson, L. (2010). *Kucers' The Use of Antibiotics: A Clinical Review of Antibacterial, Antifungal and Antiviral Drugs. Sixth Edition* (Vol. 1). United States: CRC Press.
- Jong, A. de, Thomas, V., Simjee, S., Moyaert, H., El Garch, F., Maher, K., . . . y Vallé, M. (2014). Antimicrobial susceptibility monitoring of respiratory tract pathogens isolated from diseased cattle and pigs across Europe: The VetPath study. *Veterinary Microbiology*, 172(1-2), 202–215.
- Jordan, D., Chin, J., Fahy, V., Barton, M., Smith, M., y Trott, D. (2009). Antimicrobial use in the Australian pig industry: Results of a national survey. *Australian veterinary journal*, 87(6), 222–229.
- Keessen, E., Hengsgens, M., Spigaglia, P., Barbanti, F., Sanders, I., Kuijper, E., y Lipman, L. (2013). Antimicrobial susceptibility profiles of human and piglet *Clostridium difficile* PCR-ribotype 078. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 2, 14.
- Knetsch, C., Connor, T., Mutreja, A., van Dorp, S., Sanders, I., Browne, H., . . . y Lawley, T. (2015). Whole genome sequencing reveals potential spread of *Clostridium difficile* between humans and farm animals in the Netherlands, 2002 to 2011. *Euro Surveil*, 45(19).
- Knight, D., Giglio, S., Huntington, P., Korman, T., Kotsanas, D., Moore, C., . . . y Riley, T. (2015). Surveillance for antimicrobial resistance in Australian isolates of *Clostridium difficile*, 2013-14. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 70(11), 2992–2999.
- Knight, D. y Riley, T. (2016). *Clostridium difficile* clade 5 in Australia: Antimicrobial susceptibility profiling of PCR ribotypes of human and animal origin. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 71(8), 2213–2217.

- Knight, D., Squire, M., Collins, D., y Riley, T. (2016). Genome Analysis of *Clostridium difficile* PCR Ribotype 014 Lineage in Australian Pigs and Humans Reveals a Diverse Genetic Repertoire and Signatures of Long-Range Interspecies Transmission. *Frontiers in Microbiology*, 7, 2138.
- Marston, H., Dixon, D., Knisely, J., Palmore, T., y Fauci, A. (2016). Antimicrobial Resistance. *Journal of American Medical Association*, 316(11), 1193–1204.
- Moono, P., Foster, N., Hampson, D., Knight, D., Bloomfield, L., y Riley, T. (2016a). *Clostridium difficile* Infection in Production Animals and Avian Species: A Review. *Foodborne Pathogens and Disease*, 13(12), 647–655.
- Moono, P., Putsathit, P., Knight, D., Squire, M., Hampson, D., Foster, F., y Riley, T. (2016b). Persistence of *Clostridium difficile* RT 237 infection in a Western Australian piggyery. *Anaerobe*, 37(2016), 62–66.
- Natarajan, M., Walk, S., Young, V., y Aronoff, D. (2013). A clinical and epidemiological review of non-toxigenic *Clostridium difficile*. *Anaerobe*, 22, 1–5.
- Norman, K., Scott, H., Harvey, R., Norby, B., y Hume, M. (2014). Comparison of antimicrobial susceptibility among *Clostridium difficile* isolated from an integrated human and swine population in Texas. *Foodborne Pathogens and Disease*, 11(4), 257–264.
- Peng, Z., Jin, D., Kim, H., Stratton, C., Wu, B., Tang, Y.-W., y Sun, X. (2017). Update on Antimicrobial Resistance in *Clostridium difficile*: Resistance Mechanisms and Antimicrobial Susceptibility Testing. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(7), 1998–2008.
- Pirš, T., Avberšek, J., Zdovc, I., Krt, B., Andlovic, A., Lejko-Zupanc, T., . . . y Ocepek, M. (2013). Antimicrobial susceptibility of animal and human isolates of *Clostridium difficile* by broth microdilution. *Journal of Medical Microbiology*, 62(Pt 9), 1478–1485.
- Ramírez-Vargas, G., Quesada-Gómez, C., Acuña-Amador, L., López-Ureña, D., Murillo, T., Del Mar Gamboa-Coronado, M., . . . y Rodríguez, C. (2017). A *Clostridium difficile*

- Lineage Endemic to Costa Rican Hospitals Is Multidrug Resistant by Acquisition of Chromosomal Mutations and Novel Mobile Genetic Elements. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61(4).
- Rodloff, A., Bauer, T., Ewig, S., Kujath, P., y Müller, E. (2008). Susceptible, intermediate, and resistant - the intensity of antibiotic action. *Deutsches Arzteblatt international*, 105(39), 657–662.
- Shaban, R. Z., Simon, G., Trott, D., Turnidge, J., y Jordan, D. (2014). *Surveillance and reporting of antimicrobial resistance and antibiotic usage in animals and agriculture in Australia*. Department of Agriculture, Griffith University and University of Adelaide of Australia.
- Silva, R., Oliveira, C., Diniz, A., Alves, G., Carvalho-Guedes, R., Vilela, E., y Lobato, F. (2014). Antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* isolated from animals and humans in Brazil. *Ciência Rural*, 44(5), 841–846.
- Spigaglia, P. (2016). Recent advances in the understanding of antibiotic resistance in *Clostridium difficile* infection. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*, 3(1), 23–42.
- Spigaglia, P., Drigo, I., Barbanti, F., Mastrantonio, P., Bano, L., Bacchin, C., . . . y Agnoletti, F. (2015). Antibiotic resistance patterns and PCR-ribotyping of *Clostridium difficile* strains isolated from swine and dogs in Italy. *Anaerobe*, 31(2015), 42–46.
- Starr, J. (2005). *Clostridium difficile* associated diarrhoea: Diagnosis and treatment. *BMJ (Clinical research ed.)*, 331(7515), 498–501.
- Thitaram, S., Frank, J., Siragusa, G., Bailey, J., Dargatz, D., Lombard, J., . . . y Fedorka-Cray, P. (2016). Antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* isolated from food animals on farms. *International journal of food microbiology*, 227, 1–5.
- Tickler, I., Goering, R., Whitmore, J., Lynn, A., Persing, D., y Tenover, F. (2014). Strain types and antimicrobial resistance patterns of *Clostridium difficile* isolates from the United States, 2011 to 2013. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58(7), 4214–4218.

- Usui, M., Nanbu, Y., Oka, K., Takahashi, M., Inamatsu, T., Asai, T., . . . y Tamura, Y. (2014). Genetic relatedness between Japanese and European isolates of *Clostridium difficile* originating from piglets and their risk associated with human health. *Frontiers in Microbiology*, 5(513), 1–8.
- Weese, J. (2008). Issues regarding the use of vancomycin in companion animals. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 233(4), 565–567.
- Wu, Y.-C., Chen, C.-M., Kuo, C.-J., Lee, J.-J., Chen, P.-C., Chang, Y.-C., y Chen, T.-H. (2017). Prevalence and molecular characterization of *Clostridium difficile* isolates from a pig slaughterhouse, pork, and humans in Taiwan. *International journal of food microbiology*, 242, 37–44.
- Zycinska, K., Chmielewska, M., Lenartowicz, B., Hadzik-Blaszczyk, M., Cieplak, M., Kur, Z., . . . y Wardyn, K. (2016). Antibiotic Treatment of Hospitalized Patients with Pneumonia Complicated by *Clostridium Difficile* Infection. *Advances in Experimental Medicine and Biology*.

ANEXO 1. ESTUDIOS Y LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN RECIENTES EN *Clostridium Difficile* (VETERINARIO Y MIXTO)

#	LÍNEA DE INVESTIGACIÓN	CRITERIO	MZ	VA	MX	ENR	LEV	Q	OM	XL	AM	CL	MP	TC	RI	AC	LZ	CT*	
1	RT014/20 ANIMALES	RANGOS		0.38->256					1.5->256										
2	CLAD05 RT237 UNAJERT078	RANGOS	0.25-1	1	1				0.25-4	0.12-0.25			0.25-2	0.12				8	
3	HUMANO HOSPITALARIO	RANGOS	0.094-0.25	1-8.0					>32									>256	
	LINAFERT078 TOXIGÉNICO PORCINO	RANGOS	0.25-0.75	0.38-0.5	2.0-32														
4	NOTOXIGÉNICO PORCINO	RANGOS	0.38-1	0.25-0.38	1-1.5														
	NOTOXIGÉNICO HUMANO	RANGOS	0.25	0.25	1.5														
	TOXIGÉNICO HUMANO	RANGOS	32	0.25	0.25														
5	RT014/020; 078, ETC CERDOS Y FERROS	RANGOS	0.016->256	0.125-1	0.19->32				0.023->256						0.002->32				
6	PORCINO	MIC ₉₀	0.38	1							1.5			4					
7	RT078 ZEBRA Y ZOO	MIC	>256	0.75	2				>32	>32	0.38-1.5		1.5-8		0.004	0.38	2		
8	DIVERSOS RT'S HUMANO	RANGOS	0.125-8	0.125-16	0.125->64				0.125->64			2-256	0.125->64	0.03-1	0.001->16				
9	RT078 PORCINO	MIC ₉₀			8				>32	2			>32	8		0.25		>256**	
10	CLAD05 RT078, OTROS	HUMANO RANGOS	0.12-1	0.5-2	0.5-16				0.12->32	0.12-0.5			0.5-2	0.06-32				8.0-64	
		PORCINO RANGOS	0.12-1		0.5-1				0.12-4					0.06-16					8.0-32
		NAPCR1-58 RANGOS	0.25	0.75-1	>32				>32->256	>256		64->256		1.0-64	>128			6.0-8	
11	HUMANO HOSPITALARIO	NAPCR1-48 RANGOS	<0.25-2	0.125-4	16->32				8->256			64->256		32-96	0.125-128			6.0-8	
		NAPCR-47 RANGOS	<0.25-1	0.75-2	16->32				>256			128->256		64	>32-256			1.0-8	
12	MIXTO BRASIL PORCINO Y HUMANO	RANGOS	0.25-2	0.25-1						0.25-2	1.0-8			0.25->256					
13	PORCINO Y BOVINO	RANGOS	0.016->256	0.38-16					0.25->256	0.064-16	0.19->256			<0.002->32				0.25->256	
14	RT078 PORCINO Y HUMANO HOSPITALARIO, ETC	RANGOS	0.32->256	0.064-2	1->32				0.25->256				1->32	4.0-32	0.002-0.004			0.5-16	
15	COMUNITARIO HOSPITALARIO, ETC	RANGOS	0.12-1	0.5-2	0.5-32				0.5->32	0.12-2			1.0-8		0.004-0.015			8->128	
16	RT078 CARNES PORCINO RT078 & OTROS	RANGOS	0.032-0.75	0.125-1	0.25-32				0.75-32										
17	CERDOS Y ANIMALES AGROPECUARIOS	RANGOS	0.016-256	0.016-256	0.02-32				0.016-256					0.016-256					
18	MIXTO PORCINO Y HUMANO	RANGOS	<0.5-2	<0.25-1	1->4				<0.25-8	<0.5-2	<0.5-4	<2-16	1.0-8	0.25->16	<0.5->4			>32**	
		PORCINO RANGOS	0.125-8	1.0-4					0.5-128									2->256	
19	MIXTO PORCINO Y HUMANO	HUMANO RANGOS	0.06-0.25	0.06-2					0.125-64	0.125->256								0.125->256	
		HUMANO RANGOS	0.12-0.5	0.5-1	0.5-2				0.12-8	0.12-5			0.5-2	0.06-0.25	0.002-0.008			4->128	
20	RT014 PORCINO Y HUMANO	PORCINO RANGOS	0.25-0.5	1	0.5-1				0.25->32	0.12-5			0.5-2	0.06-32	0.002-0.015			8.0-32	
REFERENCIAS DISPONIBLES			26	25	22	1	7	9	22	7	4	6	10	15	12	2	7	11	

NOTAS SOBRE SUSTITUCIÓN DE ANTIBIÓTICOS (ANEXO 1)

8, 9	Se utilizó Imipenem (sustitución de Meropenem)
10, 15, 20	Se utilizó Rifaximina (sustitución de Rifampicina)
12	Se utilizó Florfenicol (sustitución de Cloranfenicol); Oxytetraciclina (sustitución de Tetraciclina)
14	Se utilizó Ertapenem (sustitución de Meropenem)
*	La Cefalosporina utilizada en todos los estudios, exceptuando aquellos indicados (**), utilizaron Ceftriaxona como Cefalosporina
**	En el estudio fue utilizado una cefalosporina diferente a Ceftriaxona y Cefotaxime.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS (ANEXO 1)

- Janezic, S., Ocepek, M., Zidaric, V., y Rupnik, M. (2012). Clostridium difficile genotypes other than ribotype 078 that are prevalent among human, animal and environmental isolates. BMC Microbiology, 12, 48.
- Moono, P., Putsathit, P., Knight, D., Squire, M., Hampson, D., Foster, F., y Riley, T. (2016). Persistence of Clostridium difficile RT 237 infection in a Western Australian piggyery. Anaerobe, 37(2016), 62–66.
- Oka, K., Osaki, T., Hanawa, T., Kurata, S., Okazaki, M., Manzoku, T., . . . y Kamiya, S. (2012). Molecular and microbiological characterization of Clostridium difficile isolates from single, relapse, and reinfection cases. Journal of Clinical Microbiology, 50(3), 915–921.
- Wu, Y., Lee, J., Tsai, B., Liu, Y., Chen, C., Tien, N., . . . y Chen, T. (2016). Potentially hypervirulent Clostridium difficile PCR ribotype 078 lineage isolates in pigs and possible implications for humans in Taiwan. International Journal of Medical Microbiology, 306(2), 115–122.
- Spigaglia, P., Drigo, I., Barbanti, F., Mastrantonio, P., Bano, L., Bacchin, C., . . . y Agnoletti, F. (2015). Antibiotic resistance patterns and PCR-ribotyping of Clostridium difficile strains isolated from swine and dogs in Italy. Anaerobe, 31(2015), 42–46.
- Susick, E., Putnam, M., Bermudez, D., y Thakur, S. (2012). Longitudinal study comparing the dynamics of Clostridium difficile in conventional and antimicrobial free pigs at farm and slaughter. Veterinary Microbiology, 157, 172–178.
- Álvarez-Pérez, S., Blanco, J., Martínez-Nevado, E., Peláez, T., Harmanus, C., Kuijper, E., y García, M. (2014). Shedding of Clostridium difficile PCR ribotype 078 by zoo animals, and report of an unstable metronidazole-resistant isolate from a zebra foal (Equus quagga burchellii). Veterinary Microbiology, 169(3-4), 218–222.
- Freeman, J., Vernon, J., Morris, K., Nicholson, S., Todhunter, S., Longshaw, C., y Wilcox, M. (2015). Pan-European longitudinal surveillance of antibiotic resistance among prevalent Clostridium difficile ribotypes. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 21(3), 248.e9-248.e16.
- Keessen, E., Hengsgens, M., Spigaglia, P., Barbanti, F., Sanders, I., Kuijper, E., y Lipman, L. (2013). Antimicrobial susceptibility profiles of human and piglet Clostridium difficile PCR-ribotype 078. Antimicrobial Resistance and Infection Control, 2, 14.
- Knight, D. y Riley, T. (2016). Clostridium difficile clade 5 in Australia: Antimicrobial susceptibility profiling of PCR ribotypes of human and animal origin. The Journal of antimicrobial chemotherapy, 71(8), 2213–2217.
- Ramírez-Vargas, G., Quesada-Gómez, C., Acuña-Amador, L., López-Ureña, D., Murillo, T., Del Mar Gamboa-Coronado, M., . . . y Rodríguez, C. (2017). A Clostridium difficile Lineage Endemic to Costa Rican Hospitals Is Multidrug Resistant by Acquisition of Chromosomal Mutations and Novel Mobile Genetic Elements. Antimicrobial agents and chemotherapy, 61(4).
- Silva, R., Oliveira, C., Diniz, A., Alves, G., Carvalho-Guedes, R., Vilela, E., y Lobato, F. (2014). Antimicrobial susceptibility of Clostridium difficile isolated from animals and humans in Brazil. Ciência Rural, 44(5), 841–846.
- Thitaram, S., Frank, J., Siragusa, G., Bailey, J., Dargatz, D., Lombard, J., . . . y Fedorka-Cray, P. (2016). Antimicrobial susceptibility of Clostridium difficile isolated from food animals on farms. International journal of food microbiology, 227, 1–5.
- Álvarez-Pérez, S., Blanco, J., Harmanus, C., Kuijper, E., y García, M. (2017). Subtyping and antimicrobial susceptibility of Clostridium difficile PCR ribotype 078/126 isolates of human and animal origin. Veterinary Microbiology, 199, 15–22.
- Knight, D., Giglio, S., Huntington, P., Korman, T., Kotsanas, D., Moore, C., . . . y Riley, T. (2015). Surveillance for antimicrobial resistance in Australian isolates of Clostridium difficile, 2013-14. The Journal of antimicrobial chemotherapy, 70(11), 2992–2999.
- Varshney, J., Very, K., Williams, J., Hegarty, J., Stewart, D., Lumadue, J., . . . y Jayarao, B. (2014). Characterization of Clostridium difficile isolates from human fecal samples and retail meat from Pennsylvania. Foodborne Pathogens and Disease, 11(10), 822–829.
- Andrés-Lasheras, S., Bolea, R., Mainar-Jaime, R., Kuijper, E., Sevilla, E., Martín-Burriel, I., y Chirino-Trejo, M. (2017). Presence of Clostridium difficile in pig faecal samples and wild animal species associated with pig farms. Journal of applied microbiology, 122(2), 462–472.
- Pirš, T., Avberšek, J., Zdovc, I., Krt, B., Andlovic, A., Lejko-Zupanc, T., . . . y Ocepek, M. (2013). Antimicrobial susceptibility of animal and human isolates of Clostridium difficile by broth microdilution. Journal of Medical Microbiology, 62(Pt 9), 1478–1485.
- Usui, M., Nanbu, Y., Oka, K., Takahashi, M., Inamatsu, T., Asai, T., . . . y Tamura, Y. (2014). Genetic relatedness between Japanese and European isolates of Clostridium difficile originating from piglets and their risk associated with human health. Frontiers in Microbiology, 5(513), 1–8.
- Knight, D., Squire, M., Collins, D., y Riley, T. (2016). Genome Analysis of Clostridium difficile PCR Ribotype 014 Lineage in Australian Pigs and Humans Reveals a Diverse Genetic Repertoire and Signatures of Long-Range Interspecies Transmission. Frontiers in Microbiology, 7, 2138.