



UNIVERSIDAD MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Clostridiodes difficile:

Presencia a lo largo de la Cadena Alimentaria

Dña. Carmen Candel Pérez

2021

UNIVERSIDAD DE
MURCIA



DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DE LOS
ALIMENTOS, NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA
FACULTAD DE VETERINARIA

TESIS DOCTORAL POR COMPENDIO DE PUBLICACIONES

Clostridiodes difficile: Presencia a lo largo de la Cadena Alimentaria

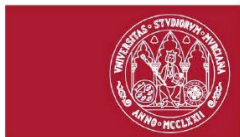
Dña. Carmen Candel Pérez

Directores:

M^a Carmen Martínez Graciá

Gaspar F. Ros Berruezo

Murcia, 2021



D^a. M^a Carmen Martínez Graciá, Catedrática de Universidad del Área de Nutrición y Bromatología, y D. Gaspar F. Ros Berruezo, Catedrático de Universidad del Área de Nutrición y Bromatología, ambos adscritos al Departamento de Tecnología de los Alimentos, Nutrición y Bromatología,

AUTORIZAN:

La presentación de la tesis doctoral como compendio de publicaciones titulada “*Clostridiodes difficile*: Presencia a lo largo de la cadena alimentaria”, realizada por D^a Carmen Candel Pérez, bajo nuestra inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 1 de Diciembre de 2020

Fdo.: Dra. M^a Carmen Martínez Graciá

Fdo.: Dr. Gaspar F. Ros Berruezo

PUBLICACIONES ORIGINALES QUE CONFORMAN LA TESIS DOCTORAL

La tesis con título “*Clostridioides difficile*: Presencia a lo largo de la cadena alimentaria” corresponde a un compendio de trabajos, previamente publicados en revistas del *Journal Citation Report* (JCR) y *Scimago Journal & Country Rank* (SJC), con informe favorable de la Comisión de Doctorado del Programa Tecnología de los Alimentos, Nutrición y Bromatología.

Las referencias completas de los artículos que constituyen el cuerpo de la tesis, y que pueden consultarse en el epígrafe 4, son las siguientes:

1. **Candel-Pérez C**, Ros-Berruezo G, Martínez-Graciá C. A review of *Clostridioides* [*Clostridium*] *difficile* occurrence through the food chain. *Food Microbiology*, 2019; 77: 118–129. DOI: 10.1016/j.fm.2018.08.012
2. **Candel-Pérez C**, Martínez-Miró S, Ros-Berruezo G, Martínez-Graciá C. Effect of Specimen Type and Processing on the Detection of *Clostridioides* [*Clostridium*] *difficile* in Piglet Fecal Samples. *Foodborne Pathogen Diseases*, 2019; 16(11):731–737. DOI: 10.1089/fpd.2019.2629
3. **Candel-Pérez C**, Santaella-Pascual J, Ros-Berruezo G, Martínez-Graciá C. Occurrence of *Clostridioides* [*Clostridium*] *difficile* in poultry giblets at slaughter and retail pork and poultry meat in southeastern Spain. *Journal of Food Protection*, 2020; DOI: 10.4315/jfp-20-256
4. **Candel-Pérez C**, Zapata-Galián E., López-Nicolás R, Ros-Berruezo G, Martínez-Graciá C. Presence of toxigenic *Clostridioides* [*Clostridium*] *difficile* in edible bivalve mollusks in Spain. *Food Science and Technology International*, 2020; 26(5):413-419. DOI: 10.1177/1082013219894092

5. **Candel-Pérez C**, Durango-Villadiego A, Doménech-Asensi G, Ros-Berruezo G. Screening of antibacterial activity of *Moringa oleifera* against pathogenic *Clostridium* spp. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 2018; 16, 13–17. DOI: 10.19026/ajfst.16.5930

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1 <i>Clostridioides difficile</i>	3
1.1.1 <i>Características microbiológicas</i>	3
1.1.2 <i>Principales factores de patogenicidad</i>	4
1.1.3 <i>Patogénesis de la infección por Clostridioides difficile</i>	4
1.1.4 <i>Epidemiología de la infección por Clostridioides difficile</i>	5
1.2 <i>Clostridioides difficile</i> en la cadena de producción alimentaria	6
1.2.1 <i>Posibles fuentes y rutas de contaminación de Clostridioides difficile a alimentos</i>	6
1.2.2 <i>Presencia de Clostridioides difficile en granjas</i>	7
1.2.3 <i>Presencia de Clostridioides difficile en mataderos</i>	7
1.2.4 <i>Presencia de Clostridioides difficile en alimentos</i>	8
1.3 Métodos de detección de <i>Clostridioides difficile</i> a partir de alimentos	9
1.3.1 <i>Cultivo bacteriológico de Clostridioides difficile</i>	10
1.3.2 <i>Métodos moleculares para la detección de Clostridioides difficile</i>	13
1.4 Resistencia de <i>Clostridioides difficile</i> en productos alimentarios.....	14
1.4.1 <i>Proliferación y supervivencia de Clostridioides difficile en alimentos</i>	14
1.4.2 <i>Resistencia de las esporas de Clostridioides difficile en alimentos</i>	15
1.5 Medidas para el control de <i>Clostridioides difficile</i> en alimentos	17
1.5.1 <i>Control ambiental de Clostridioides difficile: desinfección de superficies</i> ...	17
1.5.2 <i>Inactivación de Clostridioides difficile por métodos físicos</i>	18
1.5.3 <i>Inactivación de Clostridioides difficile por métodos químicos</i>	19
1.5.4 <i>Efecto de los antimicrobianos naturales frente Clostridioides difficile</i>	19
1.5.5 <i>Efecto de los probióticos contra Clostridioides difficile</i>	20
Bibliografía	22
2.OBJETIVOS DE LA TESIS.....	42
2.1 <i>Objetivo general</i>	43
2.2 <i>Objetivos específicos</i>	43
3. JUSTIFICACIÓN, ESTRUCTURA Y DISEÑO EXPERIMENTAL DE LA TESIS DOCTORAL.....	45
4. PUBLICACIONES ORIGINALES QUE CONFORMAN LA TESIS DOCTORAL	51

4.1 A review of <i>Clostridioides</i> [<i>Clostridium</i>] <i>difficile</i> occurrence through the food chain.....	53
4.2 Effect of Specimen Type and Processing on the Detection of <i>Clostridioides</i> [<i>Clostridium</i>] <i>difficile</i> in Piglet Fecal Samples.....	55
4.3 Occurrence of <i>Clostridioides</i> [<i>Clostridium</i>] <i>difficile</i> in poultry giblets at slaughter and retail pork and poultry meat in southeastern Spain.....	57
4.4 Presence of toxigenic <i>Clostridioides</i> [<i>Clostridium</i>] <i>difficile</i> in edible bivalve mollusks in Spain.....	59
4.5 Screening of Antibacterial Activity of <i>Moringa oleifera</i> Against Pathogenic <i>Clostridium</i> spp.....	61
5. COMUNICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS DOCTORAL.....	63
5.1 Comunicaciones orales en congresos.....	65
5.2 Pósters en congresos	67
5.3 Pósters en congresos relacionados con la tesis doctoral	77
6. CONCLUSIONES	81
7. AGRADECIMIENTOS	85
8. RESUMEN Y SUMMARY	89

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 *Clostridioides difficile*

Clostridioides difficile es un patógeno humano asociado con enfermedades entéricas graves en todo el mundo, siendo el principal agente causal de diarrea nosocomial y colitis pseudomembranosa (Lyerly et al., 1982).

C. difficile fue aislado por primera vez en 1935 a partir de heces de recién nacidos sanos (Hall & O'Toole, 1935). Originalmente se nombró a la bacteria como *Bacillus difficilis* por su morfología bacilar, por la capacidad de formar esporas y por la dificultad de su aislamiento. En 1938, Prévot rebautizó *Bacillus difficilis* como *Clostridium difficile* (Lawson et al., 2016), trasladándose al género *Clostridium*, perteneciente a la familia *Clostridiaceae* cluster I. En la última revisión del Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Ludwig et al., 2009), en base a análisis de la secuencia del gen 16S RNA ribosomal, *C. difficile* mostró ser filogenéticamente distante al rRNA clostridial cluster I y se trasladó al cluster XI, dentro de la familia *Peptostreptococcaceae incertae sedis*, pasando a denominarse *Peptostreptococcus difficile* (Yutin & Galperin, 2013). Ante las dificultades que supone un cambio de nombre de género en la literatura, materiales y tecnologías del sector comercial y sanitario, Lawson et al. (2016) propusieron el nombre de *Clostridioides difficile* comb. nov., reflejando la similitud fisiológica con *Clostridium*, lo que permite mantener la abreviatura "*C. difficile*".

1.1.1 Características microbiológicas

Clostridioides difficile es un bacilo gram positivo, anaerobio estricto y esporulado. El examen microscópico de *C. difficile* revela que las células vegetativas, que se pueden unir por los extremos formando pequeñas cadenas, albergan una espora subterminal denominada endospora. Las células vegetativas de *C. difficile* son muy sensibles al oxígeno (Jump et al., 2007), por lo que fuera de las condiciones anaeróbicas del intestino grueso, *C. difficile* se encuentra en forma esporulada (Gauvry et al., 2016). Esta forma esporulada constituye una estructura de resistencia ante las condiciones ambientales adversas. La capa externa de la espora confiere protección frente a reactivos químicos, así como la membrana interior, relativamente impermeable a sustancias químicas tóxicas. Además, el bajo contenido de agua y el alto nivel de ácido dipicolínico del núcleo de la espora ofrecen protección frente a los efectos del calor y la desecación. La saturación del ADN con proteínas solubles en ácido también ofrecen protección frente a elevadas temperaturas, productos químicos y radiación (Setlow, 2014).

C. difficile es predominantemente sacarolítico, y tiene una actividad proteolítica débil o ausente, lo que dificulta su identificación bioquímica (Nakamura et al., 1982).

El genoma de *C. difficile* consta de un cromosoma circular de más de cuatro millones de pares de bases y de un plásmido. *C. difficile* presenta un contenido en guanina-citosina del 29 % por lo se le clasifica como perteneciente al Phylum Firmicutes, eubacterias grampositivas con bajo contenido en G+C (Sebahia et al., 2006).

1.1.2 Principales factores de patogenicidad

El principal factor de virulencia responsable de la infección por *C. difficile* es su capacidad de sintetizar toxinas en el colon. La toxina A, también llamada enterotoxina, causa acumulación de líquido en varios modelos animales, y la toxina B, descrita como una citotoxina, induce diarrea, inflamación y daño de la mucosa colónica (Voth & Ballard, 2005). Algunas cepas también son capaces de sintetizar la toxina binaria, también conocida como *C. difficile* transferasa, implicada en formas más graves de enfermedad (Barbut et al., 2005).

Las toxinas A y B están codificadas cromosómicamente en una región denominada locus de patogenicidad (*PaLoc*), ausente en cepas no toxigénicas (Martin-Verstraete et al., 2016). Algunos estudios demostraron un efecto protector de la colonización no toxigénica de *C. difficile* contra la infección toxigénica en el modelo de hámster. Sin embargo, con sujetos humanos hay varias cuestiones sin resolver (Natarajan et al., 2013). Cabe señalar que se han descrito otros factores de virulencia, incluida la producción de otro tipo de toxinas (Janoir, 2016). Además, aproximadamente el 11 % del genoma de *C. difficile* está formado por elementos genéticos móviles (Sebahia et al., 2006), incluyendo genes implicados en la transferencia de los genes de resistencia a los antibióticos y de los genes de la toxina (Peng et al., 2017). Roy Chowdhury et al. (2016) sugirieron que las cepas de *C. difficile* no toxigénicas podrían adquirir el *PaLoc* mediante transferencia lateral de genes y evolucionar para convertirse en cepas virulentas.

1.1.3 Patogénesis de la infección por Clostridioides difficile

La fisiopatología de la infección por *C. difficile* se inicia con la ingestión de las esporas, capaces de resistir la acción del ácido gástrico (pH=1-2) (Fordtran, 2006). En el íleon superior, por acción de hidrolasas de la microbiota intestinal, los ácidos biliares

conjugados son desconjugados en ácidos biliares primarios (Ridlon et al., 2006), capaces de estimular la germinación de las esporas de *C. difficile*, transformándose en células vegetativas (Allegretti et al., 2016). Por otro lado, en el íleon inferior, los ácidos biliares secundarios inhiben el crecimiento de *C. difficile*, protegiendo de esta manera contra la infección.

La infección por *C. difficile* es oportunista, por lo que en caso de alteración de la microbiota, la concentración de los ácidos biliares primarios se ve aumentada debido a que no se metabolizan a ácidos biliares secundarios, estimulando así la germinación de *C. difficile* (Allegretti et al., 2016). Además, las alteraciones de la microbiota pueden derivar en una disminución de su resistencia a la colonización por otras bacterias, resultando en el sobrecrecimiento y colonización por las células vegetativas de *C. difficile* al penetrar en la capa mucosa intestinal (Cózar-Llistó et al., 2016).

Las cepas de *C. difficile* toxigénicas son capaces de sintetizar las toxinas que, tras el acoplamiento con los correspondientes receptores, ingresan en los enterocitos provocando el aumento de la secreción de fluidos y la activación de respuestas inflamatorias, comprometiendo la integridad de la barrera intestinal y dando como resultado la diarrea y colitis, con o sin pseudomembranas (Albert et al., 2016).

1.1.4 Epidemiología de la infección por *Clostridioides difficile*

Tradicionalmente, la infección por *C. difficile* (CDI, por sus siglas en inglés) se ha asociado con pacientes que reciben tratamiento antibiótico de amplio espectro en hospitales. Sin embargo, a partir del año 2000, la epidemiología de *C. difficile* ha cambiado y las revisiones describen un aumento de la CDI asociada a la comunidad, no vinculada a los factores de riesgo tradicionales (terapia reciente con antibióticos, edad avanzada, comorbilidad significativa u hospitalización previa) (Bauer et al., 2009). En Europa, el incremento de las infecciones por *C. difficile* se ha atribuido a la aparición de cepas pertenecientes a los ribotipos 001, 027, 053, 106 y 078, que poseen un mecanismo de hiperproducción de toxinas y son capaces de producir brotes de la enfermedad (Bauer et al., 2011; Rupnik et al., 2009).

Los estudios genómicos respaldan las observaciones de que una gran proporción de cepas responsables de causar CDI provienen de fuentes no hospitalarias (Hoover & Rodríguez-Palacios, 2013; Knight et al., 2017; Weese, 2009) sugiriendo al medio ambiente, los animales y los alimentos como posibles nuevas vías de transmisión de *C. difficile*.

1.2 *Clostridioides difficile* en la cadena de producción alimentaria

*1.2.1 Posibles fuentes y rutas de contaminación de *Clostridioides difficile* a alimentos*

La literatura presenta varias hipótesis sobre la transmisión de *C. difficile* pero, considerando su naturaleza anaeróbica obligada, la ingesta de las esporas, metabólicamente latentes, parece ser la causa de la transmisión de la CDI (Otten et al., 2010).

Diversos estudios demuestran que *C. difficile* es ubicuo en entornos naturales, incluidos suelos y agua (Al Saif & Brazier, 1996; Pasquale et al., 2011, 2012; Romano, Albanese, et al., 2012; Xu et al., 2014; Zidaric et al., 2010). La presencia de esporas de *C. difficile* en plantas de tratamiento de agua residual, a través de la cual pueden introducirse en los cursos de agua potable, también podría constituir una fuente potencial de la CDI asociada a la comunidad (Nikaeen et al., 2015; Romano, Pasquale, et al., 2012).

El estiércol de caballos y cerdos, fertilizantes orgánicos tradicionales para cultivos, también pueden contener esporas de *C. difficile* (Medina-Torres et al., 2011; Usui et al., 2017), por lo que su uso plantea un posible riesgo de transferencia de *C. difficile* a la cadena alimentaria, incluso si se siguen buenas prácticas agrícolas (Usui et al., 2017). La contaminación de los vegetales y las frutas podría ocurrir como resultado del riego o limpieza con agua contaminada con esporas. Por tanto, las verduras o frutas crudas o mínimamente procesadas podrían ser vehículos potenciales para la CDI.

El ganado es un conocido portador de *C. difficile* (Freeman et al., 2010; Keel et al., 2007; Medina-Torres et al., 2011) y varios informes demuestran la presencia de *C. difficile* en animales antes de su sacrificio (Rodríguez-Palacios, Pickworth, Lejeune, et al., 2011; Weese et al., 2011). Según la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), la contaminación de las canales podría estar ocasionada por el derrame del contenido intestinal durante la evisceración y por la acumulación de esporas en el entorno del matadero (EFSA, 2013).

La presencia de esporas en los productos finales se puede explicar por la contaminación inicial de las materias primas, la contaminación cruzada en la industria alimentaria o la contaminación durante el procesado de los alimentos (Gauvry et al., 2016; Heyndrickx, 2011). Respecto al entorno doméstico, la presencia de esporas en las superficies de la cocina y en los frigoríficos podría traducirse en la posible transferencia a productos alimentarios (Weese et al., 2010).

1.2.2 Presencia de *Clostridioides difficile* en granjas

Clostridioides difficile se ha identificado como causa de enteritis en muchas especies de animales destinados para el consumo y se puede aislar en heces tanto de animales enfermos como de animales sanos (Songer & Anderson, 2006). Por tanto, la colonización subclínica del ganado podría ser un reservorio importante de *C. difficile* y una fuente potencial del patógeno para la CDI adquirida en la comunidad (Hensgens et al., 2012).

Estudios previos informaron que la detección de *C. difficile* oscila entre 1,4-96 % en lechones que no presentaban síntomas clínicos, a pesar de que los genes de las toxinas se encontraron en 83,6-100 % de los aislamientos (Rodríguez et al., 2016). De forma similar, se informó una prevalencia de hasta el 56 % en terneros sanos menores de tres meses de edad (Rodríguez et al., 2016). Para aves de corral, más del 60 % fueron portadoras de *C. difficile* al inicio de la producción, tasa que disminuye al 6-12 % en el momento del sacrificio (Zidaric et al., 2008).

Varios estudios informan del efecto de la edad del animal sobre las tasas de aislamiento de *C. difficile* (Alvarez-Pérez et al., 2009; Rodríguez et al., 2012; Weese et al., 2009). Hopman, Keessen, et al. (2011) demostraron una prevalencia acumulada del 100 % dentro de las 48 horas posteriores al nacimiento de los lechones, mientras que se observa una disminución de la prevalencia variando de 0 a 23 % en momentos próximos al sacrificio (Rodríguez et al., 2016). El motivo de por qué algunos lechones colonizados por cepas toxigénicas no desarrollan signos de enfermedad podría explicarse por la falta de receptores de toxinas (Nicholson et al., 2014) o por la variabilidad en la concentración de anticuerpos del calostro y su ingesta por lechones (Squire & Riley, 2013).

1.2.3 Presencia de *Clostridioides difficile* en mataderos

Para una mejor comprensión de la contaminación de las carnes con *C. difficile*, es apropiado analizar su incidencia en muestras de animales adultos en mataderos. En estudios europeos realizados en el área de procesamiento de vísceras, *C. difficile* se ha detectado en hasta el 28 % del contenido intestinal de cerdos (Hopman, Oorburg, et al., 2011), hasta el 9,9 % del contenido intestinal de ternera (Rodríguez et al., 2013) y en el 5 % del contenido intestinal de pollos de engorde (Indra et al., 2009; Koene et al., 2012). Del mismo modo, en la sala de enfriamiento, *C. difficile* se ha detectado en el 7

% de las canales de cerdo (Rodríguez et al., 2013) y en el 7,9 % de las canales de ternera (Rodríguez et al., 2013).

La prevalencia de *C. difficile* presente en el contenido intestinal de animales descrita en mataderos en Europa es ligeramente superior que en América del Norte (Estados Unidos y Canadá) o Australia. En estos países, *C. difficile* se ha detectado hasta en un 6,9 % del contenido intestinal de cerdos (Norman et al., 2011; Susick et al., 2012), y hasta en un 3,8 % del contenido intestinal de vacuno (Knight et al., 2016; Rodríguez-Palacios, Koohmaraie, et al., 2011). Sin embargo, la presencia de *C. difficile* en las canales en Europa es ligeramente inferior a la reportada en América del Norte, donde se ha descrito *C. difficile* en 2,5 a 15 % de canales de cerdo (Hawken et al., 2013; Norman et al., 2011; Susick et al., 2012) y en 4 a 16,7 % de canales de vacuno (Houser et al., 2012; Knight et al., 2016).

1.2.4 Presencia de Clostridioides difficile en alimentos

La detección de cepas de *C. difficile* genéticamente similares en ganado, alimentos y seres humanos ha llevado a una mayor conciencia del potencial de *C. difficile* como un posible microorganismo de transmisión alimentaria (Goorhuis et al., 2008; Hoover & Rodríguez-Palacios, 2013; Janezic et al., 2014; Knight et al., 2015; Rupnik, 2007; Songer & Anderson, 2006; Steinmuller et al., 2006).

La mayoría de los estudios se han centrado en la detección de *C. difficile* en carne, pero las esporas responsables de CDI en humanos también se han encontrado en otro tipo de alimentos, como vegetales y mariscos.

En general, la prevalencia de *C. difficile* en carnes de estudios europeos no supera el 6,3 %, siendo más baja que la descrita en Estados Unidos y Canadá (Rodríguez et al., 2016). En América del Norte, se ha notificado la presencia de *C. difficile* en hasta un 42 % en diversas categorías de carnes (Songer et al., 2009). Las estrategias de muestreo junto con los métodos de cultivo empleados en los diferentes países, como se detallará más adelante, podrían ser los responsables de dicha disparidad entre los estudios.

Varios estudios europeos informan valores del 1,9-7,5 % en productos vegetales frescos y del 3,9-49 % en mariscos (Rodríguez et al., 2016). La mayor tasa de *C. difficile* se observó en moluscos bivalvos, principalmente muestreados en áreas altamente contaminadas de Italia (Pasquale et al., 2011; Pasquale et al., 2012). Los datos sobre la presencia de *C. difficile* en mariscos y vegetales crudos en América del Norte son similares. Estos estudios muestran tasas de aislamiento de 4,5 % en marisco en Texas

(Norman et al., 2014) y 47,4 % en ostras en Louisiana (Montazeri et al., 2015). Metcalf et al. (2010) encontraron *C. difficile* en 4,5 % de vegetales crudos en Canadá.

Los niveles de contaminación de *C. difficile* en comidas preparadas en centros de asistencia sanitaria descritos en estudios europeos son bajos. *C. difficile* se aisló a partir de una comida preparada, compuesta de salchicha de cerdo, salsa de mostaza y ensalada de zanahoria, en una residencia de ancianos belga (Rodríguez et al., 2015). Por otro lado, *C. difficile* también se aisló en una muestra de carne de pollo cocida en un hospital de Italia (Primavilla et al., 2019). En cambio, estudios de Norte América muestran niveles más altos de contaminación de alimentos preparados para pacientes hospitalizados. En Texas, se encontró una prevalencia del 17-28 % en carne cocida, frutas y verduras y del 27 % en carne cruda (Koo et al., 2012).

Los ribotipos 017, 027 y 078, descritos en la CDI asociada a la comunidad, también se han aislado a partir de productos alimentarios y ganado (Bauer et al., 2011; Goorhuis et al., 2008; Janezic et al., 2012; Keel et al., 2007; Rodríguez-Palacios et al., 2006; Rodríguez et al., 2014). Los ribotipos más frecuentemente aislados a partir de varios tipos de alimentos de diferentes países europeos (incluidas las aves de corral, las verduras y los mariscos), fueron 001 y 014. El ribotipo 078, una importante cepa hipervirulenta involucrada en la enfermedad en humanos (Indra et al., 2015; Janezic & Rupnik, 2015), se ha encontrado en carnes de cerdo en Bélgica, mejillones en Italia y en una comida preparada de un centro de asistencia sanitaria belga. En América del Norte, los ribotipos hipervirulentos 027 y 078 son las cepas predominantes aisladas de los alimentos (Songer et al., 2009).

1.3 Métodos de detección de *Clostridioides difficile* a partir de alimentos

Tras el reconocimiento de *C. difficile* como el principal agente causante de diarrea nosocomial y colitis pseudomembranosa, se han desarrollado y mejorado los métodos de aislamiento e identificación a partir de muestras fecales en humanos. Entre las técnicas disponibles se encuentran el cultivo celular citotóxico, el cultivo toxigénico, las técnicas de enzimoanálisis (EIA) y las técnicas moleculares (Rupnik & Songer, 2010). Sin embargo, la detección de *C. difficile* a partir de otro tipo de muestras no dispone de un estándar de oro o un procedimiento ISO, motivo por el que en los diversos estudios en animales y alimentos se emplean variaciones al método establecido para muestras clínicas.

1.3.1 Cultivo bacteriológico de Clostridioides difficile

El cultivo toxigénico, considerado el método de referencia para la detección de *C. difficile* toxigénico en muestras clínicas, consiste en el aislamiento de *C. difficile* a partir del cultivo de las muestras en medios selectivos, seguido de la detección de toxinas *in vitro* por EIA, cultivo celular citotóxico o técnicas moleculares (Crobach et al., 2009; Planche & Wilcox, 2011).

1.3.1a Medios de cultivo: aislamiento e identificación de Clostridioides difficile

La mayoría de los medios de cultivo empleados contienen antibióticos con objeto de aislar *C. difficile* limitando el sobrecrecimiento de otros microorganismos presentes en la muestra. El primer medio de cultivo diseñado para el aislamiento selectivo y diferencial de *C. difficile* a partir de muestras fecales fue el agar fructosa cicloserina cefoxitina (CCFA, por sus siglas en inglés) (George & Sutter, 1979). Los agentes selectivos empleados fueron la cicloserina, por su actividad frente a *Bacteroides*, *Fusobacterium*, Estreptococos, *Escherichia coli* y otros bacilos gram negativos, y la cefoxitina, por su capacidad de inhibir bacterias gram negativas y positivas exceptuando a *C. difficile* y a *Enterococcus faecalis*. Se han desarrollado otros medios de cultivo selectivos como el *C. difficile* moxalactam norfloxacin agar (CDMN) (Aspinall & Hutchinson, 1992), que emplea como agentes selectivos la norfloxacin, por su actividad frente bacterias gram negativas y estreptococos fecales, y moxalactam, por su actividad frente cepas de *Bacteroides* spp.

La recomendación de la Sociedad de Epidemiología Hospitalaria Americana (SHEA) y Sociedad de Enfermedades Infecciosas Americana (IDSA), al igual que la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), para el aislamiento de *C. difficile* es el cultivo en el medio de cultivo CCFA suplementado con sustancias que favorezcan su germinación y que haya sido pre-reducido bajo condiciones anaeróbicas (Alcalá-Hernández et al., 2015; Cohen et al., 2010). Dada la laboriosidad de suplementar y pre-reducir los medios de cultivo antes de su uso, han aparecido en el mercado medios de cultivos que ya incorporan estos suplementos y que no es necesario pre-reducirlos. Entre estos medios se encuentran el TCCFA (taurocolato cefoxitina cicloserina fructosa agar) que incorpora taurocolato para mejorar la germinación de las esporas (Foster & Riley, 2012). El medio selectivo CLO agar (100 µg/ml cicloserina, 8 µg/ml cefoxitina, 2 µg/ml anfotericina B (BioMérieux)

también mostró tener altos valores de sensibilidad en el crecimiento de *C. difficile* (Eckert et al., 2013).

Las pruebas de identificación típicas de *C. difficile* se basan en las características fenotípicas de sus colonias y en la tinción de Gram. En medios de agar con sangre – como el agar Brucella suplementado con hemina y vitamina K1- las colonias de *C. difficile* tienen un diámetro de 2-5 mm y son circulares o rizoides, planas, de color grisáceo y no hemolíticas. Su superficie puede ser mate o algo satinada, con apariencia de "vidrio esmerilado" (Hall & O'Toole, 1935; Hafiz & Oakley, 1976; George & Sutter, 1979).

Otra de las características más peculiares del cultivo microbiológico es el olor a establo de caballo que desprende debido al metabolito volátil p-cresol, derivado del metabolismo de la tirosina (D'Ari & Barker, 1985). Las colonias en medios con sangre pueden presentar fluorescencia amarilla o verde pálida evanescente tras la aplicación de luz ultravioleta de onda larga emitida con una lámpara de Wood (George & Sutter, 1979; Wilson et al., 1982). La detección de la actividad L-prolina aminopeptidasa también es otra técnica para la detección rápida y presuntiva de *C. difficile* (Fedorko & Williams, 1997).

Las colonias presuntivas de *C. difficile* requieren de más pruebas para la confirmación de su identificación, como la cromatografía gas-líquido, capaz de detectar la presencia de ácido isocaproico y p-cresol (Dawson et al., 2008; Levett & Phillips, 1985; Sivsammye & Sims, 1990), y las técnicas de detección de ácidos nucleicos que se detallan más adelante.

1.3.2b Tratamiento de la muestra previo al cultivo bacteriológico

Con independencia de la composición del medio de cultivo, y con el fin de incrementar la tasa de aislamiento de *C. difficile*, diversos autores proponen variaciones del método tradicional de cultivo. La incorporación de un pretratamiento de la muestra, como etapa previa a su cultivo en medio sólido, ha mostrado un aumento en las tasas de recuperación de *C. difficile* y una disminución en el crecimiento de la flora contaminante procedente de la misma (Arroyo et al., 2005; Borriello et al., 1983; Hink et al., 2013; Riley et al., 1987).

A pesar del uso de antibióticos en los medios de cultivo empleados, la selectividad de los mismos es relativamente pobre. Además, la presencia de *Clostridium* spp. es cuantitativamente menor que otros microorganismos en las muestras fecales,

pudiendo verse su crecimiento enmascarado por éstos en los medios de cultivo. Por tanto, para facilitar la detección y el aislamiento de *C. difficile*, se recurre a métodos que eliminan esta flora competitiva. Estos métodos se basan en la alta capacidad de supervivencia de las esporas de *C. difficile* a altas temperaturas (Rodríguez-Palacios & Lejeune, 2011) o al alcohol (Koransky et al., 1978) frente a la inactivación de las formas vegetativas de *C. difficile* así como de otros microorganismos presentes en la muestra. En base a esta capacidad de supervivencia, los métodos empleados son el shock térmico a 80 °C durante 15 minutos o el shock con etanol mezclado a volúmenes iguales con la muestra durante 60 minutos (Alcalá-Hernández et al., 2016). El shock térmico, además de eliminar la flora presente de la muestra, favorece la recuperación de las esporas de *C. difficile*. Se ha demostrado que las temperaturas de 63 °C y 71 °C favorecen la germinación de las esporas de más de 20 semanas (Ghosh et al., 2009; Rodríguez-Palacios & Lejeune, 2011). De igual manera, diversos autores han demostrado mejores tasas de recuperación de *C. difficile* mediante el pretratamiento de la muestra con etanol que realizando cultivos directos de muestras fecales (Blanco et al., 2013; Clabots et al., 1989; Riley et al., 1987).

Por otro lado, algunos autores han implementado, como paso previo al cultivo, la incubación de la muestra en un medio líquido (o caldo de enriquecimiento), obteniéndose mejores tasas de recuperación que realizando la siembra directa en medio sólido (Arroyo et al., 2005). Este paso incluye el uso de un dispositivo *Stomacher* para convertir matrices de alimentos en un caldo nutricional apropiado. La muestra homogeneizada se incuba en condiciones de crecimiento adecuadas (37 °C en atmósfera de anaerobiosis), lo que permite el crecimiento y recuperación de células microbianas lesionadas, al tiempo que se inhibe el crecimiento de otros microorganismos presentes en la muestra.

Estos caldos de enriquecimiento suelen estar suplementados con compuestos tales como lisozima o sales biliares específicas, como el colato y sus derivados (taurocolato, glicocolato, colato y desoxicolato), facilitando la germinación de las esporas de *C. difficile* (Buggy et al., 1985; Sorg & Sonenshein, 2008; Wilson et al., 1982). El uso de caldo suplementado con lisozima puede mejorar la recuperación de esporas dañadas por calor, siendo por tanto el más adecuado para estudiar la presencia de *C. difficile* en productos alimenticios que hayan sufrido un procesamiento térmico (Kamiya et al., 1989; Redondo-Solano et al., 2016).

1.3.2 Métodos moleculares para la detección de *Clostridioides difficile*

A pesar de que el cultivo tiene una sensibilidad superior al 90 % para la detección de *C. difficile*, una de sus limitaciones es su laboriosidad y el tiempo requerido para obtener resultados, que puede demorar hasta 15 días (Arroyo et al., 2005; Rodríguez-Palacios et al., 2006, 2007). Por tanto, han surgido métodos complementarios más rápidos, como las técnicas de biología molecular que detectan las secuencias nucleotídicas específicas de *C. difficile* o de los genes que codifican sus toxinas. Entre estas pruebas están la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) y la amplificación isotérmica mediada por bucle.

1.3.2.1 PCR a partir de aislados bacterianos

La detección cualitativa o confirmación de la identificación de *C. difficile* se puede realizar mediante ensayos de PCR dirigidos a genes específicos, como el gen *tpi* o el gen 16S ARN ribosomal (Matsuki et al., 2002). El gen *tpi* codifica para la enzima triosafosfato isomerasa, específica para cada especie de *Clostridium* (Lemee et al., 2004; Verlag et al., 2003). La detección de este gen constituye una alternativa para la identificación de la especie de *Clostridium* en vez de la detección del gen 16S ADN ribosomal, una de las dianas más empleadas en la caracterización genotípica y filogenética de diferentes especies bacterianas (Verlag et al., 2003).

La detección de la presencia de los genes que codifican para las toxinas A y B, también se puede realizar mediante ensayos de PCR dirigidos a los genes específicos *tcdA* y *tcdB*, respectivamente. La detección de estos genes no implica necesariamente que la toxina se encuentre en la muestra, pero si demuestra su patogenicidad.

1.3.2.2 PCR directa a partir de muestras alimentarias

La detección de *C. difficile* directamente de muestras alimentarias por técnicas de PCR podría servir como prueba de detección rápida. Sin embargo, los escasos estudios realizados, además de no estar validados para muestras complejas, como las matrices alimentarias, informaron un rendimiento variado (Alvarez-Pérez et al., 2009; Avbersek et al., 2011, 2017).

Una de las etapas más críticas en los ensayos de PCR directa es la preparación de la muestra. Aunque no es esencial aislar el ADN con gran pureza, es necesario eliminar o inactivar las posibles sustancias inhibitoras de la reacción. La presencia de estos inhibidores, comunes en las muestras complejas, tales como las proteinasas, sales

biliares y polisacáridos complejos, pueden interferir con la lisis celular, provocar la degradación de ácidos nucleicos o inactivar la ADN polimerasa (Lantz et al., 1997; Monteiro et al., 1997). Por tanto, una preparación adecuada de la muestra, además de eliminar estos inhibidores asociados a la matriz alimentaria, reduce el volumen de la muestra a volúmenes apropiados para la PCR (Stevens & Jaykus, 2004).

Por otro lado, para facilitar la detección de recuentos bajos de microorganismos, el enriquecimiento de las muestras previo al análisis por PCR ha demostrado ser eficaz en la detección de ADN en muestras complejas (Freschi et al., 2005; Houser et al., 2010; Levi & Towner, 2005; Tansuphasiri et al., 2005). Con este procedimiento de enriquecimiento se consigue la multiplicación de *C. difficile* a una concentración detectable por PCR. Sin embargo, al igual que el cultivo, con la incubación previa en un caldo de enriquecimiento se desvirtúan los recuentos iniciales presentes en la muestra, factor clave para la cuantificación de la carga bacteriana de la misma.

1.4 Resistencia de *Clostridioides difficile* en productos alimentarios

La compleja cinética de proliferación, supervivencia y muerte de *C. difficile* en los alimentos, al igual que otros microorganismos, está determinada por múltiples factores, entre los que se incluyen pH, actividad del agua, composición química del alimento, temperatura y presencia de gases en el ambiente, además de la presencia de flora competitiva.

1.4.1 Proliferación y supervivencia de Clostridioides difficile en alimentos

C. difficile no está considerado como un patógeno de transmisión alimentaria por lo que el conocimiento sobre la proliferación de las células vegetativas y su viabilidad en alimentos durante el almacenamiento, en comparación con otras especies patógenas de *Clostridium*, es escaso. La mayoría de los trabajos sobre *C. difficile* han estudiado la resistencia de las esporas de una pequeña selección de cepas de *C. difficile* realizadas en muestras clínicas o en modelos de alimentos, y no en matrices alimentarias reales (Deng et al., 2015, 2017; Redondo-Solano et al., 2016; Rodríguez-Palacios & Lejeune, 2011). Warriner et al. (2016) mostraron que las células vegetativas del ribotipo 027 y 078 son sensibles al ácido (pH < 6,5), a la sal (> 4 %) y pueden crecer en un rango de temperatura de 22-45 °C, con un óptimo de 37 °C.

Al igual que para *C. perfringens*, el calor de la cocción a baja temperatura podría proporcionar un choque térmico necesario para la activación y germinación de las

esporas, a la vez que reduce los niveles de oxígeno proporcionando un ambiente óptimo para el crecimiento de las células vegetativas. Igualmente, tras la cocción, si no se toman las precauciones necesarias durante el enfriamiento y almacenamiento, *C. difficile*, al igual que *C. perfringens*, podría crecer en las grietas y cavidades internas de los alimentos, favorecido por las condiciones de anaerobiosis (Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología médica, 2012). Se recomienda por tanto que los alimentos se cocinen a más de 85 °C para reducir el riesgo de ingestión de *C. difficile* (Rodríguez-Palacios & Lejeune, 2011), y que se enfríen (enfriamiento rápido de 55 °C a 15 °C) y almacenen (<10 °C) adecuadamente como se indica para otros patógenos esporulados transmitidos por los alimentos (EFSA, 2005; Porsbo & Agerød, 2016).

Por otro lado, tampoco hay datos suficientes sobre la estabilidad de las toxinas de *C. difficile* en los sistemas alimentarios. Algunos trabajos informaron que las toxinas podrían ser estables almacenadas en un rango de temperatura de -20 a 37 °C durante 4 semanas (Sullivan et al., 1982; Weese et al., 2000). Sullivan et al. (1982) mostraron en un modelo *in vitro* que había una pérdida del 99 % de la actividad de la toxina en 6 minutos a 56 °C para ambas toxinas.

Dadas sus características microbiológicas, fuera de las condiciones anaeróbicas del intestino grueso, *C. difficile* se encuentra en forma esporulada para sobrevivir en las superficies y alimentos. En el improbable caso de que la matriz alimentaria cumpliera con las condiciones óptimas de crecimiento de *C. difficile* (ausencia de oxígeno, pH, temperatura) durante el tiempo necesario, las células vegetativas y las toxinas presentarían una supervivencia marginal en el contenido gástrico (Fordtran, 2006; Sullivan et al., 1982). Sin embargo, partiendo de la base de que la fisiopatología de la CDI se inicia con la ingestión de las esporas (Warriner et al., 2016), la germinación y el crecimiento de células vegetativas de *C. difficile* en productos alimentarios antes de su ingestión no sería un requisito para que el patógeno cause enfermedad.

1.4.2 Resistencia de las esporas de *Clostridioides difficile* en alimentos

No existen límites microbiológicos para los niveles máximos de esporas de *C. difficile* presentes en animales, en mataderos o en productos alimentarios. En el caso de *C. perfringens*, uno de los principales microorganismos esporulados causante de enfermedad transmitida por los alimentos, se considera que recuentos mayores a 10^5 - 10^8 ufc por gramo de alimento produce intoxicación alimentaria (EFSA, 2005; Heredia &

Labbé, 2013). En el caso de *C. difficile*, Weese et al. (2009) y Knight et al. (2016) detectaron recuentos bajos en canales y carnes, siendo 7 ufc/cm² (rango 3-33 ufc/cm²) para las superficies de canales de ternera, 30 esporas/g (rango 20-60 esporas/g) para la carne de cerdo y 100 esporas/g (rango 20-240 esporas/g) para la carne de ternera.

A pesar de los bajos niveles de esporas detectados en comparación con otros patógenos esporulados, la característica clave de la resistencia de *C. difficile* radica en su forma esporulada que le confiere resistencia ante las condiciones ambientales adversas, principalmente frente a la deshidratación, el calor y los desinfectantes (Kramer et al., 2006; Kuijper et al., 2006). La viabilidad de las esporas de *C. difficile* sometidas a enfriamiento, congelación y cocción fue investigada por Flock et al. (2016). Los resultados revelaron que el enfriamiento durante una semana o la congelación durante 12 semanas no afectaba a la supervivencia de las esporas de *C. difficile* en la carne picada. Además, Flock (2017) describió como las esporas de *C. difficile* eran capaces de sobrevivir en salchichas de cerdo refrigeradas a 4 °C durante 60 días. Por otro lado, la temperatura de cocción recomendada para eliminar las bacterias (71 °C, 160 °F) no es efectiva para inactivar las esporas de *C. difficile* (Flock et al., 2016; Rodríguez-Palacios et al., 2010). Incluso, se ha demostrado que las temperaturas de 63 °C y 71 °C favorecen la germinación de esporas de más de 20 semanas (Ghosh et al., 2009; Rodríguez-Palacios & Lejeune, 2011).

Se ha demostrado que *C. difficile* es capaz de formar biopelículas sobre superficies abióticas, en una matriz compuesta por ADN, polisacáridos y proteínas (Dapa et al., 2013; Dawson et al., 2012; Pantaléon et al., 2015; Poquet et al., 2018; Semenyuk et al., 2014). Sin embargo, es más probable que las esporas de *C. difficile* queden atrapadas dentro de las biopelículas formadas por otras bacterias, (Esfandiari et al., 2014), aumentando la resistencia de las células de *C. difficile* al oxígeno, así como a los desinfectantes empleados en los regímenes de saneamiento en entornos sanitarios, mataderos e industrias (Barra-Carrasco & Paredes-Sabja, 2014; Båverud et al., 2003; Dixit et al., 2005; Kramer et al., 2006; Maillard, 2011; Paredes-Sabja et al., 2014), favoreciendo de este modo su propagación ambiental.

Existen pocos datos disponibles sobre la detección de *C. difficile* en entornos alimentarios. *C. difficile* se detectó en el 3,5 % de las muestras tomadas de superficies en una planta de procesamiento de hamburguesas (Esfandiari et al., 2014). Los autores sugirieron que esta contaminación ambiental podría deberse a cualquier material orgánico residual involucrado en la formación de biopelículas que podría facilitar la

unión de las esporas de *C. difficile* a la carne procesada. Sin embargo, en un estudio realizado en plantas de fabricación de salchichas, los hisopos recogidos de los equipos e instalaciones no presentaron *C. difficile*, mientras que las muestras de canal resultaron positivas para la bacteria (Harvey et al., 2011), sugiriendo que las canales podrían estar contaminadas por contacto con contenido fecal durante el procesamiento, más que por contacto con otra fuente, como las biopelículas o a través de las manos del personal (Rodríguez et al., 2016).

1.5 Medidas para el control de *Clostridioides difficile* en alimentos

Las células vegetativas de *C. difficile* se pueden inactivar fácilmente, pero el control de la transmisión de las formas esporuladas de *C. difficile* es un desafío para la industria alimentaria. La resistencia de las esporas al calor y los desinfectantes comúnmente utilizados en los protocolos de saneamiento (Dixit et al., 2005; Gil et al., 2016; Settle & Wilcox, 2008; Shapey et al., 2008) facilita su supervivencia en superficies, aumentando la posibilidad de contaminación cruzada a los alimentos, pudiendo actuar éstos a su vez como vehículos para la transmisión. A pesar de su alta resistencia, las esporas pueden eliminarse selectivamente mediante la alteración específica de alguna estructura o biomolécula esencial para su metabolismo, sin comprometer la calidad de los alimentos (Setlow, 2014).

*1.5.1 Control ambiental de *Clostridioides difficile*: desinfección de superficies*

La desinfección de las superficies en la industria alimentaria es fundamental para garantizar la inocuidad de los alimentos, evitando posibles toxiinfecciones alimentarias y consiguiendo una mayor vida comercial del producto.

Por sí misma, la limpieza con detergente ha demostrado ser insuficiente para la descontaminación de las superficies (Fawley et al., 2007). La recomendación para el control de la contaminación ambiental con *C. difficile* se basa en una limpieza meticulosa seguida de una desinfección con esporocidas, especialmente a base de cloro a una concentración de 1000 ppm (Department of Health and Health Protection Agency, 2008; Kaatz et al., 1988; Rutala, 1996; Schulster et al., 2004; Wilcox et al., 2003). El cloro a concentraciones de 1000-1600 ppm ha demostrado ser efectivo para reducir las esporas de *C. difficile* al dañar las proteínas del córtex, no el ADN en sí mismo (Hacek et al., 2010; Kaatz et al., 1988). Otros autores únicamente encontraron una eficacia

consistente con niveles más altos de cloro o aumentando el tiempo de exposición (> 30 minutos) (MacLeod-Glover & Sadowski, 2010; Perez et al., 2005).

Aparte de los desinfectantes clorados, otros esporocidas empleados en la industria alimentaria con actividad frente a *C. difficile* son el glutaraldehído a una concentración del 2 %, el peróxido de hidrógeno al 7 % o el ácido peracético al 0,26 % (Perez et al., 2005; Wullt et al., 2003). El alcohol isopropílico al 70 % no mostró actividad esporocida frente a *C. difficile* (Fawley et al., 2007; Wullt et al., 2003).

1.5.2 Inactivación de Clostridioides difficile por métodos físicos

El tratamiento térmico es uno de los métodos físicos empleados en la industria alimentaria para inactivar microorganismos. Se ha observado un efecto inhibitorio sobre las esporas de *C. difficile* a temperaturas mayores de 96 °C (> 204,8 °F) durante 15 minutos (Rodríguez-Palacios & Lejeune, 2011). Sin embargo, Redondo-Solano et al. (2016) encontraron una subestimación en la resistencia térmica de las esporas de *C. difficile* cuando se analizaba en medios líquidos. Estos autores sugieren que el uso de una matriz alimentaria específica para la determinación de la resistencia térmica de las esporas de *C. difficile* es necesario para predecir la letalidad de un proceso térmico durante el procesamiento de alimentos.

El tratamiento tecnológico de alta presión hidrostática es otra de las técnicas empleadas en la conservación de los alimentos, debido a las reducciones en las poblaciones microbianas que se puede lograr sin una elevación significativa de la temperatura del producto, preservando su calidad nutricional y sensorial. Sin embargo, estos procesos no son tan efectivos para reducir los niveles de esporas de *C. difficile* como los resultados de inhibición que se obtienen con las esporas de otros microorganismos esporulados (Doona et al., 2016).

El tratamiento por microondas tiene la capacidad de lograr la destrucción de microorganismos a temperaturas menores que la de la pasteurización convencional, debido a un aumento significativo del efecto térmico. Ojha et al. (2016) reportaron la inhibición completa de la viabilidad de las esporas de *C. difficile* tras el tratamiento con microondas a 800 W durante 60 segundos, efecto que no se observó en esporas sometidas a 98 °C durante el mismo periodo de tiempo.

Los tratamientos de radiación también se emplean como esporocida por su capacidad de dañar el ADN de los microorganismos. Sin embargo, Shaikh et al. (2016) demostraron que la radiación ultravioleta es poco efectiva contra las esporas de *C.*

difficile, requiriéndose 4 o 5 ciclos de exposición para lograr una reducción de > 1 log en condiciones *in vitro*. Sin embargo, es plausible que pueda ser efectivo en la reducción de *C. difficile* en entornos reales, con cargas microbianas más bajas.

1.5.3 Inactivación de *Clostridioides difficile* por métodos químicos

Dentro de los aditivos autorizados por la Unión Europea, se ha impuesto el uso de ácidos orgánicos (sorbico, benzoico, fórmico, láctico, acético, propiónico, cítrico, málico y fumárico) y de sus sales, frente a los ácidos inorgánicos. Esto es debido a su mayor poder acidificante, estabilidad a variaciones de pH, luz y altas temperaturas (Fredua-Agyeman et al., 2017). Estos ácidos orgánicos pueden inhibir el crecimiento de *C. difficile*, debido a su capacidad acidificante del medio y a la dependencia del pH para la inhibición de *C. difficile* descrita por Schoster et al. (2013).

Naaber et al. (2004) informaron de la correlación positiva entre la producción de peróxido de hidrógeno y ácido láctico derivados del metabolismo de lactobacilos intestinales, con la inhibición de *C. difficile*. Otros autores también han demostrado que la inhibición del crecimiento de *C. difficile* depende de la producción de ácido láctico y acético por parte de bacterias ácido lácticas (BAL) (Tejero-Sariñena et al., 2012; Trejo et al., 2006).

Otros aditivos químicos empleados para controlar microorganismos esporulados, como *C. perfringens* o *C. botulinum*, podrían ser igualmente efectivos contra *C. difficile* (Lund & Peck, 2015; Talukdar et al., 2017), generando un valor añadido al producto final al modificar de manera favorable sus características. Las sales de nitrato y de nitrito son conservantes químicos capaces de inhibir a bacterias formadoras de esporas, aunque su uso en productos alimentarios es limitado debido a su capacidad para formar nitrosaminas, derivados potencialmente genotóxicos (EFSA, 2017). Lim et al. (2016) demostraron la capacidad de *C. difficile* de sobrevivir en presencia de nitrito, nitrato y metabisulfito de sodio a concentraciones superiores del nivel máximo permitido por la Unión Europea en productos alimentarios. Es por tanto que se hace necesario buscar alternativas entre las cuales destacan los probióticos y antimicrobianos naturales como ácidos orgánicos, enzimas y extractos vegetales.

1.5.4 Efecto de los antimicrobianos naturales frente *Clostridioides difficile*

Existen agentes derivados de fuentes naturales, incluidos animales, plantas y microorganismos, con capacidad para inhibir el crecimiento de microorganismos

esporulados y que presentan un potencial prometedor para ser empleados como conservantes de alimentos (Talukdar et al., 2017).

Diversos estudios han aplicado la biopreservación mediante el uso de BAL aisladas de productos lácteos, cárnicos, pescados y vegetales, utilizando sus propiedades antibacterianas, atribuidas a los productos finales de su metabolismo como son el ácido láctico, acético, peróxido de hidrógeno o diacetaldehído. Estos ácidos orgánicos contribuyen a la estabilidad de los alimentos mediante la inhibición de microorganismos alterantes, así como al desarrollo de sabor, aroma y textura. Además de la producción de ácidos orgánicos, las BAL pueden producir sustancias de bajo peso molecular (ácidos grasos de cadena corta y péptidos antibacterianos), así como bacteriocinas y algunos antibióticos, todos ellos útiles en la inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos (Oelschlaeger, 2010). Se han descrito numerosas bacteriocinas con diferentes grados de actividad frente a *C. difficile*, con potencial para su uso como conservantes, por su seguridad y ausencia de cambios sensoriales con los alimentos (Mills et al., 2017). La nisina y lacticina 3147, bacteriocinas sintetizadas por *Lactococcus lactis*, han demostrado ser eficaces para inhibir el crecimiento de *C. difficile* (Bartoloni et al., 2004; Le Lay et al., 2016; Rea et al., 2007). Sin embargo, al tratarse de antimicrobianos de amplio espectro afectan a la mayoría de las especies gram positivas, incluidas aquellas que se considerarían beneficiosas para la salud intestinal humana, como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Rea et al., 2007). En cambio, la bacteriocina turicina CD, producida por *Bacillus thuringiensis*, presenta una potente actividad frente a *C. difficile*, mientras que tiene un impacto mínimo en la composición de la microbiota (Rea et al., 2010).

Otros productos naturales, como aceites o extractos vegetales, también mostraron actividad frente *C. difficile*. Entre ellos se encuentran el jugo de ajo, aceites esenciales -como el mentol, timol y geraniol- y los compuestos puros trans-cinamaldehído, alicina, mentol y zingerona (Aljarallah, 2016, 2017; Roshan et al., 2017).

1.5.5 Efecto de los probióticos contra Clostridioides difficile

Otra estrategia para el control de *C. difficile* en los alimentos sería el empleo de probióticos con capacidad para inhibir el crecimiento de *C. difficile* (Schoster et al., 2013), aunque su actividad se espera que ocurra en el tracto gastrointestinal, contrarrestando el crecimiento de los patógenos introducidos a partir de alimentos y ambientes contaminados.

La mayoría de los probióticos empleados son BAL pertenecientes a los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, que presentan excelentes propiedades preventivas frente a diversas patologías, incluida la enfermedad entérica clostridial en humanos (Gao et al., 2010; Hickson, 2011; Kopp-Hoolihan, 2001; Sanders et al., 2013). Existen tres tipos de probióticos -*Saccharomyces boulardii*, *Lactobacillus rhamnosus* GG, y mezclas de probióticos- capaces de reducir significativamente el desarrollo de diarrea asociada a antibióticos aunque únicamente la levadura *S. boulardii* se ha demostrado efectiva contra la CDI (McFarland, 2006).

Además de la inmunomodulación del huésped y la posible inhibición de la producción de toxinas bacterianas (Markowiak & Ślizewska, 2017), los principales mecanismos de los probióticos implicados en el mantenimiento del equilibrio de la microbiota intestinal del huésped y en la profilaxis de infecciones, son la competencia con patógenos para la adhesión al epitelio (Guillot, 2003) y el antagonismo a través de la producción de sustancias antimicrobianas (Vandenbergh, 1993). La capacidad de las cepas probióticas de coagregarse y adherirse a las células epiteliales puede conducir a la formación de una barrera protectora que previene a las bacterias patógenas de la colonización del epitelio (Oelschlaeger, 2010). Por otro lado, la disminución del pH intestinal por parte de los probióticos crea un ambiente ácido que puede interferir en el crecimiento y colonización de microorganismos patógenos (Markowiak & Ślizewska, 2017; Vandenbergh, 1993).

Bibliografía

- Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología médica. (2012). *Enfermedades transmitidas por alimentos. Ficha técnica nº5 Toxiinfección por Clostridium perfringens*. [Acceso 29 Noviembre 2020]. Disponible En: [Http://www.Anmat.Gov.Ar/Webanmat/Publicaciones/Ft_clostridium_perfringens.Pdf](http://www.Anmat.Gov.Ar/Webanmat/Publicaciones/Ft_clostridium_perfringens.Pdf).
- Al Saif, N., & Brazier, J. S. (1996). The distribution of *Clostridium difficile* in the environment of South Wales. *Journal of Clinical Microbiology*, *45*, 133–137.
- Albert, M. C., Mckenney, P. T., & Pamer, E. G. (2016). *Clostridium difficile* colitis: pathogenesis and host defence. *Nature Reviews Microbiology*, *14*(10), 609–620.
- Alcalá-Hernández, L., Marín-Arriaza, M., Mena-Ribas, A., & Niubó-Bosh, J. (2015). Diagnóstico microbiológico de la infección por *Clostridium difficile*. 53. Procedimientos en Microbiología Clínica. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. In *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (Vol. 34, Issue 9).
- Alcalá-Hernández, L., Mena-Ribas, A., Niubó Bosh, J., & Marín-Arriaza, M. (2016). Diagnóstico microbiológico de la infección por *Clostridium difficile*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *34*(9), 595–602.
- Aljarallah, K. M. (2016). Inhibition of *Clostridium difficile* by natural herbal extracts. *Journal of Taibah University Medical Sciences*, *11*(5), 427–431.
- Aljarallah, K. M. (2017). Conventional and alternative treatment approaches for *Clostridium difficile* infection. *International Journal of Health Sciences*, *11*(1), 1–10.
- Allegretti, J. R., Kearney, S., Li, N., Bogart, E., Bullock, K., Gerber, G. K., Bry, L., Clish, C. B., Alm, E., & Korzenik, J. R. (2016). Recurrent *Clostridium difficile* Infection Associates with Distinct Bile Acid and Microbiome profiles. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, *43*(11), 1142–1153.
- Alvarez-Pérez, S., Blanco, J. L., Bouza, E., Alba, P., Gibert, X., Maldonado, J., & Garcia, M. E. (2009). Prevalence of *Clostridium difficile* in diarrhoeic and non-diarrhoeic piglets. *Veterinary Microbiology Journal*, *137*, 302–305.
- Arroyo, L. G., Rousseau, J., Willey, B. M., Low, D. E., Staempfli, H., McGeer, A., & Weese, J. S. (2005). Use of a Selective Enrichment Broth To Recover *Clostridium difficile* from Stool Swabs Stored under Different Conditions. *J. Clin. Microbiol.* *2005*, *43*(10), 5341–5343.

- Aspinall, S. T., & Hutchinson, D. N. (1992). New selective medium for isolating *Clostridium difficile* from faeces. *Journal of Clinical Pathology*, 45(February), 812–814.
- Avbersek, J., Cotman, M., & Ocepek, M. (2011). Detection of *Clostridium difficile* in animals: comparison of real-time PCR assays with the culture method. *Journal of Medical Microbiology*, 60(Pt 8), 1119–1125.
- Avbersek, J., Zajc, U., Gruntar, I., Krt, B., & Ocepek, M. (2017). Evaluation and comparison of DNA extraction kits for the detection of *Clostridium difficile* in spiked and field faeces from piglets by real-time PCR. *Slovenian Veterinary Research*, 54(4), 143–148.
- Barbut, F., Decré, D., Lalande, V., Burghoffer, B., Noussair, L., Gigandon, A., Espinasse, F., Raskine, L., Robert, J., Mangeol, A., Branger, C., & Petit, J. C. (2005). Clinical features of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea due to binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase)-producing strains. *Journal of Medical Microbiology*, 54(2), 181–185.
- Barra-Carrasco, J., & Paredes-Sabja, D. (2014). *Clostridium difficile* spores: a major threat to the hospital environment. *Future Microbiology*, 9, 475–486.
- Bartoloni, A., Mantella, A., Goldstein, B. P., Dei, R., Benedetti, M., Sbaragli, S., & Paradisi, F. (2004). *In-Vitro* Activity of Nisin Against Clinical Isolates of *Clostridium difficile*. *Journal of Chemotherapy*, 16(2), 119–121.
- Bauer, M., Kuijper, E., & van Dissel, J. (2009). European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection (CDI). *Clinical Microbiology and Infection : The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 15(12), 1067–1079.
- Bauer, M. P., Notermans, D. W., van Benthem, B. H. B., Brazier, J. S., Wilcox, M. H., Rupnik, M., Monnet, D. L., van Dissel, J. T., & Kuijper, E. J. (2011). *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey. *The Lancet*, 377(9759), 63–73.
- Båverud, V., Gustafsson, A., Franklin, A., Aspán, A., & Gunnarsson, A. (2003). *Clostridium difficile*: prevalence in horses and environment, and antimicrobial susceptibility. *Equine Veterinary Journal*, 35(5), 465–471.
- Blanco, J. L., Álvarez-Pérez, S., & García, M. E. (2013). Is the prevalence of *Clostridium difficile* in animals underestimated? *Veterinary Journal*, 197(3), 694–

698.

- Borriello, S. P., Honour, P., Turner, T., & Barclay, F. (1983). Household pets as a potential reservoir for *Clostridium difficile* infection. *Journal of Clinical Pathology*, *36*(1983), 84–87.
- Buggy, B. P., Hawkins, C. C., & Fekety, R. (1985). Effect of Adding Sodium Taurocholate to Selective Media on the Recovery of *Clostridium difficile* from Environmental Surfaces. *Journal of Clinical Microbiology*, *21*(4), 636–637.
- Clabots, C. R., Gerding, S. J., Olson, M. M., Peterson, L. R., & Gerding, D. N. (1989). Detection of asymptomatic *Clostridium difficile* carriage by an alcohol shock procedure. *Journal of Clinical Microbiology*, *27*(10), 2386–2387.
- Cohen, S. H., Gerding, D. N., Johnson, S., Kelly, C. P., Loo, V. G., McDonald, L. C., Pepin, J., & Wilcox, M. H. (2010). Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults: 2010 update by the society for healthcare epidemiology of America (SHEA) and the infectious diseases society of America (IDSA). *Infection Control and Hospital Epidemiology*, *31*(5), 431–455.
- Cózar-Llistó, A., Ramos-Martinez, A., & Cobo, J. (2016). *Clostridium difficile* Infection in Special High-Risk Populations. *Infectious Diseases and Therapy*, *5*, 1–17.
- Crobach, M. J. T., Dekkers, O. M., Wilcox, M. H., & Kuijper, E. J. (2009). European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): data review and recommendations for diagnosing *Clostridium difficile*-infection (CDI). *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *15*(12), 1053–1066.
- D'Ari, L., & Barker, H. A. (1985). p-Cresol formation by cell-free extracts of *Clostridium difficile*. *Archives of Microbiology*, *143*(3), 311–312.
- Dapa, T., Leuzzi, R., Ng, Y. K., Baban, S. T., Adamo, R., Kuehne, S. A., Scarselli, M., Minton, N. P., Serruto, D., & Unnikrishnan, M. (2013). Multiple factors modulate biofilm formation by the anaerobic pathogen *Clostridium difficile*. *Journal of Bacteriology*, *195*(3), 545–555.
- Dawson, L. F., Stabler, R. A., & Wren, B. W. (2008). Assessing the role of p-cresol tolerance in *Clostridium difficile*. *Journal of Medical Microbiology*, *57*(6), 745–749.
- Dawson, L. F., Valiente, E., Faulds-Pain, A., Donahue, E. H., Wren, B. W., & Popoff, M. R. (2012). Characterisation of *Clostridium difficile* Biofilm Formation, a Role for Spo0A. *PLoS ONE*, *7*(12).

- Deng, K., Plaza-Garrido, A., Torres, J. A., & Paredes-Sabja, D. (2015). Survival of *Clostridium difficile* Spores at Low Temperatures. *Food Microbiology*, *46*, 218–221.
- Deng, K., Talukdar, P. K., Sarker, M. R., Paredes-Sabja, D., & Torres, J. A. (2017). Survival of *Clostridium difficile* spores at low water activity. *Food Microbiology*, *65*, 274–278.
- Department of Health and Health Protection Agency. (2008). *Clostridium difficile* infection: How to deal with the problem. [Acceso 29 Noviembre 2020]. https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/340851/Clostridium_difficile_infection_how_to_deal_with_the_problem.pdf
- Dixit, A., Alam, S. I., Dhaked, R. K., & Singh, L. (2005). Sporulation and Heat Resistance of Spores from a *Clostridium* sp. RKD. *Journal of Food Science*, *70*(7), 367–373.
- Doona, C. J., Feeherry, F. E., Setlow, B., Wang, S., Li, W., Nichols, F. C., Talukdar, P. K., Sarker, M. R., Li, Y. Q., Shen, A., & Setlow, P. (2016). Effects of high-pressure treatment on spores of *Clostridium* species. *Applied and Environmental Microbiology*, *82*(17), 5287–5297.
- Eckert, C., Burghoffer, B., Lalande, V., & Barbut, F. (2013). Evaluation of the chromogenic agar chromID *C. difficile*. *Journal of Clinical Microbiology*, *51*(3), 1002–1004.
- EFSA. (2005). Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on the request from the Commission related to *Clostridium* spp in foodstuffs. *European Food Safety Authority Journal*, *1*(March), 1–65.
- EFSA. (2013). Scientific Opinion on the public health hazards to be covered by inspection of meat (bovine animals). *European Food Safety Authority Journal*, *11*(6), 1–261.
- EFSA. (2017). Re-evaluation of potassium nitrite (E 249) and sodium nitrite (E 250) as food additives. *European Food Safety Authority Journal*, *15*(6).
- Esfandiari, Z., Weese, S., Ezzatpanah, H., Jalali, M., & Chamani, M. (2014). Occurrence of *Clostridium difficile* in seasoned hamburgers and seven processing plants in Iran. *BMC Microbiology*, *14*(283), 1–7.
- Fawley, W. N., Underwood, S., Freeman, J., Baines, S. D., Saxton, K., Stephenson, K., Owens, R. C., & Wilcox, M. H. (2007). Efficacy of Hospital Cleaning Agents and

- Germicides Against Epidemic *Clostridium difficile* Strains. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 28(08), 920–925.
- Fedorko, D. P., & Williams, E. C. (1997). Use of cycloserine-cefoxitin-fructose agar and L-proline-aminopeptidase (PRO Discs) in the rapid identification of *Clostridium difficile*. *J. Clin. Microbiol.*, 35(5), 1258–1260.
- Flock, G., Chen, C.-H., Yin, H.-B., Fancher, S., Mooyottu, S., & Venkitanarayanan, K. (2016). Effect of chilling, freezing and cooking on survivability of *Clostridium difficile* spores in ground beef. *Meat Science*, 112, 161.
- Flock, Genevieve. (2017). *Clostridium difficile: A Study on its Potential as a Food-borne Pathogen and Strategies for Controlling its Transmission [Tesis doctoral, Universidad de Connecticut]*. <https://opencommons.uconn.edu/dissertations/1584>
- Fordtran, J. S. (2006). Colitis due to *Clostridium difficile* toxins: underdiagnosed, highly virulent, and nosocomial. *Proceedings (Baylor University. Medical Center)*, 19(1), 3–12.
- Foster, N. F., & Riley, T. V. (2012). Improved recovery of *Clostridium difficile* spores with the incorporation of synthetic taurocholate in cycloserine-cefoxitin-fructose agar (CCFA). *Pathology*, 44(4), 354–356.
- Fredua-Agyeman, M., Stapleton, P., Basit, A. W., Beezer, A. E., & Gaisford, S. (2017). *In vitro* inhibition of *Clostridium difficile* by commercial probiotics: A microcalorimetric study. *International Journal of Pharmaceutics*, 517(1–2), 96–103.
- Freeman, J., Bauer, M. P., Baines, S. D., Corver, J., Fawley, W. N., Goorhuis, B., Kuijper, E. J., & Wilcox, M. H. (2010). The changing epidemiology of *Clostridium difficile* infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(3), 529–549.
- Freschi, C. R., Fernando, L., Oliveira, D., Carvalho, S., José, C., & Oliveira, B. D. (2005). Comparison of DNA-extraction methods and selective enrichment broths on the detection of *Salmonella Typhimurium* in swine feces by polymerase chain reaction (PCR). *Brazilian Journal of Microbiology*, 36, 363–367.
- Gao, X. W., Mubasher, M., Fang, C. Y., Reifer, C., & Miller, L. E. (2010). Dose-response efficacy of a proprietary probiotic formula of *Lactobacillus acidophilus* CL1285 and *Lactobacillus casei* LBC80R for antibiotic-associated diarrhea and *Clostridium difficile*-associated diarrhea prophylaxis in adult patients. *American Journal of Gastroenterology*, 105(7), 1636–1641.
- Gauvry, E., Mathot, A. G., Leguériel, I., Couvert, O., Postollec, F., Broussolle, V., &

- Coroller, L. (2016). Knowledge of the physiology of spore-forming bacteria can explain the origin of spores in the food environment. *Research in Microbiology*, 168(4), 369–378.
- George, W., & Sutter, V. (1979). Selective and differential medium for isolation of *Clostridium difficile*. *Journal of Clinical Microbiology*, 9(2), 214–219.
- Ghosh, S., Zhang, P., Li, Y. Q., & Setlow, P. (2009). Superdormant spores of *Bacillus* species have elevated wet-heat resistance and temperature requirements for heat activation. *Journal of Bacteriology*, 191(18), 5584–5591.
- Gil, F., Lagos-Moraga, S., Calderón-Romero, P., Pizarro-Guajardo, M., & Paredes-Sabja, D. (2016). Updates on *Clostridium difficile* spore biology. *Anaerobe*, 45, 3–9.
- Goorhuis, A., Bakker, D., Corver, J., Debast, S. B., Harmanus, C., Notermans, D. W., Bergwerff, A., Dekker, F. W., & Kuijper, E. J. (2008). Emergence of *Clostridium difficile* infection due to a new hypervirulent strain, polymerase chain reaction ribotype 078. *Clinical Infectious Diseases*, 47(9), 1162–1170.
- Guillot, J. F. (2003). Probiotic feed additives. *The Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* (Vol. 26).
- Hacek, D. M., Ogle, A. M., Fisher, A., Robicsek, A., & Peterson, L. R. (2010). Significant impact of terminal room cleaning with bleach on reducing nosocomial *Clostridium difficile*. *American Journal of Infection Control*, 38(5), 350–353.
- Hafiz, S., & Oakley, C. L. (1976). *Clostridium difficile*: Isolation and Characteristics. *Journal Medical Microbiology*, 9, 129–137.
- Hall, I., & O'Toole, E. (1935). Intestinal flora in newborn infants: with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. *The American Journal of Diseases of Children*, 49:390.
- Harvey, R. B., Norman, K. N., Andrews, K., Norby, B., Hume, M. E., Scanlan, C. M., Hardin, M. D., & Scott, H. M. (2011). *Clostridium difficile* in retail meat and processing plants in Texas. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23(4), 807–811.
- Hawken, P. H. I., Eese, J. S. W., Friendship, R., & Eith, K. (2013). Longitudinal study of *Clostridium difficile* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with pigs from weaning through to the end of processing. *Journal of Food Protection*, 76(4), 624–630.
- Hensgens, M. P. M., Keessen, E. C., Squire, M. M., Riley, T. V., Koene, M. G. J., Boer,

- E. De, & Lipman, L. J. A. (2012). *Clostridium difficile* infection in the community: a zoonotic disease? *Clinical Microbiology and Infection*, 18(7), 635–645.
- Heredia, N. L., & Labbé, R. G. (2013). *Clostridium perfringens*, in Guide to Foodborne Pathogens (2nd ed.) *John Wiley & Sons, Oxford*.
- Heyndrickx, M. (2011). The Importance of Endospore-Forming Bacteria Originating from Soil for Contamination of Industrial Food Processing. *Applied and Environmental Soil Science*, 2011, 1–11.
- Hickson, M. (2011). Probiotics in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea and *Clostridium difficile* infection. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 4(3), 185–197.
- Hink, T., Burnham, C.-A. D., & Dubberke, E. R. (2013). A systematic evaluation of methods to optimize culture-based recovery of *Clostridium difficile* from stool specimens. *Anaerobe*, 19, 39–43.
- Hoover, D. G., & Rodriguez-Palacios, A. (2013). Transmission of *Clostridium difficile* in Foods. *Infectious Disease Clinics of North America*, 27(3), 675–685.
- Hopman, N. E., Keessen, E. C., Harmanus, C., Sanders, I. M. J. G., van Leengoed, L. A. M. G., Kuijper, E. J., & Lipman, L. J. A. (2011). Acquisition of *Clostridium difficile* by piglets. *Veterinary Microbiology*, 149(1–2), 186–192.
- Hopman, N. E., Oorburg, D., Sanders, I., Kuijper, E. J., & Lipman, L. J. (2011). High occurrence of various *Clostridium difficile* PCR ribotypes in pigs arriving at the slaughterhouse. *Veterinary Quarterly*, 31(4), 179–181.
- Houser, B. A., Hattel, A. L., & Jayarao, B. M. (2010). Real-time multiplex polymerase chain reaction assay for rapid detection of *Clostridium difficile* toxin-encoding strains. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(6), 719–726.
- Houser, B. A., Soehnlen, M. K., Wolfgang, D. R., Lysczek, H. R., Burns, C. M., & Jayarao, B. M. (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.
- Indra, A., Lassnig, H., Baliko, N., Much, P., Fiedler, A., & Huhulescu, S. (2009). *Clostridium difficile*: a new zoonotic agent? *Wiener Klinische Wochenschrift*, 121, 91–95.
- Indra, A., Schmid, D., Huhulescu, S., Simons, E., Hell, M., Stickler, K., Equiluz-bruck, S., Feierl, G., Geppert, F., Janata, O., König, U., Leeb, M., Lenger, A., Szupancsitz, M., Tomantschger, H., & Wechsler, A. (2015). *Clostridium difficile*

- ribotypes in Austria: a multicenter, hospital-based survey. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 127, 587–593.
- Janezic, S., Ocepek, M., Zidaric, V., & Rupnik, M. (2012). *Clostridium difficile* genotypes other than ribotype 078 that are prevalent among human, animal and environmental isolates. *BMC Microbiology*, 12(1999), 48.
- Janezic, S., & Rupnik, M. (2015). Genomic diversity of *Clostridium difficile* strains. *Research in Microbiologoy*, 166(4), 353–360.
- Janezic, S., Zidaric, V., Pardon, B., Indra, A., Kokotovic, B., Blanco, J. L., Seyboldt, C., Diaz, C. R., Poxton, I. R., Perreten, V., Drigo, I., & Jiraskova, A. (2014). International *Clostridium difficile* animal strain collection and large diversity of animal associated strains. *BMC Microbiology*, 14, 173.
- Janoir, C. (2016). Virulence factors of *Clostridium difficile* and their role during infection. *Anaerobe*, 37, 13–24.
- Jump, R. L. P., Pultz, M. J., & Donskey, C. J. (2007). Vegetative *Clostridium difficile* survives in room air on moist surfaces and in gastric contents with reduced acidity: a potential mechanism to explain the association between proton pump inhibitors and *C. difficile*-associated diarrhea? *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(8), 2883–2887.
- Kaatz, G. W., Gitlin, S. D., Schaberg, D. R., Wilson, K. H., Kauffman, C. A., Seo, S. M., & Fekety, R. (1988). Acquisition of *Clostridium difficile* from the hospital environment. *American Journal of Epidemiology*, 127(6), 1289–1294.
- Kamiya, S., Yamakawa, K., Ogura, H., & Nakamura, S. (1989). Recovery of spores of *Clostridium difficile* altered by heat or alkali. *Journal Medical Microbiology*, 28(1989), 217–221.
- Keel, K., Brazier, J. S., Post, K. W., Weese, S., & Songer, J. G. (2007). Prevalence of PCR ribotypes among *Clostridium difficile* isolates from pigs, calves, and other species. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(6), 1963–1964.
- Knight, D. R., Elliott, B., Chang, B. J., Perkins, T. T., & Riley, V. (2015). Diversity and Evolution in the Genome of *Clostridium difficile*. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), 721–741.
- Knight, D. R., Putsathit, P., Elliott, B., & Riley, T. V. (2016). Contamination of Australian newborn calf carcasses at slaughter with *Clostridium difficile*. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(3), 266.e1-7.
- Knight, D. R., Squire, M. M., Collins, D. A., & Riley, T. V. (2017). 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(JAN).
- Koene, M. G. J., Mevius, D., Wagenaar, J. A., Harmanus, C., Hensgens, M. P. M., Meetsma, A. M., & Putirulan, F. F. (2012). *Clostridium difficile* in Dutch animals: their presence, characteristics and similarities with human isolates. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(8), 778–784.
- Koo, H. L., Darkoh, C., Koo, D. C., Van, J., Jiang, Z.-D., Dildy, T., Price, M., Garey, K. W., & DuPont, H. (2012). Contamination of Hospital Food with *Clostridium difficile*. Presented at the Poster Abstract Session: *C. Difficile* Prevention and Carriage, Infections Diseases Society of America (IDSA) Conference, Thursday, October 18, 2012.
- Kopp-Hoolihan, L. (2001). Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: A review. In *Journal of the American Dietetic Association*. 101 (2) 229–241).
- Koransky, J. R., Allen, S. D., & Dowell, V. R. (1978). Use of ethanol for selective isolation of sporeforming microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 35(4), 762–765.
- Kramer, A., Schwebke, I., & Kampf, G. (2006). How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infectious Diseases*, 6, 130.
- Kuijper, E. J., Coignard, B., & Tüll, P. (2006). Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, 12(6), 2–18.
- Lantz, P.-G., Matsson, M., Wadström, T., & Radström, P. (1997). Methods Removal of PCR inhibitors from human faecal samples through the use of an aqueous two-phase system for sample preparation prior to. *Journal of Microbiological Methods*, 28, 159–167.
- Lawson, P. A., Citron, D. M., Tyrrell, K. L., & Finegold, S. M. (2016). Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O’Toole 1935) Prévot 1938. *Anaerobe*, 40, 95–99.
- Le Lay, C., Dridi, L., Bergeron, M. G., Ouellette, M., & Fliss, I. (2016). Nisin is an effective inhibitor of *Clostridium difficile* vegetative cells and spore germination. *Journal of Medical Microbiology*, 65(2), 169–175.
- Lemee, L., Dhalluin, A., Testelin, S., Matrat, M., Maillard, K., & 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.
- Levett, P., & Phillips, K. (1985). Gas chromatographic identification of *Clostridium difficile* and detection of cytotoxin from a modified selective medium. *Journal of Clinical Pathology*, 38, 82–85.
- Levi, K., & Towner, K. J. (2005). Rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from screening enrichment broths by real-time PCR. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 24, 423–427.
- Lim, S. C., Foster, N. F., & Riley, T. V. (2016). Susceptibility of *Clostridium difficile* to the food preservatives sodium nitrite, sodium nitrate and sodium metabisulphite. *Anaerobe*, 37, 67–71.
- Ludwig, W., Schleifer, K., & Whitman, W. B. (2009). Revised road map to the phylum Firmicutes. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, Online, 2009, 1–13.
- Lund, B. M., & Peck, M. W. (2015). A possible route for foodborne transmission of *Clostridium difficile*? *Foodborne Pathogens and Disease*, 12(3), 177–182.
- Lyerly, D., Lockwood, D., Richardson, S., & Wilkins, T. D. (1982). Biological Activities of Toxins A and B of *Clostridium difficile*. *Infection and Immunity*, 35(3), 1032–1040.
- MacLeod-Glover, N., & Sadowski, C. (2010). Efficacy of cleaning products for *C. difficile*. *Canadian Family Physician*, 56(5), 417–423.
- Maillard, J. (2011). Innate resistance to sporicides and potential failure to decontaminate. *Journal of Hospital Infection*, 77(3), 204–209.
- Markowiak, P., & Ślizewska, K. (2017). Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients*, 9(9).
- Martin-Verstraete, I., Peltier, J., & Dupuy, B. (2016). The regulatory networks that control *Clostridium difficile* toxin synthesis. *Toxins*, 8(5), 1–24.
- Matsuki, T., Watanabe, K., Fujimoto, J., Miyamoto, Y., Takada, T., Matsumoto, K., Oyaizu, H., & Tanaka, R. (2002). Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(11), 5445–5451.
- McFarland, L. V. (2006). Meta-analysis of probiotics for the prevention of antibiotic associated diarrhea and the treatment of *Clostridium difficile* disease. *American*

- Journal of Gastroenterology*, 101(4), 812–822.
- Medina-Torres, C. E., Weese, J. S., & Staempfli, H. R. (2011). Prevalence of *Clostridium difficile* in horses. *Veterinary Microbiology*, 152(1–2), 212–215.
- Metcalf, D. S., Costa, M. C., Dew, W. M. V., & Weese, J. S. (2010). *Clostridium difficile* in vegetables, Canada. *Letters in Applied Microbiology*, 51 (5), 600–602.
- Mills, S., Ross, R. P., & Hill, C. (2017). Bacteriocins and bacteriophage; a narrow-minded approach to food and gut microbiology. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(1), S129–S153.
- Montazeri, N., Liu, D., & Janes, M. E. (2015). Occurrence of toxigenic *Clostridium difficile* in Louisiana oysters (*Crassostrea virginica*) and environmental waters. *Food and Nutrition Sciences*, 6(6), 1065–1070.
- Monteiro, L., Bonnemaïson, D., Vekris, A., Petry, K. G., Me, F., Bonnet, J., & Vidal, R. U. I. (1997). Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(4), 995–998.
- Naaber, P., Smidt, I., Štšepetova, J., Brilene, T., Annuk, H., & Mikelsaar, M. (2004). Inhibition of *Clostridium difficile* strains by intestinal *Lactobacillus* species. *Journal of Medical Microbiology*, 53(6), 551–554.
- Nakamura, S., Nakashio, S., Yamakawa, K., Tanabe, N., & Nishida, S. (1982). Carbohydrate fermentation by *Clostridium difficile*. *Microbiology and Immunology*, 26(2), 107–111.
- Natarajan, M., Walk, S. T., Young, V. B., & Aronoff, D. M. (2013). A clinical and epidemiological review of non-toxigenic *Clostridium difficile*. *Anaerobe*, 22(734), 1–5.
- Nicholson, M., Thomsen, I., & Edwards, K. (2014). Controversies surrounding *Clostridium difficile* infection in infants and young children. *Children*, 1(1), 40–47.
- Nikaeen, M., Aghili Dehnavi, H., Hssanzadeh, A., & Jalali, M. (2015). Occurrence of *Clostridium difficile* in two types of wastewater treatment plants. *Journal of the Formosan Medical Association*, 114(7), 663–665.
- Norman, K N, Harvey, R. B., Andrews, K., Hume, M. E., Callaway, T. R., Anderson, R. C., & Nisbet, D. J. (2014). Survey of *Clostridium difficile* in retail seafood in College Station, Texas. *Food Additives and Contaminants A*, 31(6), 1127–1129.
- Norman, Keri N, Scott, H. M., Harvey, R. B., Norby, B., Hume, M. E., & Andrews, K. (2011). Prevalence and genotypic characteristics of *Clostridium difficile* in a closed and integrated human and swine population. *Applied and Environmental*

- Microbiology*, 77(16), 5755–5760.
- Oelschlaeger, T. A. (2010). Mechanisms of probiotic actions - A review. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(1), 57–62.
- Ojha, S. C., Chankhamhaengdecha, S., Singhakaew, S., Ounjai, P., & Janvilisri, T. (2016). Inactivation of *Clostridium difficile* spores by microwave irradiation. *Anaerobe*, 38, 14–20.
- Otten, M., Reid-Smith, R., Fazil, A., & Weese, J. (2010). Disease transmission model for community-associated *Clostridium difficile* infection. *Epidemiology and Infection*, 138(6), 907–914.
- Pantaléon, V., Soavelomandroso, A. P., Bouttier, S., Briandet, R., Roxas, B., Chu, M., Collignon, A., Janoir, C., Vedantam, G., & Candela, T. (2015). The *Clostridium difficile* protease Cwp84 modulates both biofilm formation and cell- surface properties. *PLoS ONE*, 10(4), 1–20.
- Paredes-Sabja, D., Shen, A., & Sorg, J. (2014). *Clostridium difficile* spore biology: sporulation, germination, and spore structural proteins. *Trends in Microbiology*, 22(7), 406–416.
- Pasquale, V., Romano, V. J., Rupnik, M., Dumontet, S., Čiznar, I., Aliberti, F., Mauri, F., Saggiomo, V., & Krovacek, K. (2011). Isolation and characterization of *Clostridium difficile* from shellfish and marine environments. *Folia Microbiologica*, 56, 431–437.
- Pasquale, V., Romano, V., Rupnik, M., Capuano, F., Bove, D., Aliberti, F., Krovacek, K., & Dumontet, S. (2012). Occurrence of toxigenic *Clostridium difficile* in edible bivalve molluscs. *Food Microbiology*, 31(2), 309–312.
- Peng, Z., Jin, D., Kim, H. B., Stratton, C. W., Wu, B., Tang, Y.-W., & Sun, X. (2017). An update on antimicrobial resistance in *Clostridium difficile*: Resistance mechanisms and antimicrobial susceptibility testing. *Journal of Clinical Microbiology*, 55 (7), 1998-2008.
- Perez, J., Springthorpe, V. S., & Sattar, S. A. (2005). Activity of selected oxidizing microbicides against the spores of *Clostridium difficile*: Relevance to environmental control. *American Journal of Infection Control*, 33(6), 320–325.
- Planche, T., & Wilcox, M. (2011). Reference assays for *Clostridium difficile* infection: one or two gold standards? *Journal of Clinical Pathology*, 64(1), 1–5.
- Poquet, I., Saujet, L., Canette, A., Monot, M., Ghigo, J., Soutourina, O., Briandet, R., Dupuy, B., Poquet, I., Saujet, L., Canette, A., Monot, M., Mihajlovic, J., Poquet, I.,

- Saujet, L., Canette, A., & Monot, M. (2018). *Clostridium difficile* biofilm: Remodeling metabolism and cell surface to build a sparse and heterogeneously aggregated architecture. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2084.
- Porsbo, L. J., & Agersø, Y. (2016). *Clostridium difficile* - A possible zoonotic link (1st ed.). National Food Institute, Technical University of Denmark.
- Primavilla, S., Farneti, S., Petruzzelli, A., Drigo, I., & Scuota, S. (2019). Contamination of hospital food with *Clostridium difficile* in Central Italy. *Anaerobe*, 55, 8–10.
- Rea, M. C., Clayton, E., O'Connor, P. M., Shanahan, F., Kiely, B., Ross, R. P., & Hill, C. (2007). Antimicrobial activity of lacticin 3147 against clinical *Clostridium difficile* strains. *Journal of Medical Microbiology*, 56(7), 940–946.
- Rea, M., Sit, C., Clayton, E., O'Connor, P., Whittal, R., Zheng, J., Vederas, J., Ross, R., & Hill, C. (2010). Thuricin CD, a posttranslationally modified bacteriocin with a narrow spectrum of activity against *Clostridium difficile*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, 107(20), 9352–9357.
- Redondo-Solano, M., Burson, D. E., & Thippareddi, H. (2016). Thermal resistance of *Clostridium difficile* spores in peptone water and pork meat. *Journal of Food Protection*, 79(9), 1468–1474.
- Ridlon, J. M., Kang, D. J., & Hylemon, P. B. (2006). Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *Journal of Lipid Research*, 47(2), 241–259.
- Riley, T. V., Brazier, J. S., Hassan, H., Williams, K., & Phillips, K. D. (1987). Comparison of alcohol shock enrichment and selective enrichment for the isolation of *Clostridium difficile*. *Epidemiology and Infection*, 99(2), 355–359.
- Rodriguez-Palacios, A., Koohmaraie, M., & Lejeune, J. (2011). Prevalence, Enumeration, and antimicrobial agent resistance of *Clostridium difficile* in cattle at harvest in the United States. *Journal of Food Protection*, 74(10), 1618–1624.
- Rodriguez-Palacios, A., & Lejeune, J. T. (2011). Moist-heat resistance, spore aging, and superdormancy in *Clostridium difficile*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(9), 3085–3091.
- Rodriguez-Palacios, A., Pickworth, C., Lejeune, J. T., & Loerch, S. (2011). Transient fecal shedding and limited animal-to-animal transmission of *Clostridium difficile* by naturally infected finishing feedlot cattle. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77(10), 3391–3397.
- Rodriguez-Palacios, A., Reid-Smith, R. J., Staemp, H. R., & Weese, J. S. (2010). *Clostridium difficile* survives minimal temperature recommended for cooking

- ground meats. *Anaerobe*, 16, 540–542.
- Rodriguez-Palacios, A., Staempfli, H. R., Duffield, T., & Weese, J. S. (2007). *Clostridium difficile* in retail ground meat, Canada. *Emerging Infectious Diseases*, 13(3), 485–487.
- Rodriguez-Palacios, A., Stampfli, H. R., Duffield, T., Peregrine, A. S., Trotz-williams, L. A., Arroyo, L. G., Brazier, J. S., & Weese, J. S. (2006). *Clostridium difficile* PCR ribotypes in calves, Canada. *Emerging Infectious Diseases*, 12(11), 1730–1736.
- Rodriguez, C., Avesani, V., Van Broeck, J., Taminiau, B., Delmée, M., & Daube, G. (2013). Presence of *Clostridium difficile* in pigs and cattle intestinal contents and carcass contamination at the slaughterhouse in Belgium. *International Journal of Food Microbiology*, 166(2), 256–262.
- Rodriguez, C., Korsak, N., Taminiau, B., Avesani, V., Broeck, J. Van, & Brach, P. (2015). *Clostridium difficile* from food and surface samples in a Belgian nursing home: An unlikely source of contamination. *Anaerobe*, 32, 87–89.
- Rodriguez, C., Taminiau, B., Avesani, V., Broeck, J. Van, Delmée, M., & 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.
- Rodriguez, C., Taminiau, B., Broeck, J. Van, Delme, M., & Daube, G. (2016). *Clostridium difficile* in Food and Animals: A Comprehensive Review. *Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health*, 932, 65–92.
- Rodriguez, C., Taminiau, B., Van Broeck, J., Avesani, V., Delmeé, M., & Daube, G. (2012). *Clostridium difficile* in young farm animals and slaughter animals in Belgium. *Anaerobe*, 18(6), 621–625.
- Romano, V., Albanese, F., Dumontet, S., Krovacek, K., Petrini, O., & Pasquale, V. (2012). Prevalence and genotypic characterization of *Clostridium difficile* from ruminants in Switzerland. *Zoonoses Public Health*, 59(8), 545–548.
- Romano, V., Pasquale, V., Krovacek, K., Mauri, F., Demarta, A., & Dumontet, S. (2012). Toxigenic *Clostridium difficile* PCR ribotypes from wastewater treatment plants in Southern Switzerland. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(18), 6643–6646.
- Roshan, N., Riley, T. V., & Hammer, K. A. (2017). Antimicrobial activity of natural products against *Clostridium difficile* in vitro. *Journal of Applied Microbiology*,

- 123 (1), 92-103.
- Roy Chowdhury, P., Demaere, M., Chapman, T., Worden, P., Charles, I. G., Darling, A. E., & Djordjevic, S. P. (2016). Comparative genomic analysis of toxin-negative strains of *Clostridium difficile* from humans and animals with symptoms of gastrointestinal disease. *BMC Microbiology*, 16(1), 1–13.
- Rupnik, M. (2007). Is *Clostridium difficile*-associated infection a potentially zoonotic and foodborne disease? *Clinical Microbiology and Infection*, 13(5), 457–459.
- Rupnik, Maja, & Songer, J. G. (2010). *Clostridium difficile*: Its potential as a source of foodborne disease. In *Advances in Food and Nutrition Research* (1st ed., Vol. 60, Issue 10).
- Rupnik, Maja, Wilcox, M. H., & Gerding, D. N. (2009). *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. *Nature Reviews. Microbiology*, 7(7), 526–536.
- Rutala, W. A. (1996). APIC guideline for selection and use of disinfectants. *American Journal of Infection Control*, 24, 313–342.
- Sanders, M. E., Guarner, F., Guerrant, R., Holt, P. R., Quigley, E. M., Sartor, R. B., Sherman, P. M., & Mayer, E. A. (2013). An update on the use and investigation of probiotics in health disease. *Gut*, 62(5), 787–796.
- Schoster, A., Kokotovic, B., Permin, A., Pedersen, P. D., Dal Bello, F., & Guardabassi, L. (2013). *In vitro* inhibition of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* by commercial probiotic strains. *Anaerobe*, 20, 36–41.
- Schulster, L., Chinn, R., Arduino, M., Carpenter, J., Donlan, R., & Ashford, D. (2003). Guidelines for Environmental Infection Control in Health-Care Facilities: Recommendations of CDC and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). *American Society for Healthcare Engineering, American Hospital Association*, 52 (RR10), 1-42.
- Sebaihia, M., Wren, B., & Mullany, P, et al. (2006). The multidrug-resistant human pathogen *Clostridium difficile* has a highly mobile, mosaic genome. *Nat Genet*, 38, 779–786.
- Semenyuk, E. G., Laning, M. L., Foley, J., Johnston, P. F., Knight, K. L., Gerding, D. N., & Driks, A. (2014). Spore formation and toxin production in *Clostridium difficile* biofilms. *PLoS ONE*, 9(1).
- Setlow, P. (2014). Spore resistance properties. *Microbiology Spectrum*, 2(5), 1-14.
- Settle, C. D., & Wilcox, M. H. (2008). *Clostridium difficile* and chlorine-releasing

- disinfectants. *The Lancet*, 371, 2008–2008.
- Shaikh, A. A., Ely, D., Cadnum, J. L., Koganti, S., Alhmidi, H., Sankar, C. T., Jencson, A. L., Kundrapu, S., & Donskey, C. J. (2016). Evaluation of a low-intensity ultraviolet-C radiation device for decontamination of computer keyboards. *American Journal of Infection Control*, 44(6), 705–707.
- Shapey, S., Machin, K., Levi, K., & Boswell, T. C. (2008). Activity of a dry mist hydrogen peroxide system against environmental *Clostridium difficile* contamination in elderly care wards. *Journal of Hospital Infection*, 70(2), 136–141.
- Sivsammye, G., & Sims, H. V. (1990). Presumptive identification of *Clostridium difficile* by detection of p-Cresol in prepared peptone yeast glucose broth supplemented with p-hydroxyphenylacetic acid. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(8), 1851–1853.
- Songer, J. G., & Anderson, M. a. (2006). *Clostridium difficile*: an important pathogen of food animals. *Anaerobe*, 12(1), 1–4.
- Songer, J. G., Trinh, H. T., Killgore, G. E., Thompson, A. D., McDonald, L. C., & Limbago, B. M. (2009). *Clostridium difficile* in retail meat products, USA, 2007. *Emerging Infectious Diseases*, 15(5), 819–821.
- Sorg, J. A., & Sonenshein, A. L. (2008). Bile salts and glycine as cogerminants for *Clostridium difficile* spores. *Journal of Bacteriology*, 190(7), 2505–2512.
- Squire, M. M., & Riley, T. V. (2013). *Clostridium difficile* infection in humans and piglets: a “One Health” opportunity. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 365, 299–314.
- Steinmuller, N., Demma, L., Bender, J. B., Eidson, M., & Angulo, F. J. (2006). Outbreaks of enteric disease associated with animal contact: Not just a foodborne problem anymore. *Clinical Infectious Diseases*, 43(12), 1596–1602.
- Stevens, K. A., & Jaykus, L. (2004). Direct detection of bacterial pathogens in representative dairy products using a combined bacterial concentration-PCR approach. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 1115–1122.
- Sullivan, N. M., Pellet, S., & Wilkins, T. D. (1982). Purification and characterization of toxins A and B of *Clostridium difficile*. *Infection and Immunity*, 35(3), 1032–1040.
- Susick, E. K., Putnam, M., Bermudez, D. M., & Thakur, S. (2012). Longitudinal study comparing the dynamics of *Clostridium difficile* in conventional and antimicrobial free pigs at farm and slaughter. *Veterinary Microbiology*, 157(1–2), 172–178.
- Talukdar, P. K., Udombijitkul, P., Hossain, A., & Sarker, M. R. (2017). Inactivation

- strategies for *Clostridium perfringens* spores and vegetative cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(1), 1–13.
- Tansuphasiri, U., Chanyasanha, C., & Cheaochantanakij, N. (2005). An enrichment broth culture-duplex PCR combination assay for the rapid detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in fecal specimens. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 36(5), 1229–1238.
- Tejero-Sariñena, S., Barlow, J., Costabile, A., Gibson, G. R., & Rowland, I. (2012). *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of a range of probiotics against pathogens: Evidence for the effects of organic acids. *Anaerobe*, 18(5), 530–538.
- Trejo, F. M., Minnaard, J., Perez, P. F., & De Antoni, G. L. (2006). Inhibition of *Clostridium difficile* growth and adhesion to enterocytes by *Bifidobacterium* supernatants. *Anaerobe*, 12(4), 186–193.
- Usui, M., Kawakura, M., Yoshizawa, N., San, L. L., Nakajima, C., Suzuki, Y., & Tamura, Y. (2017). Survival and prevalence of *Clostridium difficile* in manure compost derived from pigs. *Anaerobe*, 43, 15–20.
- Vandenbergh, P. A. (1993). Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microbiology Reviews*, 12, 221–238.
- Verlag, F., Dhalluin, A., Lemée, L., Pestel-caron, M., Mory, F., Leluan, G., Lemeland, J., & Pons, J. (2003). Genotypic differentiation of twelve *Clostridium* species by polymorphism analysis of the triosephosphate isomerase (*tpi*) gene. 96, 90–96.
- Voth, D. E., & Ballard, J. D. (2005). *Clostridium difficile* toxins: Mechanism of action and role in disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(2), 247–263.
- Warriner, K., Xu, C., Habash, M., Sultan, S., & Weese, S. J. (2016). Dissemination of *Clostridium difficile* in food and the environment: Significant sources of *C. difficile* community acquired Infection? *Journal of Applied Microbiology*, 122, 542–553.
- Weese, J. S. (2009). *Clostridium difficile* in food — innocent bystander or serious threat? *Clinical Microbiology and Infection*, 16(1), 3–10.
- Weese, J. S., Avery, B. P., Rousseau, J., & Reid-Smith, R. J. (2009). Detection and enumeration of *Clostridium difficile* spores in retail beef and pork. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(15), 5009–5011.
- Weese, J. S., Finley, R., Reid-Smith, R. R., Janecko, N., & Rousseau, J. (2010). Evaluation of *Clostridium difficile* in dogs and the household environment. *Epidemiology and Infection*, 138(08), 1100–1104.
- Weese, J. S., Rousseau, J., Deckert, A., Gow, S., & Reid-Smith, R. J. (2011).

- Clostridium difficile* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* shedding by slaughter-age pigs. *BMC Veterinary Research*, 7(1), 41.
- Weese, J. S., Staempfli, H. R., & Prescott, J. F. (2000). Survival of *Clostridium difficile* and its toxins in equine feces: implications for diagnostic test selection and interpretation. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 12(4), 332–336.
- Wilcox, M. H., Fawley, W. N., Wigglesworth, N., Parnell, P., Verity, P., & Freeman, J. (2003). Comparison of the effect of detergent versus hypochlorite cleaning on environmental contamination and incidence of *Clostridium difficile* infection. *Journal of Hospital Infection*, 54(2), 109–114.
- Wilson, K. H., Kennedy, M. J., & Fekety, F. R. (1982). Use of sodium taurocholate to enhance spore recovery on a medium selective for *Clostridium difficile*. *Journal of Clinical Microbiology*, 15(3), 443–446.
- Wullt, M., Odenholt, I., & Walder, M. (2003). Activity of three disinfectants and acidified nitrite against *Clostridium difficile* spores. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 24(10), 765–768.
- Xu, C., Weese, J. S., Flemming, C., Odumeru, J., & Warriner, K. (2014). Fate of *Clostridium difficile* during wastewater treatment and incidence in Southern Ontario watersheds. *Journal of Applied Microbiology*, 1, 891–904.
- Yutin, N., & Galperin, M. Y. (2013). A genomic update on clostridial phylogeny: Gram-negative spore formers and other misplaced clostridia. *Environmental Microbiology*, 15(10), 2631–2641.
- Zidaric, V., Beigot, S., Lapajne, S., & Rupnik, M. (2010). The occurrence and high diversity of *Clostridium difficile* genotypes in rivers. *Anaerobe*, 16(4), 371–375.
- Zidaric, V., Zemljic, M., Janezic, S., Kocuvan, A., & Rupnik, M. (2008). High diversity of *Clostridium difficile* genotypes isolated from a single poultry farm producing replacement laying hens. *Anaerobe*, 14(6), 325–327.

2. OBJETIVOS DE LA TESIS

2.1 Objetivo general

El objetivo general es ampliar el conocimiento de *Clostridioides difficile* en el entorno alimentario y determinar su presencia en diferentes etapas de la cadena de producción alimentaria.

2.2 Objetivos específicos

1. Detectar las fuentes de contaminación, según las publicaciones científicas, de *Clostridioides difficile* en las diferentes etapas de la cadena de producción alimentaria.
2. Analizar el conocimiento sobre la fisiología microbiana de *C. difficile* en el entorno alimentario.
3. Estudiar la presencia de *C. difficile* en el ganado porcino durante las etapas iniciales de su producción, desarrollando un método sensible y específico para su detección en muestras fecales.
4. Determinar la presencia de *C. difficile* en vísceras de ave adquiridas en la sala de despiece de una planta de procesado de aves.
5. Estudiar la presencia de *C. difficile* en carnes frescas y procesadas de ave y porcino adquiridas en establecimientos de venta al por menor.
6. Determinar la presencia de *C. difficile* en moluscos bivalvos adquiridos en establecimientos de venta al por menor.
7. Evaluar el efecto *in vitro* de sustancias antimicrobianas sobre el crecimiento de *C. difficile*.

**3. JUSTIFICACIÓN, ESTRUCTURA Y DISEÑO EXPERIMENTAL DE LA
TESIS DOCTORAL**

La presente tesis doctoral se presenta como compendio de cinco trabajos previamente publicados. A continuación, se justifican y detallan los objetivos específicos planteados en cada uno de los trabajos:

PUBLICACIÓN 1: A review of *Clostridioides* [*Clostridium*] *difficile* occurrence through the food chain

La epidemiología y la transmisión de *C. difficile*, en particular para las infecciones asociadas a la comunidad, no está completamente definida. La presencia de *C. difficile* en el ganado y en los alimentos sugiere que los productos alimentarios contaminados con esporas podrían ser un vehículo para propagar la infección por *C. difficile*. Sin embargo, actualmente, *C. difficile* no está considerado como un microorganismo causante de enfermedades transmitidas por los alimentos. Los objetivos de esta publicación son:

- *Objetivo específico 1.* Detectar las fuentes de contaminación, según las publicaciones científicas, de *Clostridioides difficile* en las diferentes etapas de la cadena de producción alimentaria.
- *Objetivo específico 2.* Analizar el conocimiento sobre la fisiología microbiana de *C. difficile* en el entorno alimentario.

PUBLICACIÓN 2: Effect of specimen type and processing on the detection of *Clostridioides* [*Clostridium*] *difficile* in piglet faecal samples

Actualmente no se dispone de un método estandarizado para la detección de *C. difficile* a partir de muestras veterinarias. El rendimiento de los ensayos comerciales disponibles para su detección, únicamente validados para su uso en muestras humanas, no se ha evaluado con muestras de origen animal. Por otro lado, son escasos los datos disponibles sobre la presencia de *C. difficile* en muestras de animales destinados al consumo humano en España. Por tanto, se selecciona el ganado porcino, como fuente prevalente de *C. difficile* en animales de abasto, para determinar la presencia de *C. difficile* en la etapa de producción primaria. El objetivo de esta publicación es:

- *Objetivo específico 3.* Estudiar la presencia de *C. difficile* en el ganado porcino durante las etapas iniciales de su producción, desarrollando un método sensible y específico para su detección en muestras fecales.

PUBLICACIÓN 3: Occurrence of *Clostridioides [Clostridium] difficile* in poultry giblets at slaughter and retail pork and poultry meat in southeastern Spain

Son escasos los estudios sobre la presencia de *C. difficile* en de productos cárnicos en Europa. Por ello, se seleccionaron muestras de carne y productos cárnicos de cerdo y ave por ser el tipo de carnes más consumidas en España. Esta publicación es el primer informe que determina la presencia de *C. difficile* en carne fresca y procesada en etapas de preparación y comercialización en España. Los objetivos de esta publicación son:

- *Objetivo específico 4.* Determinar la presencia de *C. difficile* en vísceras de ave adquiridas en la sala de despique de una planta de procesado de aves.
- *Objetivo específico 5.* Estudiar la presencia de *C. difficile* en carnes frescas y procesadas de ave y porcino adquiridas en establecimientos de venta al por menor

PUBLICACIÓN 4: Presence of toxigenic *Clostridioides [Clostridium] difficile* in edible bivalve mollusks in Spain

Se dispone de un número escaso de publicaciones previas sobre la presencia de *C. difficile* en moluscos en las etapas finales de la cadena de producción de alimentos. Por ello, se seleccionaron muestras de mejillones y ostras por ser productos que tradicionalmente se consumen crudos o poco cocidos, y se asocian con frecuencia a la transmisión de enfermedades transmitidas por los alimentos debido a su carácter filtrador. Esta publicación es el primer informe en España que estudia la presencia de *C. difficile* en moluscos adquiridos en la etapa de comercialización, próximos a su consumo. El objetivo de esta publicación es:

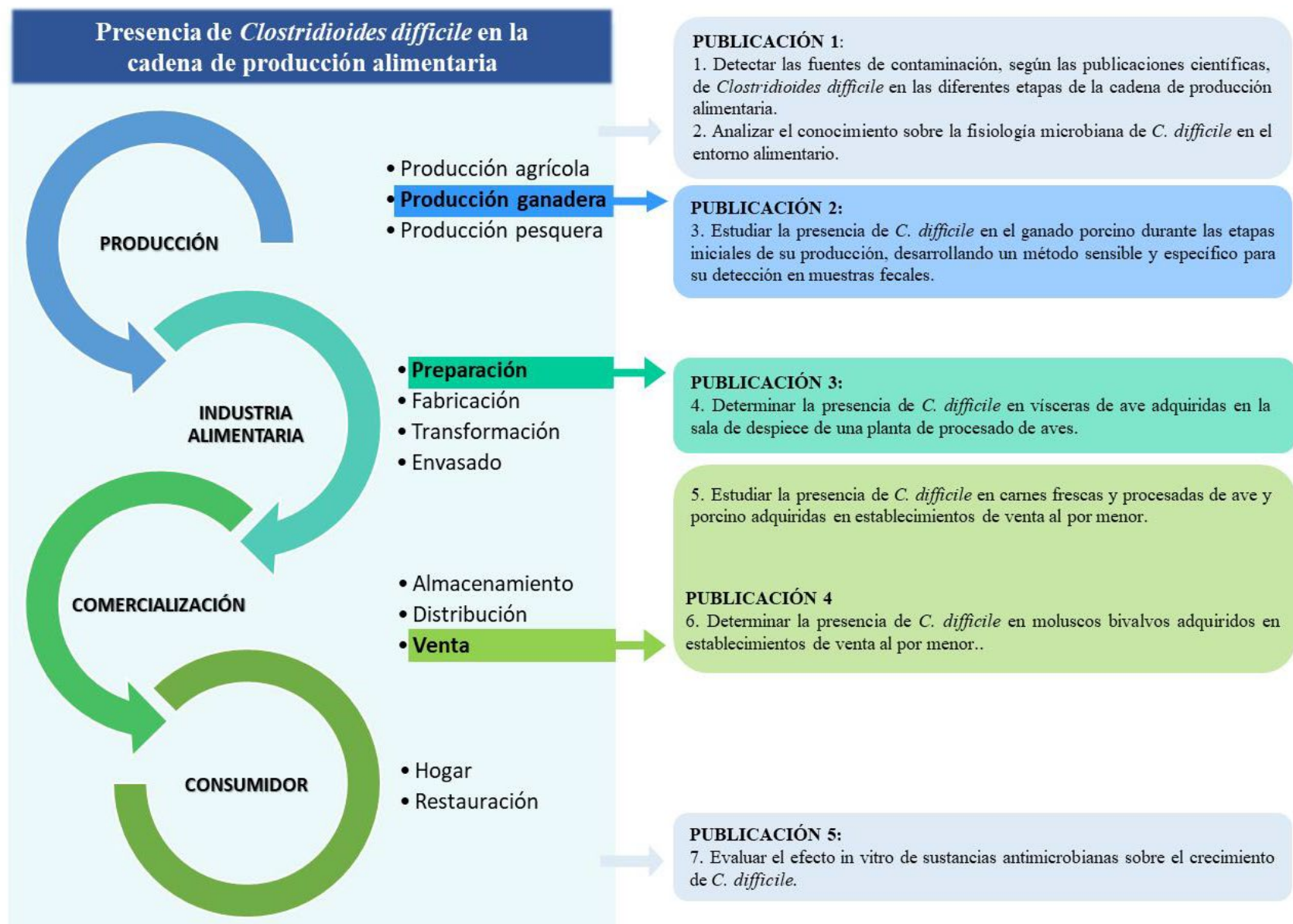
- *Objetivo específico 6.* Determinar la presencia de *C. difficile* en moluscos bivalvos adquiridos en establecimientos de venta al por menor.

PUBLICACIÓN 5: Screening of antibacterial activity of *Moringa oleifera* against pathogenic *Clostridium* spp.

Se ha investigado el uso de antimicrobianos naturales, en concreto extractos vegetales, para ser utilizados en la conservación de alimentos como estrategia de control e inactivación de *C. difficile*. Por ello, se seleccionó la planta *Moringa oleifera*, ampliamente utilizada en la medicina tradicional para tratar una gran variedad de enfermedades, con el fin de estudiar la actividad de diferentes extractos obtenidos de las partes comestibles, contra bacterias formadoras de esporas del género *Clostridium* spp. El objetivo de esta publicación es:

- *Objetivo específico 7. Evaluación del efecto in vitro de diferentes extractos de Moringa oleífera sobre el crecimiento de C. difficile.*

A continuación, se expone una representación esquemática de las diferentes etapas de la cadena de producción alimentaria en las que se ha estudiado la presencia de *C. difficile* a través de las cinco publicaciones que conforman la presente tesis doctoral.



4. PUBLICACIONES ORIGINALES QUE CONFORMAN LA TESIS

DOCTORAL

Revista: *Food Microbiology*

Factor impacto (2018): 4.089

Ámbito: Food Science & Technology

Rango: 14/135 (Q1)



Título: A review of *Clostridioides* [*Clostridium*] *difficile* occurrence through the food chain

Autores: Candel-Pérez C, Ros-Berruezo G, Martínez-Graciá C.

Resumen:

The epidemiology and transmission of *Clostridioides difficile*, particularly for community-associated infections, are not completely understood. Although there have been no confirmed cases of any foodborne disease caused by *C. difficile*, its occurrence in livestock and foods suggests that contaminated food products with spores could be a vehicle to spread *C. difficile* infection. This review proposes potential sources of *C. difficile* infection in the community and contamination routes of food products. Based on European research, it also summarizes the occurrence and organism characterization of *C. difficile* in animals at slaughterhouses and in human foods. Most of the analyzed literature reported prevalence in retail foods of less than 8 %, including microorganism belonging to the ribotype 078, an important hypervirulent strain involved in disease in humans. This prevalence in Europe is underestimated, being lower than reported in North America (rates up to 42 %), probably due to the lack of an ISO procedure for the detection of *C. difficile* in food products that preclude the comparison of prevalence data from different studies. The survival and growth of vegetative *C. difficile* cells and the resistance of its spores in foods are discussed as well as the risk factors of acquisition CDI from food products.

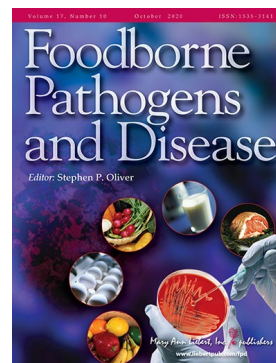
URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0740002018304155>

Revista: *Foodborne Pathogen Diseases*

Factor impacto (2018): 2.000

Ámbito: Food Science & Technology

Rango: 61/135 (Q2)



Título: Effect of Specimen Type and Processing on the Detection of *Clostridioides* [*Clostridium*] *difficile* in Piglet Fecal Samples

Autores: Candel-Pérez C, Martínez-Miró S, Ros-Berruezo G, Martínez-Graciá C.

Resumen:

Subclinical *Clostridioides difficile* colonization in piglets could be a potential source of this bacterium for community-acquired *C. difficile* infection. The purposes of this study were to assess the effect of specimen type and processing on *C. difficile* isolation, culture, and detection by polymerase chain reaction (PCR), and to determine the occurrence of *C. difficile* in piglets of different ages. We compared different culture procedures—direct plating, ethanol shock, and an enrichment step—to isolate *C. difficile* from swine feces and rectal swabs. DNA was isolated directly from feces, processed feces, and bacterial isolates to detect the triose phosphate isomerase (*tpi*) gene and identify the toxins A and B genes. The results show that ethanol shock increased the *C. difficile* isolation from feces, while it decreased it for rectal swabs, in comparison with direct plating. The use of the enrichment broth gave the highest *C. difficile* recovery from both types of specimen. Our findings show low sensitivity for *tpi* gene detection after the DNA extraction directly from feces and an increase in PCR positive samples when feces were processed before the DNA extraction. The overall prevalence of *C. difficile* was 16.9 % (22/130), of which 100 % were found to be toxigenic as assessed by the enrichment culture of fecal samples. The rate of isolation of positive samples decreased with the animal age, regardless of the presence or absence of diarrhea. Our results demonstrate the persistent reservoir of toxigenic *C. difficile* in fecal samples of piglets and support the impact of specimen processing on its isolation.

URL: <https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/fpd.2019.2629>

Revista: *Journal of Food Protection*

Factor impacto (2019): 1.581

Ámbito: Food Science & Technology

Rango: 93/139 (Q3)



Título: Occurrence of *Clostridioides* [*Clostridium*] *difficile* in poultry giblets at slaughter and retail pork and poultry meat in southeastern Spain

Autores: Candel-Pérez C, Santaella-Pascual J, Ros-Berruezo G, Martínez-Graciá C.

Resumen:

Contaminated raw meat and meat products with *Clostridioides difficile* could be a vehicle to spread community-associated *C. difficile* infection. This study was conducted to determine the occurrence of *C. difficile* in pork and poultry meat samples (n=325) from retail establishments, and in edible giblet samples (n=36) from a poultry processing plant in Murcia (southeastern Spain). *Clostridioides difficile*, isolated from samples using selective enrichment prior to isolation on a culture medium, was recovered from 2 % (6/361) of the samples overall, all of these being from the poultry processing plant. These isolates were recovered from 17 % (6/36) of the edible chicken giblets, which includes 28 % (5/18) of the gizzard samples and 6 % (1/18) of the liver samples tested. PCR testing of the six *C. difficile* isolates were toxin A and B negative. These findings demonstrate the survival of *C. difficile* in gastric acids of gizzards and its possible transmission to other meat products. However, the very low prevalence of *C. difficile* in the tested samples indicates that retail meat may not be an important source of *C. difficile* transmission to humans.

URL: <https://meridian.allenpress.com/jfp/article-abstract/doi/10.4315/JFP-20-256/445040/Occurrence-of-Clostridioides-Clostridium-difficile?redirectedFrom=PDF>

Revista: *Food Science and Technology International*

Factor impacto (2018): 1.221

Ámbito: Food Science & Technology

Rango: 97/135 (Q3)



Título: Presence of toxigenic *Clostridioides* [*Clostridium*] *difficile* in edible bivalve mollusks in Spain

Autores: Candel-Pérez C, Zapata-Galián E., López-Nicolás R, Ros-Berruezo G, Martínez-Graciá C.

Resumen:

Clostridioides difficile reservoirs other than humans are becoming increasingly recognized, and the occurrence of the pathogen in shellfish raises concern because spores can survive cooking temperature and edible bivalve mollusks are often consumed raw or poorly cooked. This study was conducted to determine the occurrence of pathogenic *C. difficile* in retail bivalve mollusks. The microbiological quality of samples was also checked through the isolation of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli*. We analyzed 129 mollusk samples from different fishmongers and grocery stores in Murcia. *C. difficile* was isolated from 8.53 % (11/129) of the mollusks investigated. Four *C. difficile* isolates harbored genes for the production of toxin A and B. *Salmonella* spp. were not isolated from any sample and *E. coli* was isolated from 1.55 % (2/129) of the samples, in both cases in accordance with the current legal requirements for consumption. Our findings indicate that the intake of raw or poorly cooked contaminated bivalve mollusks could be a potential source of *C. difficile*, leading to a risk for human health.

URL: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/1082013219894092>

Revista: *Advance Journal of Food Science and Technology*

SJR (2017): 0.13

Ámbito: Food Science

Rango: 253 /330 (Q4)



Título: Screening of Antibacterial Activity of *Moringa oleifera* Against Pathogenic *Clostridium* spp.

Autores: Candel-Pérez C, Durango-Villadiego A, Doménech-Asensi G, Ros-Berruezo G, Martínez-Graciá C.

Resumen:

The objective of this study was to evaluate the *in vitro* antibacterial activity of edible parts of *Moringa oleifera* against spore-forming bacteria associated with diarrhea such as *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens*. Ethanolic, methanolic, aqueous and acetone extracts in several presentations of *M. oleifera* (fresh leaf, leaf powder, whole seed powder and seed husk powder) were obtained. Broth microdilution method was used to analyze the activity and to determine the Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) and the Minimum Bactericidal Concentrations (MBCs). A two-fold serial dilution of each extract was tested against *C. difficile* and *C. perfringens* during 48 h under anaerobic conditions. The broth microdilution analyzes revealed that red-stemmed leaf showed the lowest MICs (ranging from 3.9 to 125 µg/mL), followed by whole seed (MICs 29.29-1875 µg/mL), greenstemmed leaf (MICs 39-2500 µg/mL) and seed husk (MICs 390.6-1562.5 µg/mL). The MBCs values were 1000-2000 µg/mL for red-stemmed leaf fresh, 1250-10000 µg/mL for green-stemmed leaf fresh, 6250-12500 µg/mL for red-stemmed leaf powder, 2500-25000 µg/mL for whole seed and 25000 µg/mL for seed husk. The study revealed that leaves and seeds in different concentrations, irrespective of their presentation, inhibited the growth of the tested strains to varying degrees depending on the solvent employed in extraction. Therefore, it may be concluded that *M. oleifera* may be a potential source for antimicrobial molecule (s) against pathogenic *Clostridium* spp.

URL: <https://maxwellsci.com/jp/mspabstract?doi=ajfst.16.5930>

5. COMUNICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS DOCTORAL

5.1 Comunicaciones orales en congresos

TÍTULO: **Occurrence of *Clostridium difficile* in giblets at slaughterhouse**

AUTORES: C. Candel-Pérez, J. Santaella-Pascual, G. Ros-Berruezo, C. Martínez-Graciá

CONGRESO: III Jornadas Doctorales de la Universidad de Murcia

LUGAR Y FECHA: Murcia, 30, 31 de mayo y 1 de junio de 2017

ABSTRACT:

Poultry is a frequent source of bacterial foodborne diseases, but limited data have been published about *C. difficile* in this meat source. The objective of this study was to investigate the occurrence and toxigenicity of *C. difficile* in poultry edible giblets at slaughterhouse.

Giblets were collected of one poultry slaughterhouse in the province of Murcia (Spain) during June-October 2016. Thirty-six samples of edible giblets were obtained at cutting area after water scalding. Six of 36 giblets samples (16,7 %) were positive for *C. difficile*, that supposes 27,8 % of the samples of gizzards and 5,6 % of the samples of livers. No *C. difficile* was detected in cleaned gizzards or turkey. Of the 6 positive samples to *C. difficile*, 3 gizzards and 1 liver belonged to chickens from the same farm, while the 2 remaining gizzards had different origin. None of the isolates harbored the gene encoding for toxin A or B.

In conclusion, our study has illustrated that edible giblets of healthy poultry could be a potential source of *C. difficile*. Although isolated strains were non-toxigenic, the findings demonstrate the survival of spores of *C. difficile* in gastric acids of gizzards and their possible transmission to other meat pieces, such as liver, by cross contamination during processing at slaughterhouse. Overall, we emphasize on the concerns regarding the potential risk to human health posed by the consumption of poorly cooked contaminated giblets and their contribution to the epidemiology of *C. difficile*.

TÍTULO: Occurrence of *Clostridium difficile* in edible bivalve molluscs in Spain

AUTORES: Carmen Candela Pérez, E Zapata Galián, G Ros Berruezo, C Martínez Graciá

CONGRESO: 4th World Congress and Expo on Applied Microbiology 2nd International Conference on Food Microbiology

LUGAR Y FECHA: Madrid, 29, 30 de noviembre y 1 de diciembre de 2017

ABSTRACT:

Bivalve molluscs are a frequent source of viral and bacterial pathogens due to, among other factors, their filtering nature. Toxigenic *C. difficile* has been isolated from seafood samples with potential implications of transfer to humans. The purpose of this study is to assess the occurrence of *C. difficile* as well as bacterial indicators (*Salmonella* spp, *Escherichia coli* and reducers) in edible bivalve molluscs in Spain.

A total of 129 samples, consisting in 123 samples of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and 6 oysters (*Crassostrea cornucopiae*), were purchased from outlets in the city of Murcia (southeast Spain). The isolation of *C. difficile* strains was carried out using enrichment broth supplemented with sodium taurocholate followed by ethanol shock, prior to the culture on a selective media. The identification was carried out detecting *tpi* gene using molecular techniques. The isolation and enumeration of bacterial indicators were investigated according to the ISO norm.

C. difficile was isolated from 8,94 % (11/123) of the mussels investigated, what supposes 20,8 % (5/24) from Mediterranean Sea and 6,45 % (6/93) from Northwest Atlantic. No *C. difficile* was detected in modified atmosphere packs or in cooked mussels. All oysters samples were negative for *C. difficile*. About the associated flora, *Clostridium* sulphite reducers appeared in 31 % (40/129) of the analysed samples and *E. coli* appeared in 1,5 % (2/129). *Salmonella* spp. was not present in any sample. These bacterial indicators were in accordance with the current legal requirements.

These findings indicate that edible bivalve molluscs could be a potential source of *C. difficile*, with a slightly higher isolation rates than other studies. The intake of raw or poorly cooked contaminated bivalve molluscs with its spores could represent a risk for human health.

5.2 Pósters en congresos

TÍTULO: Importancia del pretratamiento de la muestra en el aislamiento de *Clostridium difficile*

AUTORES: Carmen Candel-Pérez, Carmen Martínez-Graciá, Ana B. Pérez-Jiménez, Gaspar Ros-Berruezo.

CONGRESO: Congreso: XXI Congreso Sociedad Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

LUGAR Y FECHA: Málaga, 11, 12 y 13 de mayo de 2017

ABSTRACT:

En la detección de *Clostridium difficile*, se han propuesto diferentes variaciones al cultivo toxigénico tradicional, como es la incorporación de un pretratamiento de la muestra como etapa previa al cultivo, favoreciendo la recuperación del patógeno y limitando el crecimiento de flora contaminante procedente de la muestra. El objetivo del presente estudio fue comparar la recuperación de *C. difficile* a partir de muestras de heces empleando como pretratamiento de la muestra el shock con etanol y el enriquecimiento en caldo.

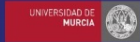
Para ello, se analizaron un total de 22 muestras recogidas directamente de 22 cerdos que fueron procesadas mediante 3 métodos diferentes. En el experimento 1, las muestras se inocularon directamente en el medio de cultivo selectivo CLO (Biomérieux®). En el experimento 2, la muestra se mezcló con etanol al 70 % durante 20 minutos previamente a la siembra en CLO. En el experimento 3, la muestra se incubó en un caldo de enriquecimiento suplementado con taurocolato durante 7 días en anaerobiosis. La mezcla se sometió a un tratamiento de choque con etanol absoluto (1 hora), se centrifugó y el pellet se sembró en CLO. En todos los casos, la siembra se realizó por agotamiento diferenciando 4 áreas y se incubaron las placas en anaerobiosis a 37 °C durante 48-72 horas.

Se aisló *C. difficile* en un 72,7 % (16/22) de las muestras de heces mediante el método de siembra directa. La recuperación de *C. difficile* se incrementó cuando se realizó un pretratamiento a la muestra, obteniéndose tasas de un 95,5 % (21/22) con el shock con etanol y del 100 % (22/22) con el enriquecimiento en caldo. En el experimento 1, un 81,3 % (13/16) los aislamientos de *C. difficile* estaban acompañados de microbiota fecal resistente, dificultando la identificación y reaislamiento del

patógeno. El aislamiento de esta microbiota contaminante se redujo cuando la muestra se sometió a algún pretratamiento, aislándose *C. difficile* en cultivo puro en un 52,4 % (11/21) de las muestras del experimento 2 y en un 31,8 % (7/22) de las muestras del experimento 3. El crecimiento de *C. difficile* alcanzó mayoritariamente la tercera estría de la siembra en el medio de cultivo selectivo CLO, independientemente del pretratamiento de la muestra empleado, lo que indica un crecimiento abundante del patógeno en más del 60 % de los casos. La microbiota fecal contaminante consiguió crecer en más áreas de reisolamiento cuando no se realizó ningún pretratamiento de la muestra.

Según los resultados, el pretratamiento de la muestra con un caldo de enriquecimiento suplementado con taurocolato seguido de un choque con etanol permite obtener mayores tasas de recuperación de *C. difficile*. El pretratamiento únicamente con etanol presenta valores muy similares de sensibilidad con la ventaja añadida de ser un método más rápido que el enriquecimiento en medio líquido. Además de estar al alcance de cualquier laboratorio, el etanol provoca una reducción de la microbiota fecal acompañante favoreciendo la recuperación del patógeno en cuanto a que facilita su identificación presuntiva en el medio de cultivo sólido y agiliza el aislamiento final del patógeno para posteriores estudios.

Importancia del pretratamiento de la muestra en el aislamiento de *Clostridium difficile*



Carmen Candel-Pérez (carmen.candel1@um.es), Gaspar Ros-Berrueto, Ana B. Pérez-Jiménez*, Carmen Martínez-Graciá
 Departamento de Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia. Murcia.
 *Servicio de Microbiología. Complejo Hospitalario Universitario de Granada-PTS. Granada

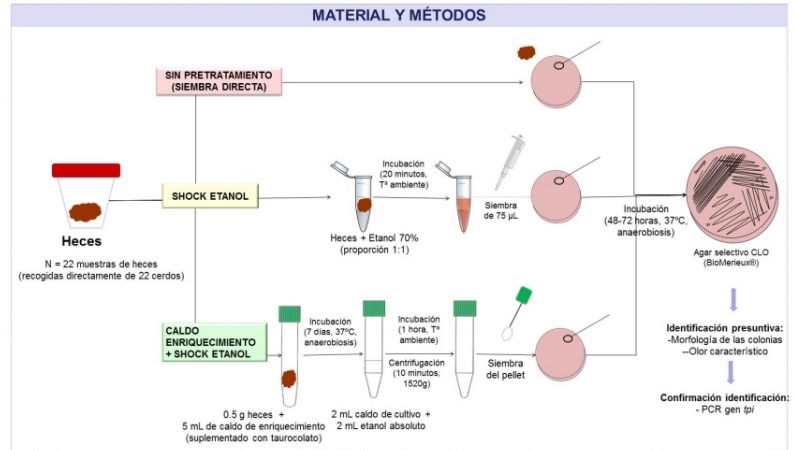


INTRODUCCIÓN

El aislamiento en medio sólido de las cepas de *C. difficile* es fundamental para realizar posteriores pruebas de sensibilidad antibiótica y tipado molecular. Se han propuesto diferentes variaciones al cultivo toxigénico tradicional, como es la incorporación de un pretratamiento de la muestra como etapa previa al cultivo, favoreciendo la recuperación del patógeno y limitando el crecimiento de flora contaminante procedente de la muestra.

OBJETIVOS

El objetivo del presente estudio fue comparar la recuperación de *C. difficile* a partir de muestras de heces empleando como pretratamiento de la muestra el shock con etanol y el enriquecimiento en caldo.



RESULTADOS

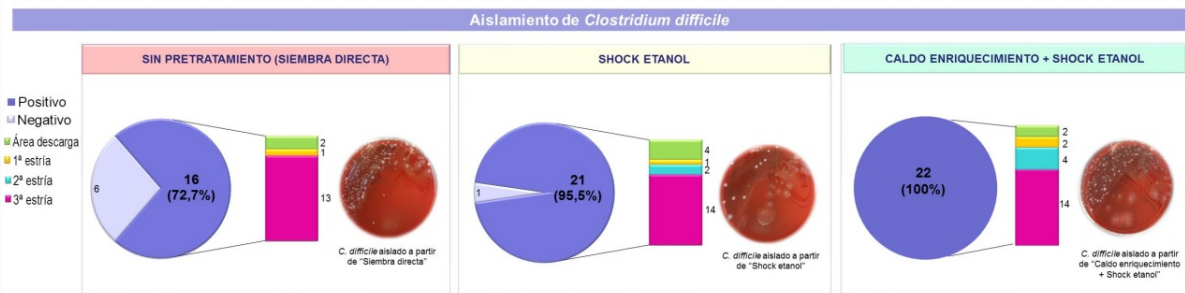


Figura 1. Cultivos positivos y área de crecimiento de *Clostridium difficile*.

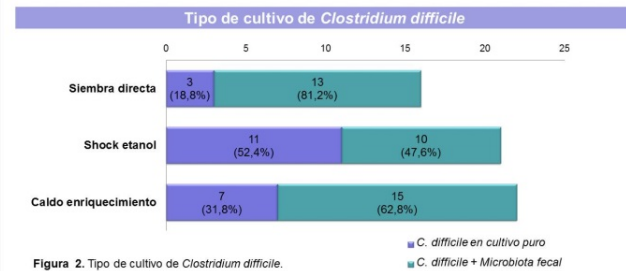


Figura 2. Tipo de cultivo de *Clostridium difficile*.

Rendimiento del pretratamiento

	Siembra directa	Shock etanol	Enriq+Shock etanol
Sensibilidad	78.6%	95.7%	100%
Especificidad	100%	100%	100%
VPP	100%	100%	100%
VPN	0	0	0

VPP, Valor Predictivo Positivo; VPN, Valor Predictivo Negativo

Tabla 1. Comparación del rendimiento de los pretratamientos de la muestra en la recuperación de *Clostridium difficile* a partir de muestras de heces respecto al experimento 3.

CONCLUSIONES

- La mayor recuperación de *Clostridium difficile* a partir de heces se obtiene con el pretratamiento de enriquecimiento en caldo, seguido del shock con etanol.
- El pretratamiento con etanol presenta valores de sensibilidad similares al enriquecimiento en caldo, con la ventaja añadida de ser un método más rápido.
- El uso de etanol provoca una reducción de la microbiota fecal acompañante, favoreciendo la identificación presuntiva en medio de cultivo sólido.

TÍTULO: Utilidad del escobillón rectal en el aislamiento de *Clostridium difficile*

AUTORES: Carmen Candel-Pérez, Carmen Martínez-Graciá, Ana B. Pérez-Jiménez, Gaspar Ros-Berruezo.

CONGRESO: Congreso: XXI Congreso Sociedad Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

LUGAR Y FECHA: Málaga, 11, 12 y 13 de mayo de 2017

ABSTRACT:

Tradicionalmente, el estudio de patógenos entéricos se realiza a partir de una muestra de heces. Ante las dificultades para su recolección, se han propuesto los escobillones rectales en estudios de vigilancia de múltiples patógenos por su fácil recogida y manipulación, documentándose valores de sensibilidad similares al coprocultivo para determinados microorganismos. El objetivo del presente estudio fue comparar la recuperación de *Clostridium difficile* a partir de muestras de escobillón rectal y de heces porcinas empleando como pretratamiento de las muestras el shock con etanol y el enriquecimiento en caldo.

Para ello, se analizaron un total de 18 muestras de escobillón rectal y 18 muestras de heces del correspondiente cerdo, que fueron procesadas mediante 3 métodos diferentes. En el método de siembra directa, las muestras se inocularon directamente en el medio de cultivo selectivo CLO (Biomérieux®). En el método de shock con etanol, la muestra se mezcló con etanol (70 %) previamente a la siembra en CLO. En el método del enriquecimiento, la muestra se incubó en un caldo de enriquecimiento suplementado con taurocolato en anaerobiosis (7 días). La mezcla se sometió a un tratamiento de choque con etanol absoluto, se centrifugó y el pellet se sembró en CLO. En todos los casos, la siembra se realizó por agotamiento y se incubaron las placas en anaerobiosis a 37 °C (48-72 horas).

A partir de las muestras de escobillón rectal, se aisló *C. difficile* en un 94,4 % (17/18) de las muestras mediante el método de siembra directa. La recuperación de *C. difficile* se redujo cuando se realizó el pretratamiento de la muestra con etanol, obteniéndose una tasa del 83,3 % (15/18). Con el método de enriquecimiento en caldo se obtuvo una tasa de aislamiento del 100 % (18/18). Se obtuvieron cultivos puros de *C. difficile*, sin presencia de microbiota fecal resistente, en un 11,8 % (2/17), 53,3 % (8/15) y 16,7 % (3/18) de las muestras, respectivamente para cada método.

A partir de las muestras de heces, se aisló *C. difficile* en un 66,7% (12/18) de las muestras mediante el método de siembra directa. La recuperación de *C. difficile* se incrementó cuando se realizó un pretratamiento a la muestra, obteniéndose tasas de un 94,4 % (17/18) con el shock con etanol y de un 100 % (18/18) con el enriquecimiento en caldo. Se obtuvieron cultivos puros de *C. difficile* en un 8,3 % (1/12), 52,9 % (9/17) y 27,7 % (5/18) de las muestras, respectivamente para cada método.

Según los resultados, el uso de escobillones rectales para el aislamiento de *C. difficile* presenta valores de sensibilidad variables respecto a las heces dependiendo del pretratamiento de la muestra empleado, obteniéndose resultados equivalentes con el método de enriquecimiento en caldo. Los escobillones rectales presentan mayor tasa de aislamiento con el método de la siembra directa mientras que las heces incrementan su sensibilidad cuando se someten a un pretratamiento con etanol, que además provoca una reducción de la microbiota fecal acompañante de las muestras, facilitando la identificación presuntiva del patógeno en el medio de cultivo sólido.



Utilidad del escobillón rectal en el aislamiento de *Clostridium difficile*



Carmen Candel-Pérez (carmen.candel1@um.es), Gaspar Ros-Berruazo, Ana B. Pérez-Jiménez*, Carmen Martínez-Graciá
 Departamento de Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia. Murcia.
 *Servicio de Microbiología. Complejo Hospitalario Universitario de Granada-PTS. Granada

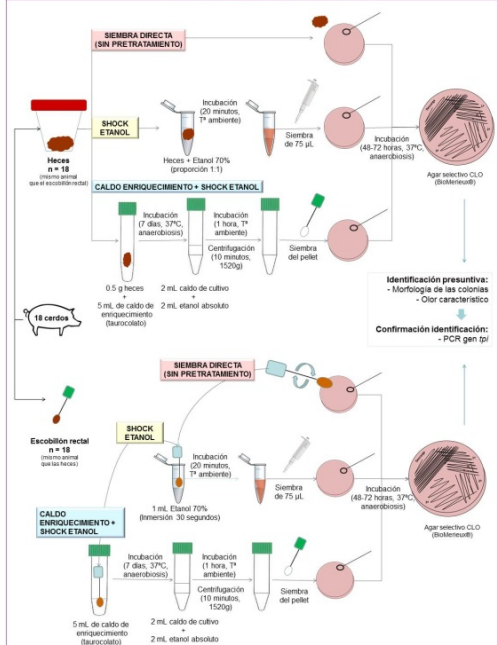
INTRODUCCIÓN

Tradicionalmente, el estudio de patógenos entéricos se realiza a partir de una muestra de heces. Ante las dificultades para su recolección, se han propuesto los escobillones rectales en estudios de vigilancia de múltiples patógenos por su fácil recogida y manipulación, documentándose valores de sensibilidad similares al coprocultivo para determinados microorganismos.

OBJETIVOS

El objetivo del presente estudio fue comparar la recuperación de *Clostridium difficile* a partir de muestras de escobillón rectal y de heces porcinas empleando como pretratamiento de las muestras el shock con etanol y el enriquecimiento en caldo.

MATERIAL Y MÉTODOS



RESULTADOS

Aislamiento de *Clostridium difficile*

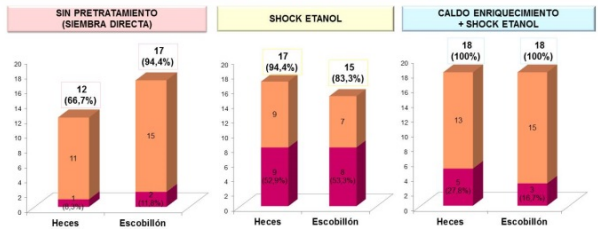


Figura 1. Cultivos positivos de *Clostridium difficile*

	Siembra directa		Shock etanol		Caldo Enriquecimiento + Shock etanol	
	Heces	Escobillón	Heces	Escobillón	Heces	Escobillón
Sensibilidad	50%	89.5%	89.5%	71.4%	100%	100%
Especificidad	100%	100%	100%	100%	100%	100%
VPP	100%	100%	100%	100%	100%	100%
VPN	0	0	0	0	0	0

VPP: Valor Predictivo Positivo; VPN: Valor Predictivo Negativo

Tabla 1. Rendimiento de los pretratamientos de las muestras de heces y escobillón rectal en la recuperación de *Clostridium difficile* en comparación al pretratamiento de "Caldo enriquecimiento + Shock etanol" a partir de heces.

Comparación de los aislamientos entre heces y escobillones

n	Siembra directa		Shock etanol		Enriq+Shock etanol	
	Heces	Escobillón	Heces	Escobillón	Heces	Escobillón
1	NC	NC	d*	NC	++	+++
2	NC	d*	d*	NC	++	+++
3	NC	++	NC	d	d*	+++
4	NC	d	d	d*	+++	+++
5	NC	+	d*	d	d*	+
6	NC	d	+	++	+	++*
7	d	d	+++*	d*	+++	+++
8	++	d*	++*	NC	++	+++
9	+++	++	+++	++	+++	+++
10	+++	++	+++*	+++	+++	+++
11	+++	++	+++	++	+++*	++*
12	+++	++	+++	++*	+++*	++*
13	+++	++	+++	++	+++	+++
14	+++	++	+++*	++*	+++	+++
15	+++	++	+++	++*	+++	+++
16	+++	++	+++*	++*	+++	+++
17	+++	++	+++*	+++	+++	++
18	+++	+++	+++	+++	++	+++

NC: No se observa crecimiento; *, cultivo puro;

d, descarga; +, primera estria; ++, segunda estria; +++, tercera estria

Tabla 2. Comparación del tipo de crecimiento de *Clostridium difficile* entre heces y escobillones rectales

CONCLUSIONES

- La mayor recuperación de *Clostridium difficile* a partir de escobillón rectal se obtiene con el pretratamiento de enriquecimiento en caldo, seguido de la siembra directa.
- En comparación a las heces, el uso de escobillón rectal para el aislamiento de *Clostridium difficile* presenta valores de sensibilidad variables dependiendo del pretratamiento de la muestra empleada, obteniéndose resultados equivalentes con el pretratamiento de enriquecimiento en caldo.

TÍTULO: Detection of *Clostridioides difficile* in livestock faeces by PCR

AUTORES: C. Candel-Pérez, C. Suárez-Martínez, A. Caballero-Valcárcel, G. Ros-Berruezo, C. Martínez-Graciá

CONGRESO: 4th International and 5th National Student Congress of Food Science and Technology

LUGAR Y FECHA: Burjassot, 22 y 23 de febrero de 2018

ABSTRACT:

Clostridioides difficile is an emerging pathogen for humans and animals, and there is concern about the possibility that food animals might serve as a reservoir of toxigenic strains. On this basis, epidemiological studies are needed for the detection of *C. difficile* in livestock, aimed at locating carriers, and preventing the contamination of carcasses at slaughterhouses.

The aim of this study was to compare the detection of *C. difficile* directly from pig faeces by molecular methods with the recovery rate from microbiological culture.

A commercial kit (QIAamp® DNA Stool, QUIAGEN) designed for Taq polymerase inhibitor removal was used for isolation *C. difficile* DNA directly from pig faeces samples. These DNA samples were evaluated for the presence of the triose phosphate isomerase gene *tpi*, specific for this bacterial species, by polymerase chain reaction (PCR). Results were compared to those obtained by *tpi* gene amplification of DNA from colonies isolated from samples cultured in solid media.

The culture consisted in an enrichment broth step followed by ethanol shock, prior to the isolation on a selective culture media. *C. difficile* was detected in 11,1 % (2/18) samples when DNA was isolated directly from pig faeces. When DNA extracts from an enrichment broth aliquot were used in the PCR, the *tpi* fragment was amplified in 50 % (4/8) samples. In conclusión, the use of the comercial kit evaluated shows low sensibility for *tpi* gene detection by PCR directly from pig faecal samples.

This result agrees with the Society for Healthcare Epidemiology of America and the Infectious Diseases Society of America that recommend faeces culture how the most sensitive test, being essential for epidemiological studies.

DETECTION OF *CLOSTRIDIODES DIFFICILE* IN LIVESTOCK FAECES BY PCR



C. Candel-Pérez, C. Suárez-Martínez, A. Caballero-Valcárcel, G. Ros-Berruazo, C. Martínez-Graciá
 Department of Food Science and Nutrition, Veterinary Faculty, University of Murcia, Spain
 carmen.candel1@um.es



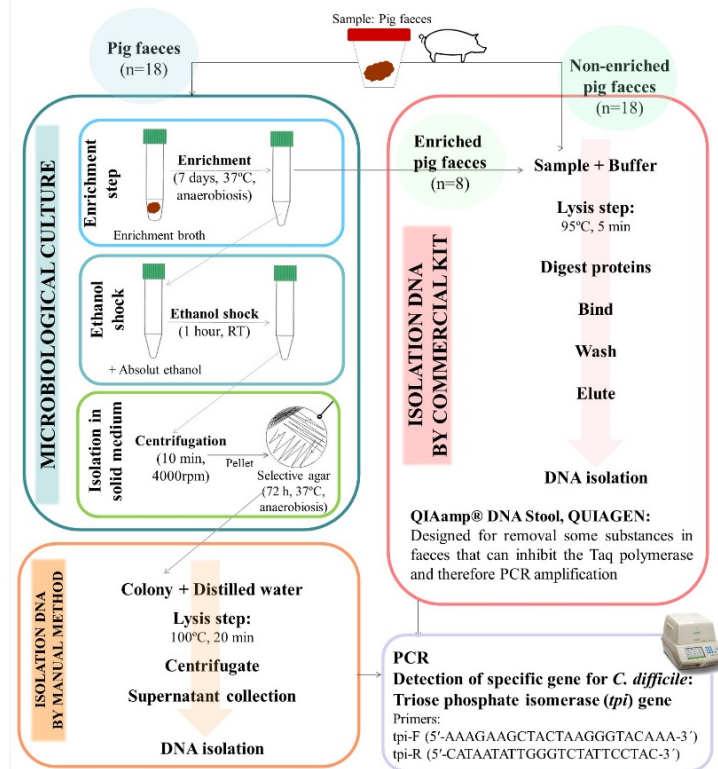
INTRODUCTION

Clostridioides difficile is an emerging pathogen for humans and animals, and there is concern about the possibility that food animals might serve as a reservoir of toxigenic strains. On this basis, epidemiological studies are needed for the detection of *C. difficile* in livestock, aimed at locating carriers, and preventing the contamination of carcasses at slaughterhouses. PCR is a rapid method to detect the presence of the bacteria. However, scarce studies have investigated the application of PCR-based techniques to detect *C. difficile* in fecal samples of animal origin.

OBJETIVES

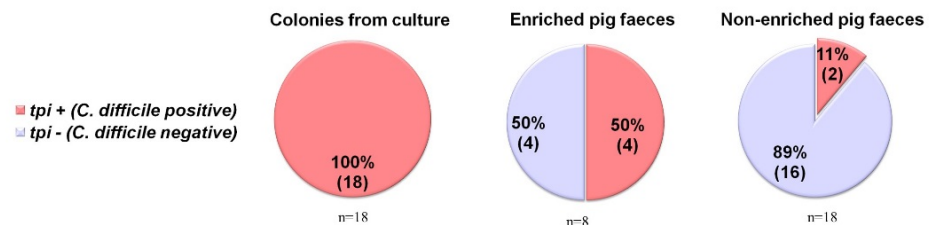
The aim of this study was to compare the detection of *C. difficile* directly from pig faeces by molecular methods with the recovery rate from microbiological culture.

MATERIAL AND METHODS



RESULTS

tpi gene detection



Performance of *tpi* gene detection

	Enriched faeces	Non-enriched faeces	Microbiological culture
Sensitivity	50%	11.1%	100%
Specificity	100%	100%	100%
PPV	100%	100%	100%
NPV	0	0	0

PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value

Table 1. Performance of *tpi* gene detection from pig faeces and colonies from culture. Recovery rate of microbiological culture was taken into account to determine positive real samples. Sensitivity, specificity, the positive predictive value (PPV), and the negative predictive value (NPV) for enriched and non-enriched faeces were calculated in comparison with the recovery rate of microbiological culture.

CONCLUSIONS

- ⊙ Pig faecal samples showed low sensibility for *tpi* gene detection by PCR after DNA extraction with the commercial kit evaluated, compared with the microbiological culture.
- ⊙ The use of enriched pig faeces increased the detection of *tpi* gene by PCR after DNA extraction.
- ⊙ These results agree with the Society for Healthcare Epidemiology of America and the Infectious Diseases Society of America that recommend faeces culture as the most sensitive test.

TÍTULO: Screening of antibacterial activity of *Moringa oleifera* against pathogenic *Clostridium* spp.

AUTORES: Candel-Pérez Carmen, Durango-Villadiego Alba M., Domenech-Asensi Guillermo, Ros-Berruezo Gaspar, Martínez-Graciá Carmen

CONGRESO: V Simposio Internacional Agroalimentario

LUGAR Y FECHA: Barranquilla (Colombia), 4, 5 y 6 de octubre de 2017.

ABSTRACT:

Moringa (Moringa oleifera) is a plant with multiple medicinal values including anti-diarrheal qualities; even though its antimicrobial effects, there is not sufficient information about its activity against spore-forming bacteria.

The objective of this study was to evaluate the *in vitro* antibacterial activity of edible parts of moringa against spore-forming bacteria associated with diarrhea such as *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens*.

Ethanollic, methanollic, aqueous and acetone extracts in several presentations of moringa (fresh leaf, leaf powder, whole seed powder and seed husk powder) were obtained. Broth microdilution method was used to analyse the activity and to determine the minimum inhibitory concentrations (MICs) and the minimum bactericidal concentrations (MBCs). A two-fold serial dilution of each extract was tested against *C. difficile* and *C. perfringens* during 48 hours under anaerobic conditions.

The broth microdilution analyses revealed that red-stemmed leaf showed the lowest MICs (ranging from 3,9 to 125 µg/mL), followed by whole seed (MICs 29,29-1875 µg/mL), green-stemmed leaf (MICs 39-2500 µg/mL) and seed husk (MICs 390,6-1562,5 µg/mL). The MBCs values were 1000-2000 µg/mL for red-stemmed leaf fresh, 1250-2500 µg/mL for green-stemmed leaf fresh, 6250-12500 µg/mL for red-stemmed leaf powder, 2500-25000 µg/mL for whole seed and 25000 µg/mL for seed husk. The study revealed that leaves and seeds in different concentrations, irrespective of their presentation, inhibited growth of the tested strains to varying degrees depending on the solvent employed in extraction.

Therefore, it may be concluded that *M. oleifera* may be a potential source for antimicrobial molecule(s) against pathogenic *Clostridium* spp.

SCREENING OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF *MORINGA OLEIFERA* AGAINST PATHOGENIC *CLOSTRIDIUM* SPP.



¹Candel-Pérez Carmen ²Durango Alba M., ¹Doménech-Asensi Guillermo ¹Ros-Berrueto Gaspar and ¹Martínez-Graciá Carmen.

¹Food Science and Nutrition Department, University of Murcia, Espinardo/Murcia, 30100, Spain

² Food Engineering Department, University of Córdoba, Montería/Córdoba, Colombia
albadurango@correo.unicordoba.edu.co

INTRODUCTION

Moringa oleifera Lam. (Moringaceae) is a small- to medium-sized tree, distributed in many countries of the tropics and subtropics. Several parts of the specie has nutritional, therapeutic, and prophylactic properties, and are used in traditional medicine in treating all sorts of diseases including diarrhea, one of the most common cause of morbidity and mortality worldwide. Even though its antimicrobial effects, there is not sufficient information about its activity against spore-forming bacteria.

OBJECTIVE

The objective of this study was to evaluate the *in vitro* antibacterial activity of edible parts of moringa against spore-forming bacteria associated with diarrhea such us *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens*.

MATERIALS AND METHODS

Plant material:

Fresh leaf:
Clean leaves with 150-200 ppm chlorine
Drying 40 °C
Grind dried leaves with a mortar

Leaf powder:
Clean leaves with 150-200 ppm chlorine
Drying 40°C 7 days
Fulverize dried leaves with a mortar

Whole seed powder:
Fulverize whole seed with a mortar

Husk seed powder:
Fulverize husk seed with a mortar

Extraction procedure:

Mix sample and extraction solvent
25 g sample + 100 mL solvent
(Acetone / Methanol / Ethanol / Water)

Maceration
Room temperature
Intermittent shaking

Filter
Faper Whatman n. 1

Concentration
Rotary evaporation 45-60°

Screening extracts for antibacterial activity:

- Broth microdilution method (CLSI , 2010):
- 96-well microtitre plate
 - Two-fold serial dilution of each extract were made in a BHI broth
 - Test bacterial strains: 1.0 x 10⁶ CFU/mL of *C. difficile* and *C. perfringens*
 - Incubation: 48 hours at 37°C under anaerobic conditions
 - Spectrophotometric measurement by optical density (O.D.) at 600 nm at 0 and 48 hours

Concentration determination:

$$\text{Inhibition of } Clostridium \text{ spp (\%)} = 100 \cdot \frac{(\text{O.D. time 48h} - \text{O.D. time 0h})_{\text{test}}}{(\text{O.D. time 48h} - \text{O.D. time 0h})_{\text{control}}} \cdot 100$$

Minimum inhibitory concentration (MIC): Inhibition 0,1-99,9%
Minimum bactericidal concentration (MBC): Inhibition > 99,9%

RESULTS

Antibacterial concentrations of extracts:

Table 1. Minimum inhibitory concentration of *Moringa oleifera* Lam. leaf and seed extracts against *Clostridium* spp.

	Minimum inhibitory concentration (µg/mL)									
	Leaves					Seeds				
	Aqueous	Acetone	Ethanol			Aqueous	Methanol	Ethanol		
	Green-stemmed	Green-stemmed	Green-stemmed	Red-stemmed	Red-stemmed powder	Whole Seed powder	Whole Seed powder	Seed husk powder	Whole Seed powder	Whole Seed powder
<i>Clostridium difficile</i>	nd	39,06	156,25	3,91	48,82	625	48,82	390,6	1875	
<i>Clostridium perfringens</i>	nd	156,25	2500	125	48,82	312,5	48,82	1562,5	29,29	

nd: no detected

Table 2. Minimum bactericidal concentrations of *Moringa oleifera* Lam. leaf and seed extracts against *Clostridium* spp.

	Minimum bactericidal concentrations (µg/mL)									
	Leaves					Seeds				
	Aqueous	Acetone	Ethanol			Aqueous	Methanol	Ethanol		
	Green-stemmed	Green-stemmed	Green-stemmed	Red-stemmed	Red-stemmed powder	Whole Seed powder	Whole Seed powder	Seed husk powder	Whole Seed powder	Whole Seed powder
<i>Clostridium difficile</i>	nd	2500	10000	1000	12500	7500	2500	25000	25000	
<i>Clostridium perfringens</i>	nd	1250	10000	2000	6250	15000	2500	25000	25000	

nd: no detected

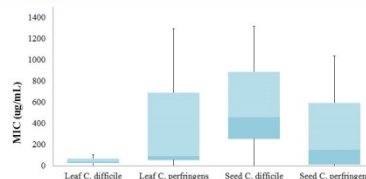


Figure 1. Minimum inhibitory concentration of leaves and seeds against *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens*.

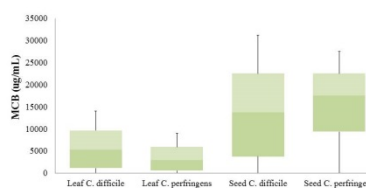


Figure 2. Minimum bactericidal concentration of leaves and seeds against *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens*.

CONCLUSION

The study revealed that leaves and seeds in different concentrations, irrespective of their presentation, inhibited growth of the tested strains to varying degrees depending on the solvent employed in extraction. Therefore, it may be concluded that *M. oleifera* may be a potential source for antimicrobial molecule(s) against pathogenic *Clostridium* spp.

5.3 Pósters en congresos relacionados con la tesis doctoral

TITULO: **El cerdo como reservorio de *Clostridium difficile***

AUTORES: Candel-Pérez C., González-Bermúdez C.A., Martínez-Graciá C., Ros-Berruezo G.

CONGRESO: XXI Simposio Anual Asociación de Veterinarios Especialistas en Diagnóstico de Laboratorio (AVEDILA)

LUGAR Y FECHA: Murcia, 17 y 18 de noviembre de 2016.

ABSTRACT:

La colonización intestinal de *Clostridium difficile* en lechones recién nacidos se produce durante las primeras horas de vida, aunque solo se producen manifestaciones clínicas en circunstancias concretas. De esta manera, el ganado porcino podría actuar como reservorio y estar implicado en la diseminación y mantenimiento de la enfermedad.

El objetivo del presente estudio fue detectar la presencia de *Clostridium difficile* en heces de cerdo de diferentes rangos de edad de dos granjas de la Región de Murcia. Para ello, se analizaron un total de 130 muestras pertenecientes a 93 cerdos de una granja A y a 16 cerdos de una explotación porcina B, localizadas en la Región de Murcia durante los meses de Febrero a Julio y Octubre de 2015. Estas muestras se tomaron de cerdos con diarrea (44) y sin diarrea (86), en los que se puede diferenciar tres rangos de edad: 1-15 días (43), 16 días-2 meses (61) y mayores de 2 meses (26). Las muestras de heces se recogieron directamente del animal y se procesaron según el método de Susick et al. para su cultivo bacteriológico e identificación definitiva

Se confirmó la presencia de *C. difficile* en 20 (15,38 %) de las 130 muestras de heces analizadas, las cuales pertenecían en su totalidad a animales de la granja A.

Por rango de edad, la tasa de positividad fue de un 27,9 % (12) para los lechones de 1-15 días, de un 9,8 3% (6) en lechones de 16 días-2 meses y de un 7,69 % (2) en cerdos de más de 2 meses.

Según la clínica del animal, se obtuvo un 75 % (15) de cultivos positivos en muestras de heces sólidas/semisólidas y un 15 % (5) en heces líquidas.

Estudios realizados en otras explotaciones ganaderas porcinas españolas muestran datos similares de prevalencia en el grupo de lechones menores de 15 días,

demonstrando que la tasa de positividad de *C. difficile* disminuye con la edad del animal, con independencia de la presencia o ausencia de diarrea.



El cerdo como reservorio de *Clostridium difficile*



XXI SIMPOSIO ANUAL
17-18 Nov 2016 MURCIA

Candel-Pérez C., González-Bermúdez C.A., Martínez-Graciá C., Ros-Berruero G.

Departamento de Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología. Facultad de Veterinaria, Campus de Espinardo 30100, Murcia.

INTRODUCCIÓN

La colonización intestinal de *Clostridium difficile* en lechones recién nacidos se produce durante las primeras horas de vida aunque solo se producen manifestaciones clínicas en circunstancias concretas. De esta manera, el ganado porcino podría actuar como reservorio y estar implicado en la diseminación y mantenimiento de la enfermedad.

OBJETIVOS

Detectar la presencia de *Clostridium difficile* en heces de cerdo de diferentes rangos de edad de dos granjas de la Región de Murcia.

MATERIAL Y MÉTODO

POBLACIÓN

109 cerdos de entre 0-3 meses de edad pertenecientes a 2 granjas de la Región de Murcia

MUESTRAS

130 muestras de heces recogidas directamente del animal tras la estimulación del reflejo defecatorio introduciendo un escobillón en el recto del cerdo

Granja A	Heces		Total
	líquidas	sólidas	
1-15 días	9	24	33
16 días-2 meses	30	25	55
> 2 meses	3	23	26
Total	42	72	114

Granja B	Heces		Total
	líquidas	sólidas	
1-15 días	2	8	10
16 días-2 meses	0	6	6
Total	2	14	16

PRETRATAMIENTO MUESTRA
Enriquecimiento: 1 g heces+ 9 ml Caldo taurocolato

Incubación: 37°C, 7 días, Alm. Anaerobiosis

Shock etanol:
2ml caldo + 2 ml Etanol absoluto
Incubación: 1h, Tª amb., Agitación
Centrifugación: 4000rpm, 10'

CULTIVO
Siembra Cualitativa del Pellet Medio cultivo selectivo CLO

Incubación: 37°C, 48 horas, Alm. Anaerobiosis

LECTURA MEDIOS DE CULTIVO

EXTRACCIÓN ADN
IDENTIFICACIÓN BACTERIANA
PCR del gen *tpi*

DETECCIÓN GENES TOXINAS
PCR del gen *tcdA* (enterotoxina A)
PCR del gen *tcdB* (citotoxina B)

RESULTADOS

Detección de *Clostridium difficile*:

Total: 130 muestras

Detección de *Clostridium difficile* en función de la edad del animal

Detección de *Clostridium difficile* en función de la clínica del animal

Detección de *Clostridium difficile* en función de la instalación

Detección de los genes codificantes de toxina de *Clostridium difficile*:

CONCLUSIONES

- Se detecta la presencia de *Clostridium difficile* en las heces de un 15,4% de la población estudiada.
- La tasa de positividad de *C. difficile* disminuye con la edad del animal, con independencia de la presencia de diarrea.
- La totalidad de las cepas de *C. difficile* aisladas son potencialmente patogénicas (detección de los genes que codifican para las toxinas A y B), aunque no se observa relación con la clínica del animal.
- Se plantean futuros estudios encaminados a la detección directa de las toxinas en las heces.

TÍTULO: Influencia de los probióticos sobre el crecimiento de cepas comensales y patógenas de *Clostridium* spp.

AUTORES: Carmen Candel-Pérez, David Planes-Muñoz, Carmen Martínez-Graciá, Gaspar Ros-Berruezo.

CONGRESO: VIII Workshop de la Sociedad Española de Probióticos y Prebióticos

LUGAR Y FECHA: Santiago de Compostela, 23 y 24 de febrero de 2017.

ABSTRACT:

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto *in vitro* de diferentes cepas de probióticos (*Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus gasseri*, *Bifidobacterium longum* y *Bifidobacterium bifidum*) sobre el crecimiento de *Clostridium leptum*, *Clostridium coccooides*, *Clostridium perfringens* y diferentes aislados veterinarios y alimentarios de *Clostridium difficile*.

Para ello, se cultivaron individualmente las cepas de probióticos durante 10, 24, 48 y 72 horas en caldo Man Rogosa Sharpe en condiciones de anaerobiosis. Los sobrenadantes libres de células resultantes de dicho crecimiento fueron sometidos a un tratamiento térmico (100 °C, 20 minutos), un tratamiento de neutralización (NaOH 5M) y a una combinación de ambos. Las cepas de *Clostridium* se cultivaron individualmente en caldo infusión cerebro corazón en microplacas de 96 pocillos en atmósfera anaeróbica y se calculó su porcentaje de crecimiento en presencia y ausencia de los diferentes sobrenadantes adicionados al caldo de cultivo.

Se observó que los sobrenadantes que no habían sido sometidos a tratamientos de neutralización ejercían un efecto inhibitorio en el crecimiento de las cepas de *Clostridium*, no observándose diferencias entre los sobrenadantes sometidos al tratamiento térmico y los no sometidos a ningún tratamiento. Este efecto inhibitorio se observó con los sobrenadantes de 48 y 72 horas (pH [3,86-4,5]). Los sobrenadantes de 24 horas mostraron una actividad variable de inhibición en función del pH del sobrenadante y de la cepa de *Clostridium* analizada. Únicamente se detectó inhibición con sobrenadantes de 10 horas por parte de *L. gasseri* (pH 4,67) y *B. longum* (pH 4,92) frente a *C. difficile*. *B. bifidum* (pH [4,5-5,63]) no mostró efecto inhibitorio frente a *C. perfringens* y *C. leptum* a ningún tiempo.

Los resultados del estudio mostraron la existencia de una actividad inhibitoria frente a *Clostridium* spp. dependiente del pH del sobrenadante, siendo *C. difficile* y *C. coccooides* las cepas más susceptibles a pH ácidos.



VIII WORKSHOP
Sociedad Española de Probióticos y Prebióticos

Santiago de Compostela - 2017
23 y 24 de febrero 2017 - Facultad de Medicina
www.workshopsepp2017.com
info@workshopsepp2017.com



Organiza:

252.23

Influencia de los probióticos sobre el crecimiento de cepas comensales y patógenas de *Clostridium* spp.

Carmen Candel-Pérez, David Planes-Muñoz, Carmen Martínez-Graciá, Gaspar Ros-Bernuete
Departamento de Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, Murcia, España.

OBJETIVOS

Evaluar el efecto *in vitro* de diferentes cepas de probióticos (*Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus gasseri*, *Bifidobacterium longum* y *Bifidobacterium bifidum*) sobre el crecimiento de *Clostridium leptum*, *Clostridium coccooides*, *Clostridium perfringens* y diferentes aislados veterinarios y alimentarios de *Clostridium difficile*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivo de Bacterias Ácido Lácticas (BAL) para la obtención de sobrenadantes:

Cepa BAL
Lactobacillus rhamnosus
Lactobacillus gasseri DSMZ0077
Bifidobacterium longum ATCC15707
Bifidobacterium bifidum

Agar MRS + Cys
Incubar 14 horas
37°C, anaerobiosis

Inocular 2-3 colonias

Caldo MRS + Cys
Incubación 16 horas, 37°C, anaerobiosis

Inocular 1:10 (v/v)

Caldo MRS + Cys → Aliquotar caldo MRS inoculado

10, 24, 48, 72 horas

Incubar "T" horas, 37°C, anaerobiosis

Centrifugar 10 minutos 4.000g
Desechar pellet

Sobrenadante
Tratamiento de los sobrenadantes libres de células

Sin tratamiento / Tratamiento

Térmico 100°C, 20 minutos / Neutralización NaOH 5M hasta pH 7 / Neutralización + Térmico NaOH 5M 100°C, 20 min

Filtrar 0,22µm
Agar 22Ei: Coclear esterilidad
Medición de pH

SOBRENADANTES LIBRES DE CÉLULAS:
"ORIGINAL" "CALOR" "NEUTRO" "NEUTRO + CALOR"

Evaluación del efecto *in vitro*

Microplaca 96 pocillos:
100 µL caldo BHI
100 µL sobrenadante libre de células
20 µL suspensión *Clostridium* spp. 0,5 McF
Pocillo control: Sin Sobrenadante

Lectura D.O. (600nm) a tiempo 0 y 48 horas

Microdilución en caldo

***Clostridium* spp**

Agar BHI / Suspensión 0,5 McF
Incubar 24 horas, 37°C, anaerobiosis / Solución salina 0,85%

Cepa *Clostridium* spp
Clostridium leptum ATCC29065
Clostridium coccooides ATCC29236
Clostridium perfringens
Clostridium difficile ATCC9689
Clostridium difficile heces cerdo
Clostridium difficile alimento x 2

MRS: Man Rogosa Sharpe pH 5,85
Cys: Cisteína 0,05%
BHI: Caldo jarroero control pH 7,25

DE = Desviación estándar

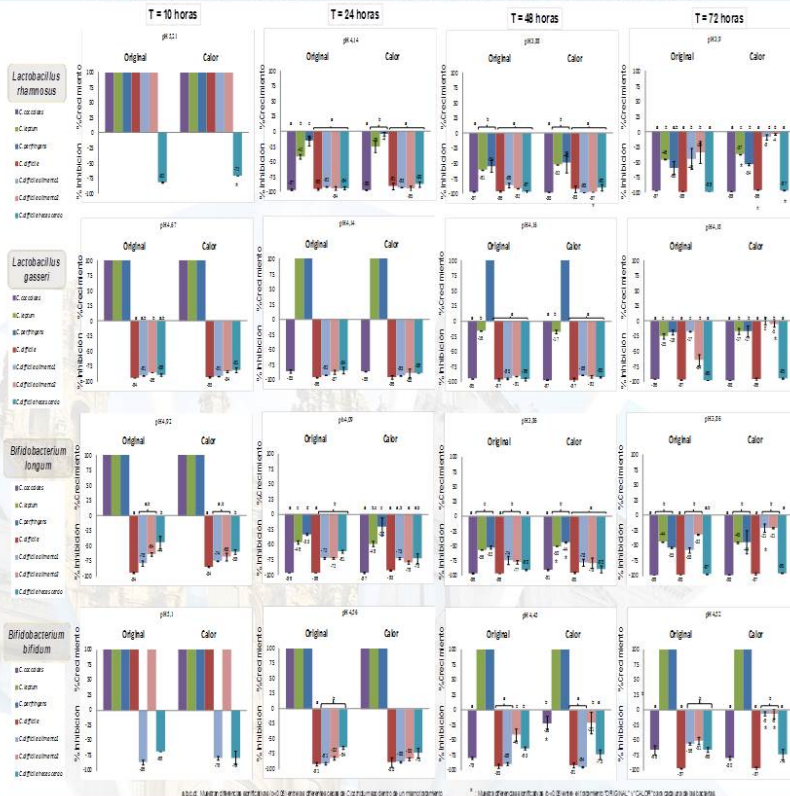
Inhibición de *C. difficile* por parte de *L. gasseri* y *B. longum*

Actividad variable de la inhibición en función del pH del sobrenadante y de la cepa *Clostridium* spp

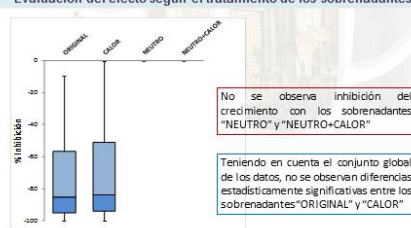
Efecto inhibitorio en el crecimiento de las cepas de *Clostridium* spp. Excepción: *B. bifidum* no mostró efecto inhibitorio frente a *C. perfringens* y *C. leptum*

RESULTADOS

Evaluación del efecto *in vitro* de los sobrenadantes libres de células sobre *Clostridium* spp



Evaluación del efecto según el tratamiento de los sobrenadantes



Evaluación del efecto según el tiempo incubación de las BAL

Cepa	pH=DE de los sobrenadantes "Original" y "Calor" a diferentes tiempos de incubación			
	10 horas	24 horas	48 horas	72 horas
<i>L. rhamnosus</i>	5,21±0,1	4,14±0,03	3,88±0,01	3,960
<i>L. gasseri</i>	4,67±0,09	4,14±0,06	4,16±0,01	4,18±0,01
<i>B. longum</i>	4,92±0,32	4,09±0,04	3,86±0,01	3,86±0,01
<i>B. bifidum</i>	5,1±0,01	4,56±0,01	4,45±0,07	4,52±0,01

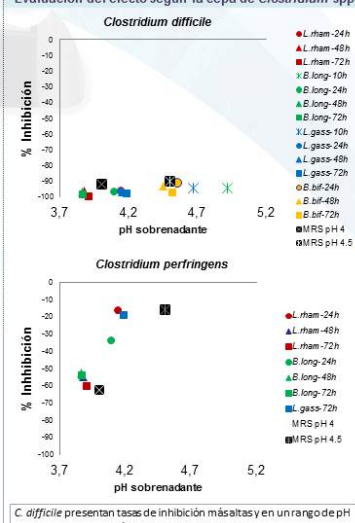
DE = Desviación estándar

Inhibición de *C. difficile* por parte de *L. gasseri* y *B. longum*

Actividad variable de la inhibición en función del pH del sobrenadante y de la cepa *Clostridium* spp

Efecto inhibitorio en el crecimiento de las cepas de *Clostridium* spp. Excepción: *B. bifidum* no mostró efecto inhibitorio frente a *C. perfringens* y *C. leptum*

Evaluación del efecto según la cepa de *Clostridium* spp



CONCLUSIONES

- Se observa actividad inhibitoria con los sobrenadantes de pH comprendido entre 3,86-4,92.
- El grado de inhibición es específico de la cepa BAL y de *Clostridium* spp testada, siendo *C. difficile* y *C. coccooides* las cepas más susceptibles.
- Las moléculas responsables de la inhibición del crecimiento de *Clostridium* spp son resistentes al tratamiento térmico (100°C) y pH dependientes, lo que refuerza la hipótesis de que los ácidos orgánicos presentes en los sobrenadantes son los responsables de la inhibición.

6. CONCLUSIONES

A partir de los resultados descritos y derivados de los diferentes estudios en los que se ha organizado la presente tesis doctoral, se han obtenido las siguientes conclusiones:

1. La revisión de la literatura sobre la presencia de *C. difficile* en las diferentes etapas de la producción alimentaria refleja la falta de una metodología estandarizada que dificulta la comparación de los datos entre los diferentes estudios. La escasez de estudios sobre el crecimiento y la resistencia de las formas vegetativas y esporas de *C. difficile* en matrices alimentarias, así como de los factores de riesgo implicados en la adquisición de la infección por *C. difficile* a partir de los alimentos, dificulta la inclusión de este patógeno como un agente biológico de transmisión alimentaria.
2. Se ha demostrado que el pretratamiento de las muestras fecales con un caldo de enriquecimiento suplementado con taurocolato de sodio seguido de un choque con etanol permite obtener la máxima tasa de recuperación de *C. difficile*. El uso de escobillones rectales presenta valores de sensibilidad equivalentes al obtenido en muestras de heces tras el pretratamiento con el método de enriquecimiento en caldo.
3. En el primer eslabón de la cadena de producción alimentaria, se detecta una tasa de aislamiento de *C. difficile* toxigénico del 16,9 % de la población porcina estudiada. Se observa una disminución en las tasas de positividad de *C. difficile* según aumenta la edad del animal.
4. El aislamiento de *C. difficile* a partir de vísceras de ave adquiridas en un centro de procesamiento en un 16,7 % demuestra la supervivencia del microorganismo en el entorno ácido de las mollejas y su posible transmisión a otras piezas de carne durante las operaciones de faenado en la sala de despique.
5. En las muestras de carne fresca y procesada de ave y cerdo adquiridas en establecimientos de venta al por menor no se detecta la presencia de *C. difficile*, indicando que la carne podrían no ser una fuente significativa de transmisión a humanos.
6. El aislamiento de *C. difficile* en el 8,5 % de las muestras de moluscos bivalvos analizadas de las cuales un 36,4 % son cepas toxigénicas, indica que la ingesta de

moluscos contaminados crudos o mal cocinados podría ser un vehículo a tener en cuenta en la adquisición de la bacteria.

7. En el estudio del efecto *in vitro* de sustancias antimicrobianas sobre el crecimiento de *C. difficile*, las diferentes presentaciones de los extractos de hojas y semillas de *Moringa oleifera* presentan efectos inhibitorios variables en función del disolvente de extracción empleado, presentando los extractos de hojas frescas de tallo rojo los mayores efectos inhibitorios.

7. AGRADECIMIENTOS

Al dar por terminada esta memoria de tesis quiero recordar y agradecer a todas aquellas instituciones y personas que han hecho posible la realización de este trabajo. Agradecer a la **Universidad de Murcia** y al **Campus Excelencia Internacional Mare Nostrum** por brindarme la financiación para desarrollar este trabajo de investigación.

Agradecer de manera muy especial a mi directora, la Dra. **M^a Carmen Martínez**, por confiar en mí y dejarme hacer y deshacer, por sus valiosas aportaciones, y por guiarme en todo momento. Agradecer igualmente a mi director, el Dr. **Gaspar Ros** por la confianza para realizar esta tesis doctoral bajo su dirección y por facilitar los medios para llevar a cabo las actividades desarrolladas.

Agradecer a mis compañeras y compañeros del Área de Nutrición y Bromatología. Gracias a **Carlos Alberto, Rubén López, Teresa y Clara**, por la ayuda con los entresijos de las técnicas de Biología molecular. A **Silvia Martínez, Ana y Aurora**, por la recogida de las muestras de los lechones. A **Javier Santaella**, por la recogida de las muestras de matadero. A **Alba Durango**, por compartir su trabajo y perseverancia. A **Elvira Zapata y José Miguel**, por su colaboración en el procesamiento de las muestras. A **Toñi, David, Laura, Guillermo, Carmen Frontela, Amparo, Marina, Inma, Lorena, Gema, Rocío, Gala, Javier García, M^a Jesús Periago y Sancho Bañón**, por resolverme las dudas del día a día, y por tener siempre un gesto amable.

Agradecer a mis compañeras y compañeros de profesión, **Rosa Cesteros, Carmen Guerrero, Cristóbal Ramírez, Rosa Blázquez, Carmen Alemán, Leticia del Rio, Cristina Casañ, Ana Pérez, Lorena Lozano, Carmen Cuadrado** por ser mis referentes y “germen” de mis inquietudes más microscópicas.

Agradecer a mi madre, familia, amigas y amigos por su interés en la continuidad de este proyecto. Y en especial, agradecer a **Antonio**, por su inagotable paciencia e incalculable apoyo.

8. RESUMEN

Clostridioides difficile es un importante patógeno humano asociado con enfermedades entéricas graves en todo el mundo, siendo el principal agente causal de diarrea nosocomial y colitis pseudomembranosa. Tradicionalmente, la infección por *C. difficile* (CDI, por sus siglas en inglés) se ha asociado con pacientes que reciben tratamiento antibiótico de amplio espectro en hospitales. Sin embargo, a partir del año 2000, las revisiones describen un aumento de la CDI asociada a la comunidad, que no está vinculado a los factores de riesgo tradicionales como la terapia reciente con antibióticos, edad avanzada, comorbilidad significativa y hospitalización previa. Es por tanto que la epidemiología y transmisión de *C. difficile* para las infecciones asociadas a la comunidad no está completamente definida. La presencia de *C. difficile* en el ganado y en los alimentos sugiere que los productos alimentarios contaminados con esporas podrían ser un vehículo importante en la propagación de la CDI. Sin embargo, actualmente *C. difficile* no está considerado como un microorganismo causante de enfermedades transmitidas por los alimentos.

La presente tesis doctoral se presenta como compendio de cinco trabajos cuyo objetivo principal ha sido ampliar el conocimiento de *C. difficile* en el entorno alimentario y determinar su presencia en diferentes etapas de la cadena de producción alimentaria.

El primer estudio ha consistido en la realización de una revisión científica que profundiza en la epidemiología de *C. difficile* asociada a los alimentos. Se ha realizado un análisis de las fuentes con mayor prevalencia de *C. difficile* en las diferentes etapas de la cadena de producción alimentaria para definir los objetivos de búsqueda del microorganismo en el entorno alimentario. La revisión de la literatura refleja la falta de una metodología estandarizada de muestreo y técnicas de recuperación del microorganismo, hecho que dificulta la comparación de los datos entre los diferentes estudios. Por otro lado, existen muy pocas publicaciones sobre el crecimiento y la resistencia de las formas vegetativas y esporas de *C. difficile* en matrices alimentarias, y el número de esporas necesarias o dosis infectiva para causar CDI no se ha establecido. Actualmente no hay casos documentados de CDI relacionados con un patrón de consumo de alimentos definido y tampoco se conocen los factores de riesgo implicados en la adquisición de la CDI a partir de los alimentos. Todos estos factores dificultan la inclusión de este patógeno como un agente biológico de transmisión alimentaria.

Debido a la escasez de datos sobre métodos estandarizados de análisis, y con el fin de obtener conclusiones sobre la presencia del patógeno en la producción primaria, en el segundo estudio se ha desarrollado un procedimiento para la detección de *C. difficile* a partir de muestras fecales de cerdos. Para ello, se ha realizado una comparación de las tasas de aislamiento de *C. difficile* tras diferentes tratamientos de la muestra, previos al cultivo en un medio selectivo, y una evaluación de la correlación de las tasas de aislamiento de *C. difficile* entre muestras de heces y de torundas rectales. Los diferentes pretratamientos han consistido en la incubación en un caldo de enriquecimiento suplementado con taurocolato de sodio, en un choque con etanol o en la combinación de ambos. Se ha demostrado que el pretratamiento combinado de las muestras fecales con un caldo de enriquecimiento seguido de un choque con etanol permite obtener la máxima tasa de recuperación de *C. difficile*. Los escobillones rectales presentan valores de sensibilidad equivalentes al obtenido en muestras de heces tras el pretratamiento con el método de enriquecimiento en caldo, por lo que se propone el uso de torundas rectales en estudios de vigilancia de *C. difficile* debido a su fácil recolección, transporte y manejo.

Se ha seleccionado al ganado porcino como fuente prevalente de *C. difficile* en animales de abasto para determinar la presencia de *C. difficile* en la etapa de producción primaria y estudiar el efecto de las fases del ciclo de producción sobre su presencia en los animales. Tras el pretratamiento combinado de las muestras fecales con un caldo de enriquecimiento seguido de un choque con etanol previo al cultivo, los resultados reflejan una tasa de aislamiento de *C. difficile* toxigénico del 16,9 % de la población estudiada, tasa que disminuye según aumenta la edad del animal.

En el tercer trabajo se exponen los datos obtenidos en matadero, como siguiente punto en la cadena de producción. Se ha determinado la presencia de *C. difficile* en vísceras de ave obtenidas en la sala de despiece de una planta de procesado. Es el primer trabajo que se realiza en España en este tipo de alimentos. Las muestras se sometieron a un pretratamiento consistente en la incubación en un caldo de enriquecimiento suplementado con taurocolato de sodio seguido de un choque con etanol, antes de su aislamiento en un medio de cultivo selectivo. Los resultados reflejan una tasa de aislamiento de *C. difficile* a partir de mollejas e hígado del 16,7 %. Aunque las cepas aisladas fueran no toxigénicas, se demuestra la supervivencia del microorganismo en vísceras y su posible transmisión a otras piezas de carne durante las

operaciones de faenado en la sala de despiece. Adicionalmente, en la tercera publicación, se ha determinado la presencia de *C. difficile* en carnes adquiridas en la etapa de comercialización, concretamente en establecimientos de venta al por menor. Se han seleccionado carnes frescas y procesadas de ave y porcino, por su importancia en el sector y su elevado consumo, y se ha seguido el mismo protocolo de pretratamiento y cultivo de las muestras de vísceras. En este caso debemos concluir que la ausencia de detección de *C. difficile* en las muestras de carne fresca y procesada de ave y cerdo analizadas indica que la carne, y no las vísceras, no parece ser una fuente significativa de transmisión del patógeno a humanos.

El cuarto trabajo igualmente proporciona datos sobre la presencia de *C. difficile* en moluscos adquiridos en la etapa de comercialización. Se escogieron los mejillones dentro de los moluscos bivalvos por ser accesibles económicamente y estar asociados con frecuencia con toxiinfecciones alimentarias. No se han publicado estudios previos en España y destacamos que el punto de muestreo se encuentra al final de la cadena de consumo, concretamente en establecimientos de venta al por menor. Las muestras de mejillones se sometieron a un pretratamiento consistente en la incubación en un caldo de enriquecimiento seguido de un choque con etanol, antes de su aislamiento en medio sólido. El aislamiento de *C. difficile* en el 8,5 % de las muestras de moluscos analizadas, de las cuales un 36,4 % son cepas toxigénicas, indica que la ingesta de moluscos contaminados crudos o mal cocinados podría ser un vehículo a tener en cuenta en la adquisición de la bacteria.

En el quinto trabajo se ha realizado una primera aproximación para evaluar el efecto *in vitro* de sustancias naturales sobre el crecimiento de *C. difficile*. Se ha seleccionado la Moringa (*Moringa oleífera*), una planta poco conocida en España pero ampliamente utilizada en otros países como tratamiento de una gran variedad de enfermedades, para estudiar la actividad de este vegetal contra bacterias formadoras de esporas del género *Clostridium* spp. Para ello se ha desarrollado la metodología de microdilución en caldo con diluciones seriadas de diversos extractos de las partes comestibles de la planta. Se ha observado que las diferentes presentaciones de los extractos de hojas y semillas de Moringa presentan efectos inhibitorios variables en función del disolvente de extracción empleado, presentando los extractos de hojas frescas de tallo rojo los mayores efectos inhibitorios.

Los estudios incluidos en esta tesis doctoral proporcionan una primera aproximación a la investigación de *C. difficile* en la cadena de producción alimentaria, puesto que el plan de muestreo ha sido limitado. No obstante, cada una de las publicaciones de este compendio contribuye a conocer el riesgo de infección asociado al consumo de alimentos y su transmisión al hombre.

Summary

Clostridioides difficile is an important human pathogen associated with serious enteric diseases worldwide, being the major causative agent of nosocomial diarrhea and pseudomembranous colitis. Traditionally, *C. difficile* infection (CDI) has been associated with patients who were given broad-spectrum antibiotic treatment in hospitals. However, from 2000 onwards, reviews described an increase in community-associated CDI that is not linked to traditional risk factors (recent antibiotic therapy, older age, significant comorbidity, or previous hospitalization). The epidemiology and transmission of *C. difficile*, particularly for community-associated infection, are not completely understood. The occurrence of *C. difficile* in livestock and food suggests that contaminated food products with spores could be a vehicle to spread CDI. However, *C. difficile* is currently regarded as a foodborne pathogen of uncertain significance in foodborne illness.

This doctoral thesis is presented as a collection of five manuscripts whose main objective has been to expand the knowledge of *C. difficile* in the food environment and determine its occurrence at different steps of the food supply chain.

The first study has focussed on a literature review that delves into the epidemiology of *C. difficile* associated with food. Highest *C. difficile* prevalence sources in the different stages of the food supply chain have analysed to define the goals for searching the microorganism in the food environment. The literature review reflects the lack of a standardized methodology for sampling and recovery techniques, that hinders the comparison of data from different studies. On the other hand, there are few data about the growth and resistance of vegetative forms and spores of *C. difficile* in food matrices, and the number of spores necessary or infectious dose that results in CDI has not been established. Currently there are no documented cases of CDI related with a food consumption pattern and the risk factors involved in acquiring CDI from food are not known. All these factors preclude the inclusion of this pathogen as a foodborne agent.

The scarcity of data in standardized methods of analysis, and in order to draw conclusions about the presence of the pathogen in primary production, in the second

study a procedure to detect *C. difficile* from faecal specimens of piglets has been developed. A comparison of the *C. difficile* isolation rates after different treatments of the specimens, prior to culture in a selective medium, and an evaluation of the correlation of the isolation rates of *C. difficile* between faeces and rectal swab specimens has been studied. Pre-treatments have consisted in an incubation in an enrichment broth supplemented with sodium taurocholate, in a shock with ethanol or in a combination of both. Combined pre-treatment of faecal specimens with enrichment broth followed by ethanol shock has been shown to achieve the highest recovery rate of *C. difficile*. Rectal swabs present sensitivity values equivalent to that obtained in faeces specimens after pre-treatment with the broth enrichment method, thus, the use of rectal swabs is proposed in *C. difficile* surveillance studies due to their easy collection, transport and handling.

Swine has been selected as the prevalent source of *C. difficile* in slaughter animals to determine the presence of *C. difficile* in the first supply chain stage and to study the effect of the production cycle on its presence in animals. After the combined pre-treatment of the faecal samples with an enrichment broth followed by an ethanol shock prior to culture, the results reflect a toxigenic *C. difficile* isolation rate of 16.9 % of the studied population, a rate that decreases with the animal age.

In the third study, the data obtained in the slaughterhouse are presented as the next step in the food supply chain. The presence of *C. difficile* has been determined in poultry giblets obtained in the cutting room of a processing plant. It is the first report carried out in Spain in this type of food. The samples were subjected to a pre-treatment consisting of incubation in an enrichment broth supplemented with sodium taurocholate followed by an ethanol shock, before their isolation in a selective culture medium. The results reflect an isolation rate of *C. difficile* from gizzards and liver of 16.7 %. Although the isolated strains were non-toxigenic, the survival of the microorganism in giblets and its possible transmission to other pieces of meat during slaughter operations has been demonstrated. Additionally, in the third article, the presence of *C. difficile* in meat acquired in the retail stage has been determined. Fresh and processed poultry and pork meat have been selected due to their importance in the sector and their high consumption, and the same pre-treatment and culture protocol for the giblet samples has been followed. We conclude that the absence of *C. difficile* detection in fresh and

processed poultry and pork meat samples indicates that the meat, and not giblets, does not appear to be a significant source of transmission of the pathogen to humans.

The fourth study also provides data on the presence of *C. difficile* in molluscs acquired in the retail stage. Mussels were chosen from bivalve molluscs because they are economically accessible and are frequently associated with foodborne infections. No previous studies have been published in Spain and we highlight that the sampling place is at the end of the consumption chain, specifically in retail establishments. The mussel samples were also processed with a pre-treatment consisting of incubation in an enrichment broth followed by an ethanol shock, before their isolation in solid medium. The *C. difficile* isolation in 8.5 % of the analysed mollusc samples, of which 36.4 % are toxigenic strains, indicates that the ingestion of contaminated raw or poorly cooked molluscs could be a vehicle to consider in the acquisition of the bacteria.

In the fifth study, a first approach to evaluate the *in vitro* effect of natural substances on the growth of *C. difficile* was made. Moringa (*Moringa oleifera*), a plant little known in Spain but widely used in other countries as a treatment for a wide variety of diseases, has been selected to study the activity of this plant against spore-forming bacteria of the genus *Clostridium* spp. Broth microdilution method containing serial dilutions of extracts of the edible parts of the plant has been developed. It has been observed that the different presentations of the Moringa leaf and seed extracts present variable inhibitory effect depending on the extraction solvent used, showing the extracts of fresh red stem leaves the greatest inhibitory effect.

As a whole, the thesis provides a first approach to the investigation of *C. difficile* in the food supply chain, due the sampling plan has been limited. However, each of the publications in this collection contributes to understanding the risk of infection associated with food consumption and its transmission to human.

